

ALINE OLIVEIRA MELLO

**IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS DE INTERAÇÃO PARA A CINASE
REGULADORA DE SPLICING SRPK2**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de Magister Scientiae.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2014**

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

T

M527i
2014 Mello, Aline Oliveira, 1990-
Identificação de parceiros de interação para a cinase reguladora de
splicing SRPK2 / Aline Oliveira Mello. - Viçosa, MG, 2014.
viii, 81f. : il. : 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Gustavo Costa Bressan.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.55-64.

1. Biologia celular. 2. Proteínas. 3. SRPK2. 4. Splicing. I.
Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral.
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. II.
Título.

CDD 22. ed. 572.6

ALINE OLIVEIRA MELLO

**IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS DE INTERAÇÃO PARA A CINASE
REGULADORA DE SPLICING SRPK2**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 19 de agosto de 2014.

Anésia Aparecida dos Santos

Flávia Maria Lopes Passos

Gustavo Costa Bressan
(Orientador)

Aos meus pais e à minha irmã

AGRADECIMENTOS

À Deus por minha vida, por toda persistência e força concedidas.

À minha mãe Saionaria pelas longas conversas telefônicas e ao apoio e incentivo mesmo que distante.

Ao meu pai Walter pelas preocupações, pelos conselhos valorosos e pela disposição em me ajudar em todas as situações.

À minha irmã Ana Flávia pelo companheirismo.

À tia Nilma pelos almoços de volta à casa.

À todas as amigas que me proporcionaram os melhores 6 anos de Viçosa: Dani, Danúbia, Isabela, Janine, Josi, Kissia e Sendy.

Às companheiras de república pela cumplicidade: Elba, Fernanda, Mari, Madu, Melissa, Stella, Tamyres e a D. Luisa por todo carinho e consideração.

Ao Professor Gustavo Costa Bressan pela orientação, apoio e confiança.

À Professora Flávia Maria Lopes Passos e à Professora Anésia Aparecida dos Santos, por aceitarem o convite para compor a banca de defesa e pela contribuição para o engrandecimento deste trabalho.

À todos do LBM e em especial aos Professores Luciano Fietto e Andrea Ribon por me receberem tão bem em seu laboratório.

À Roméria e ao Gabriel pela ajuda nos experimentos.

À Universidade Federal de Viçosa pela excelência no ensino.

Aos departamentos de Biologia Geral e Bioquímica e Biologia Molecular pelo apoio.

E à CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro a esta pesquisa e concessão de bolsas.

BIOGRAFIA

ALINE OLIVEIRA MELLO, filha de Walter de Mello Faria e Saionaria Oliveira Barcelos Mello, nasceu no dia 26 de fevereiro de 1990, em Itaúna, Minas Gerais, Brasil.

Em março de 2008 ingressou no curso de graduação em Ciências Biológicas, modalidade bacharelado, da Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em novembro de 2012.

Em novembro de 2012 iniciou o curso de mestrado pelo programa de Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa.

Em agosto de 2014 submeteu-se à defesa de dissertação sob a orientação do Professor Gustavo Costa Bressan.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Organização do genoma e o processo de splicing.....	3
2.2. As proteínas SR e suas cinases, as SRPKs.....	6
2.3. O envolvimento das SRPKs em diferentes doenças.....	12
2.4. As SRPKs e o câncer.....	14
3. METODOLOGIA.....	17
3.1. Amplificação da região espaçadora e clonagem em vetor de clonagem.....	17
3.2. Preparação de células termocompetentes para transformação.....	19
3.3. Transformação das bactérias por choque térmico e extração do DNA plasmidial.....	20
3.4. Reação de clivagem e clonagem em vetor de expressão em leveduras.....	21
3.5. Transformação de leveduras.....	22
3.6. Primeiro ensaio para estudo da ativação dos genes repórter.....	24
3.6.1. his3.....	24
3.6.2. lacZ.....	24
3.7. Duplo-híbrido de leveduras.....	25
3.8. Segundo ensaio para estudo da ativação dos genes repórter.....	25
3.8.1. lacZ.....	25
3.8.2. his 3.....	26
3.9. Extração de DNA plasmidial de leveduras.....	27
3.10. Preparação de células eletrocompetentes.....	27
3.11. Transformação por eletroporação.....	28
3.12. Extração plasmidial, amplificação do cDNA da biblioteca de leucócitos e confirmação por sequenciamento.....	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1. Amplificação da região espaçadora e clonagem em vetor de expressão em leveduras.....	30
4.2. Testes de transativação.....	31
4.3. Screening de proteínas pelo método de duplo-híbrido em leveduras e confirmação dos clones.....	32
5. DISCUSSÃO.....	39
5.1. Interações proteicas relacionadas a vias de migração, diferenciação, proliferação, sobrevivência celular e angiogênese.....	39
5.1.1. T β 4.....	39
5.1.2. Swiprosin-1.....	43
5.1.3. SNIP-1.....	45
5.1.4. NPM1 e as proteínas ribossômicas (RPS20, RPS27P3 e RPLP2).....	48
5.2. SRPK2, integrando as vias.....	51
5.3. Perspectivas Futuras.....	53
6. CONCLUSÕES.....	54

REFERÊNCIAS.....	55
APÊNDICE A - Ensaios de transativação dos genes repórteres.....	65
APÊNDICE B - Ensaios de ativação dos genes repórteres dos clones obtidos pelo screening com S-SRPK2.....	67
APÊNDICE C – Resultado dos sequenciamentos realizados com os clones obtidos pelo screening com S-SRPK2.....	75

RESUMO

MELLO, Aline Oliveira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2014. **Identificação de Novos Parceiros de Interação para a Cinase Reguladora de Splicing SRPK2.** Orientador: Gustavo Costa Bressan. Coorientadores: Luciano Gomes Fietto e Juliana Lopes Rangel Fietto.

Serine-Arginine Protein Kinase 2 - SRPK2 é uma cinase reguladora de fatores de splicing não-snRNPs (proteínas SR), e de fatores snRNPs (U4U6-U5 tri-snRNP). SRPK2 regula as proteínas SR fosforilando-as em seus resíduos de serina e recrutando-as para a formação do spliceossomo, enquanto atua na formação do complexo U4U6-U5 tri-snRNP, envolvido na seleção do sítio de splicing 3'. As interações com fatores snRNP e não-snRNP são conhecidas e bem estabelecidas funcionalmente, no entanto, pouco se sabe sobre proteínas que regulam o funcionamento da SRPK2, e sobre demais alvos de fosforilação. As proteínas SRPKs possuem seu domínio cinase dividido em dois por uma região espaçadora de grande flexibilidade estrutural, passível de interação. Portanto, possível responsável pela seleção de substratos e/ou alvo de regulação. Nosso objetivo com este trabalho foi encontrar novas interações proteicas de SRPK2 através de sua região espaçadora. A técnica escolhida foi o duplo-híbrido em leveduras, no qual estas foram cotransformadas com o plasmídeo pBTM116K/S-SRPK2 trp1 e com uma biblioteca de cDNAs de leucócitos humanos em pACT2 leu2. O experimento foi processado em meio restritivo SD-TRP -LEU -HIS, acrescido de 30mM de 3AT e mantido em estufa 30°C por 120 horas. Ao final deste período, foi verificado o crescimento de 119 colônias de leveduras, submetidas a diferentes testes de ativação dos genes repórteres his3 e lacZ. Os resultados destes testes nos levaram a seleção de 42 clones, que tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos, sequenciados e analisados pela ferramenta Blast do NCBI. As proteínas codificadas por estes genes estão funcionalmente relacionadas a processos celulares como biogênese ribossomal, migração, diferenciação, angiogênese, proliferação, sobrevivência e ciclo celular. Estes resultados sugerem novos mecanismos moleculares para a atuação da SRPK2 no processo tumorigênico.

ABSTRACT

MELLO, Aline Oliveira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2014.
Identification of New Interaction Mates for the splicing regulator kinase SRPK2.
Adviser: Gustavo Costa Bressan. Co-advisers: Luciano Gomes Fietto and Juliana Lopes Rangel Fietto.

Serine-Arginine Protein Kinase 2 - SRPK2 is a regulator kinase of non-snRNP splicing factors (SR proteins) and of snRNPs factors (U4/U6-U5 tri-snRNP). SRPK2 regulates SR proteins phosphorylating them on their serine and recruiting them for the formation of the spliceosome, while acts on the tri-snRNP U4/U6-U5 complex assembly, involved in the splicing 3' site selection. The interactions with snRNP and non-snRNP factors are known and well-established functionally, however, little is known about the proteins that regulate the functioning of SRPK2, and about other targets of phosphorylation. The SRPKs proteins have their kinase domain divided into two by a spacer region of great structural flexibility, believable of interaction. Therefore, possible responsible for selection of substrates and/or aim of regulation. Our aim with this work was to find new protein interactions of SRPK2 by its space region. The technique chose was two-hybrid yeast, in which yeasts were cotransfected with pBTM116K/S-SRPK2 trp1 plasmid and a human leukocyte cDNA library in pACT2 leu2. The experiment was processed in restrictive medium SD –TRP –LEU –HIS, plus 30 mM of 3AT and keep in a incubator 30°C for 120 hours. At the end of this period, it was found the growth of 119 yeast colonies, subjected a different tests of activation of reporter genes his3 and lacZ. The results of these tests led to the selection of 42 clones, which had its plasmid DNA extracted, sequenced and analyzed by the NCBI Blast tool. The proteins encoded by these genes are functionally related in cellular processes as ribosome biogenesis, migration, differentiation, angiogenesis, proliferation, survival and cell cycle. These results suggest new molecular mechanisms for the performance of SRPK2 in tumorigenic process.

1. INTRODUÇÃO

O genoma dos eucariotos superiores é constituído por sequências codificadoras de proteínas (exons), intercaladas por múltiplas sequências não-codificadoras de proteínas (introns). No entanto, o mRNA traduzido pelos ribossomos, dito mRNA maduro, é um mRNA processado, livre de introns. O processo de exclusão de introns e ligação de exons, é chamado splicing e pode ser do tipo constitutivo ou alternativo.

O splicing alternativo consiste na exclusão de uma região exônica que normalmente é retida, na seleção de um sítio de splice 5' ou 3' alternativo, ou ainda na retenção de uma região intrônica que deveria ser excluída, no mRNA maduro. Este mecanismo produz isoformas de uma mesma proteína que possuem funções correlatas, aumentando a complexidade do proteoma eucariótico.

Os componentes do spliceossomo, o complexo de microRNAs e proteínas responsável pelo processo de splicing, são chamados fatores de splicing e são de duas classes: os snRNPs (small nuclear ribonucleoprotein particles) e os não-snRNPs. As proteínas SR pertencem à classe dos não-snRNPs. Elas atuam na seleção do sítio de splicing, no recrutamento dos fatores de splicing snRNPs e na montagem do spliceossomo. Elas são reguladas primariamente pela fosforilação de suas serinas em regiões ricas em Ser-Arg, pelas SRPKs (Serine/Arginine specific-protein kinase).

As SRPKs regulam não somente proteínas SR como também fatores de splicing da classe dos snRNPs. SR- protein kinase 1 (SRPK1) é encontrada associada ao snRNP U1, responsável pela seleção do sítio de splicing 5' e SRPK2 ao complexo pré-formado snRNP U4/6-U5, responsável pela seleção do sítio de splicing 3'.

As SRPKs possuem o domínio catalítico dividido em 2 lóbulos, N- e C-terminais, por uma região de aproximadamente 300 aminoácidos, com grande flexibilidade estrutural e de sequencia pouco conservada entre as diferentes cinases, o domínio espaçador. Acredita-se que este domínio possua o sinal de localização citoplasmática, e na SRPK2, que detem uma região rica em aminoácidos ácidos, pode estar relacionado a esta função. Em experimentos nos quais a SRPK teve o seu domínio espaçador deletado, ela foi translocada para o núcleo formando agregados.

Além da localização celular, o domínio espaçador parece estar relacionado a regulação das SRPKs e pode hipoteticamente estar envolvido na seleção de substratos. Pensando nisto, foi construído um clone contendo apenas a região espaçadora de SRPK2, para ser usado como isca em um duplo-híbrido de leveduras transformada com uma biblioteca de cDNA de

leucócitos humanos. O objetivo deste trabalho foi encontrar ligantes da SRPK2, visando entender seu papel no processo oncogênico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Organização do genoma e o processo de splicing

O genoma dos eucariotos superiores é constituído por sequências codificadoras chamadas exons, intercaladas por múltiplas sequências não-codificadoras ditas introns. Esta organização caracteriza o genoma eucariótico como descontínuo (Cooper, Wan & Dreyfuss, 2009). A síntese de proteínas em células eucarióticas requer um processamento do pré-mRNA, no qual os introns devem ser retirados pelo mecanismo de splicing por meio de duas reações de transesterificação e os exons ligados, resultando na formação de um mRNA maduro, o qual será traduzido em proteínas no citoplasma pelos ribossomos (Ward & Cooper, 2010). Um esquema do evento de splicing pode ser visto na Figura 1.

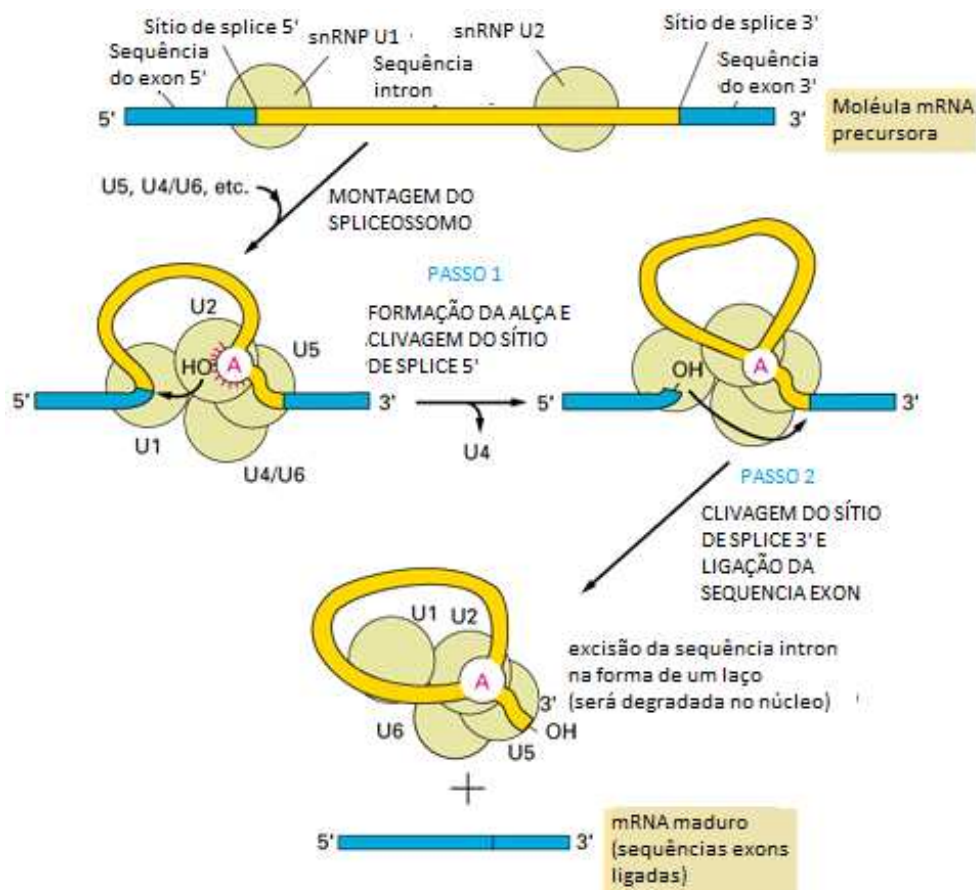


Figura 1 – Representação esquemática do mecanismo de splicing do mRNA. Figura modificada de Alberts et al, 1994. Molecular Biology of the Cell 3rd edition. New York: Garland Science. 1728 p.

O número relativamente modesto de genes no genoma humano não reflete a alta complexidade do proteoma expresso. Um mecanismo que pode explicar esta disparidade é o splicing alternativo, que permite não só a excisão de introns, como também a modificação e até mesmo eliminação de exons durante o processamento do pré-mRNA. Isto gera múltiplos mRNAs, que codificam diferentes isoformas de uma mesma proteína (Figura 2), que possuem funções correlatas, já que domínios específicos podem ser subtraídos ou adicionados (Skotheim & Nees, 2007). Estima-se que 95% dos transcritos dos genes multi-exons, estão sob o controle de splicing alternativo, sugerindo que este mecanismo tem papel central na geração de diversidade proteica (He et al, 2009).

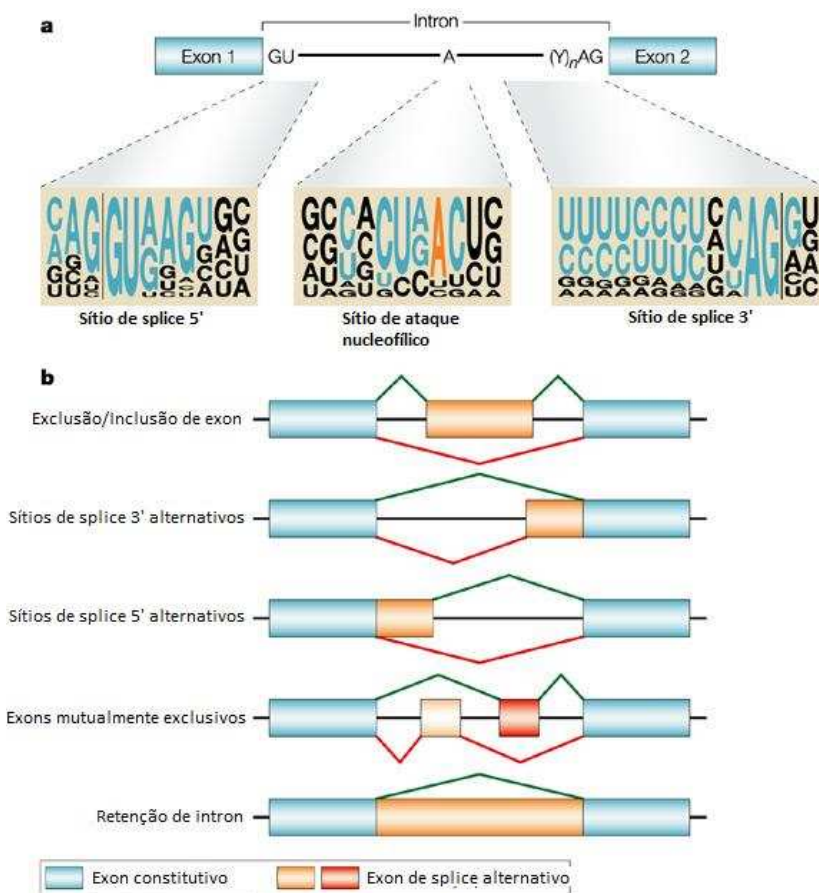


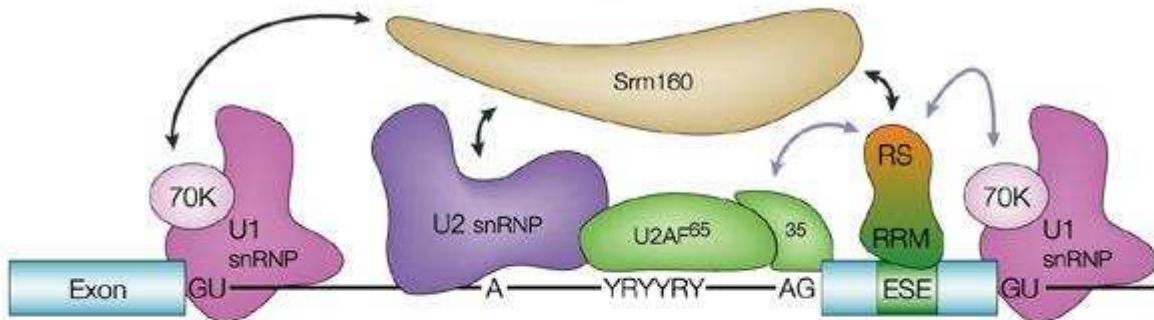
Figura 2 – Representação esquemática do mecanismo de splicing alternativo do mRNA. Figura modificada de Cartegni et al, 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. Nature Reviews Genetics 3: 285-298

O spliceossomo é o complexo responsável por catalisar o processo de splicing, tanto o constitutivo quanto o alternativo. Trata-se de uma ribonucleoproteína (RNP -

ribonucleoprotein) constituída por pelo menos cinco snRNAs (small nuclear RNAs) e 50 proteínas, cujo núcleo ativo é composto em grande parte por RNA, sendo por isso considerado uma ribozima (Collins & Guthrie, 2000). Para a seleção do sítio de splicing, montagem do spliceossomo e processamento do pré-mRNA, a maquinaria celular conta com a ajuda dos fatores de splicing. São duas as classes de fatores de splicing; os snRNPs (small nuclear RNPs): U1, U2, U5 e U4/6; e os fatores não-snRNPs: hnRNPs (heterogeneous nuclear RNPs), proteínas SR (serine/arginine), dentre outras; e microRNAs (Krämer, 1996).

O splicing do pré-mRNA envolve o reconhecimento inicial de sequências conservadas nos limites exon-intron (Roberts & Smith, 2002), por proteínas que se ligam a estes sítios. Estas proteínas incluem ativadores de splicing que promovem o uso de um sítio em particular, e repressores de splicing que reduzem o uso de um sítio em particular. Um fator de splicing da família de proteínas ricas em arginina/serina (proteínas SR) se liga a cada exon na transcrição, em uma sequência particular de nucleotídeos chamada ativador exônico de splicing (ESE - exonic splicing enhancer). As proteínas SR promovem a formação de complexos contendo snRNP U1 ligado ao sítio de splicing 5' e U2 ligado ao sítio de ataque nucleofílico do pré-mRNA (Blencowe, 2000). Uma proteína SR também pode inibir ao invés de aumentar a ligação dos snRNPs, e nesse caso a sequência à qual ela se liga é chamada de supressor exônico de splicing (ESS - exonic splicing suppressor) (Wang et al, 2004 e 2006). Dessa maneira, as proteínas SR, podem fazer com que um exon seja deixado de fora do mRNA final. Em humanos e outros mamíferos, essa deleção de exons é a forma mais frequente de splicing alternativo. O esquema de como estas proteínas se organizam no pré-mRNA pode ser visualizado na Figura 3.

a Função de recrutamento: dependente do domínio RS



b Função de antagonista: independente do domínio RS

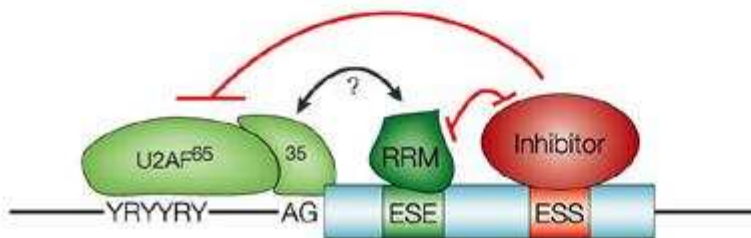


Figura 3 – Representação esquemática do recrutamento dos fatores e seleção do sítio de splicing. RS: domínio rico em serina e arginina; RRM: domínio de ligação ao RNA; ESE: ativador exônico de splicing; ESS: supressor exônico de splicing. Figura modificada de Cartegni et al, 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. Nature Reviews Genetics 3: 285-298

As proteínas SR também agem nos passos subsequentes, por exemplo, facilitando o recrutamento de U4/U6 e U5, que entram na via de montagem do spliceossomo como partícula pré-formada U4/U6-U5 tri-snRNP (Blencowe, 2000). O domínio RS das proteínas SR é fosforilado por diferentes cinases e esta fosforilação é importante para a habilidade desses domínios de interagirem entre si e com outras proteínas, e para a atividade das SR no splicing (Giannakouros et al, 2011; Ghosh & Adams, 2011; Shepard & Hertel, 2009).

2.2. As proteínas SR e suas cinases, as SRPKs

As proteínas SR, descritas pela primeira vez por Roth e seus colegas (Zahler et al, 1992), foram descobertas em um estudo com *Drosophila*. Um screening genético identificou 3 fatores de splicing: SWAP (suppressor-of-white-apricot), Tra (transformer) e Tra-2

(transformer-2), que se caracterizam por um domínio rico em dipeptídeos de serina/arginina (RS domain). Em seguida, em estudos com linhagens de células humanas, foram identificados mais dois fatores de splicing, SF2/ASF e SC35, que também revelaram a presença de domínios RS além de pelo menos um domínio de ligação ao RNA (RNA recognition motifs - RRM) (Shepard & Hertel, 2009; Zahler et al, 1992).

Após a identificação de outras proteínas que contêm o domínio RS, a família de proteínas SR foi classificada com base na presença de um fosfoepítipo reconhecido pelo anticorpo monoclonal mAb104, sua conservação em vertebrados e invertebrados, e sua atividade em ensaios complementares de splicing (Shepard & Hertel, 2009; Zahler et al, 1992). Em humanos, a família de proteínas SR é codificada por 9 genes, designados splicing factor arginine/serine-rich (SFRS) 1-7, 9 e 11, são eles: SF2/ASF, SC35, SRp20, SRp40, SRp55, SRp75, SRp30c, 9G8, e SRp54 (Shepard & Hertel, 2009). Todos eles possuem uma organização estrutural semelhante, com um ou dois domínios de ligação ao RNA (RRM domain) na porção N-terminal, um domínio rico em serina e arginina (RS domain) na porção C-terminal e outros domínios RS ao longo do polipeptídeo (Figura 4). Os domínios RRM são responsáveis por ligar a proteína ao RNA, enquanto os domínios RS funcionam como moduladores da interação proteína-proteína mediando os vários passos de montagem do spliceossomo (Wang et al, 1998).

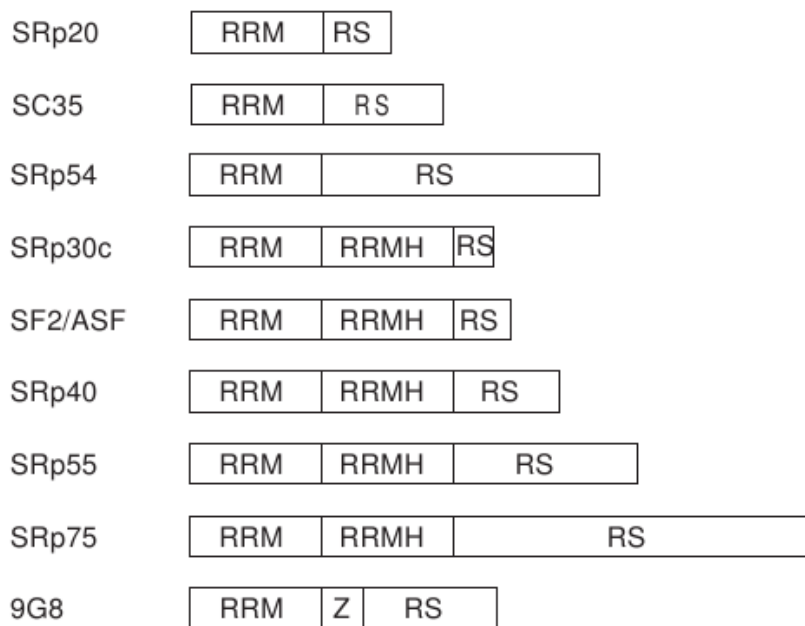


Figura 4 – Estrutura básica das proteínas SR. RRM: domínio de ligação ao RNA; RRMH: domínio homólogo ao RRM; Z: domínio de ligação ao RNA rico em zinco; RS:

domínio rico em serina e arginina. Figura modificada de Graveley 2000. Sorting out the complexity of SR protein functions. RNA. 6:1197-1211

A localização das proteínas SR é predominantemente nuclear e subnuclear. Quando não ativamente envolvidas no processo de transcrição ou de splicing, as proteínas SR residem nos speckles nucleares, os quais são subdivisões no núcleo que armazenam os fatores de splicing (Jang et al, 2008) No entanto, ao serem fosforiladas em suas serinas, as proteínas SR saem dos speckles e vão para o nucleoplasma onde interagem com o pré-mRNA nascente. O balanço entre fosforilação e desfosforilação promove a escolha correta do sítio de splicing e posteriormente a catálise do processo (Shepard & Hertel, 2009). As cinases especializadas em fosforilar os resíduos de serina das proteínas SR são: Serine/Arginine specific-protein kinases (SRPK), Clk/Sty kinases, cdc2p34, e topoisomerases.

As proteínas cinase serina/treonina, da qual as SRPKs fazem parte, e as cinase tirosina-específicas possuem um domínio catalítico de aproximadamente 290 aminoácidos divididos em 2 lóbulos, N-terminal e C-terminal, por uma região espaçadora estruturalmente desordenada e pouco conservada. Esta região espaçadora possui grande flexibilidade estrutural, podendo hipoteticamente ser considerada responsável pela seleção de substratos e/ou a região pela qual a SRPK2 sofre regulação. O sítio ativo está localizado entre o lóbulo N-terminal, composto por folhas β e uma única α -hélice, a hélice C, e um grande lóbulo C-terminal, predominantemente composto de α -hélices, que também inclui o segmento de ativação, uma região de 20 a 35 aminoácidos (Figura 5) (Endicott, Noble & Johnson, 2012).

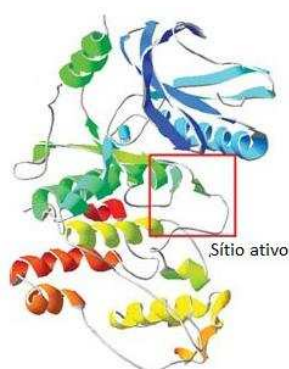


Figura 5 – Representação esquemática da estrutura da proteína SRPK1. Figura modificada de Liu et al, 2009. A novel *Physarum polycephalum* SR protein kinase specifically phosphorylates the RS domain of the human SR protein, ASF/SF2. Acta Biochimica Biophysica Sinica 41 (8): 657 – 667.

As cinases da família SRPK, SRPK1 e SRPK2, reconhecem somente os resíduos de arginina e fosforilam seus substratos somente nos resíduos de serina localizados em regiões de domínio RS (Gui et al, 1994b). Elas se diferenciam estruturalmente por SRPK1 possuir duas regiões de aminoácidos básicos (11-21 aas e 265-277 aas), enquanto SRPK2 possui apenas uma (264-276 aas). O domínio básico amino-terminal está relacionado à localização celular, é provável que ele funcione como um sinal de localização nuclear (NLS – nuclear localization signals). Ao invés de uma região básica amino-terminal, SRPK2 possui uma região rica em prolina (21-43 aas), a qual contém vários sítios de ligação consenso para o domínio SH3 (Src homology 3) (Ren et al, 1993), que podem estar envolvidos com a interação com proteínas que possuem este domínio. Além disso, SRPK2 também possui uma região ácida no domínio espaçador (287-405 aas), diferentemente de SRPK1 (Kuroyanagi et al, 1998) (Figura 6). Outra diferença é que elas não são igualmente expressas nos diferentes tecidos humanos. A SRPK1 é encontrada superexpressa no testículo e pâncreas, enquanto a SRPK2 é encontrada superexpressa no cérebro, ambas são encontradas moderadamente expressas em outros tecidos humanos como o do coração e músculo esquelético, e pouco expressas no pulmão, fígado e rins (Wang et al, 1998). A localização subcelular das SRPKs é predominantemente citoplasmática, mas elas também estão presentes no núcleo, principalmente nos speckles, onde estão associadas aos fatores de splicing, exercendo regulação sobre estes, assim como do próprio processo de splicing (Jang et al, 2008).

mSRPK1 (648 aa)



mSRPK2 (681 aa)



Figura 6 – Representação esquemática da estrutura primária das proteínas SRPK1 e SRPK2. RB: região básica; DA: Domínio Ácido; P: Prolina. Figura modificada de Kuroyanagi et al, 1998. Novel SR-Protein-Specific Kinase, SRPK2, Disassembles Nuclear Speckles. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 242: 357–364.

As SRPKs são necessárias para a entrada das proteínas SR no núcleo. Estudos com a ortóloga de leveduras, Sky1 e seu substrato Nlp3p SR-like (que transporta mRNAs para fora do núcleo) mostraram que Nlp3p precisa ser fosforilada para liberar o mRNA e ser reimportada para o núcleo. Em humanos, fatores de splicing como SF2/ASF são fosforilados no citoplasma por SRPK1 e subsequentemente transportados para o núcleo pela transportina SR2, que interage especificamente com os domínios RS fosforilados (Giannakouros et al, 2011). O domínio espaçador parece conter o sinal de localização citoplasmática, já que estudos anteriores demonstraram que a remoção do domínio espaçador em SRPK1 desencadeia a translocação destas cinases para o núcleo e consequentemente induz a agregação de fatores de splicing no núcleo (Jang et al, 2008). Além disso, a evidência inicial era que o domínio espaçador tinha pouco efeito sobre a atividade cinase. No entanto, um estudo mais recente indica que o domínio espaçador pode aumentar a catálise aumentando a taxa limitante do passo de libertação de ADP nas reações de cinase (Aubol et al, 2012).

Ainda, as células dos eucariotos respondem a uma reprogramação massiva do splicing alternativo ao serem estimuladas pelo fator de crescimento epidermal (EGF – Epidermal Growth Factor). Ao bloquear ramos individuais da via de sinalização de EGF, foi verificado que a ativação de AKT desempenha um papel principal, enquanto que outros ramos, como o das vias de JAK/STAT e ERK, fazem contribuições menores ao splicing induzido por EGF (Zhou et al, 2012). AKT ativada foi implicada na atuação direta sobre as proteínas SR (Blaustein et al, 2005 e Jiang et al, 2009) ou indiretamente ao retransmitir o sinal para o núcleo através de cinases específicas de proteínas SR, tais como SRPK2 (Jang et al, 2009) ou Clk/Sty (Jiang et al, 2009). Como as SRPKs parecem ocupar uma posição estratégica na célula ao retransmitir sinais externos para o núcleo, as SRPKs foram investigadas quanto a capacidade de transmitir o sinal da via de EGF para as proteínas SR culminando no splicing alternativo. Foi determinado então que as SRPKs são transmissoras centrais da sinalização de EGF, enquanto que todos os outros ramos estabelecidos previamente na via de EGF exercem papéis relativamente menores. Os resultados indicam que AKT provoca dois eventos de autofosforilação nas SRPKs essenciais para a ativação destas e da transmissão do sinal para as proteínas SR. Isto sugere que o eixo Akt-SRPK-SR constitui o principal ramo na transdução da sinalização de EGF na regulação do programa de splicing no núcleo (Zhou et al, 2012).

A localização celular das proteínas SRPKs está relacionada à interação destas com complexos de chaperonas no citoplasma. As chaperonas atuam auxiliando no dobramento apropriado de proteínas alvo em suas conformações ativas e protegendo-as da degradação por

proteassomos. A chaperona Hsp90 também é reconhecida por sua atividade ATPásica em modular a dinâmica de interações proteína/chaperona, controlando assim a localização celular e o tráfego intracelular da proteína alvo (Zhong et al, 2009). As SRPKs, tanto SRPK1 quanto SRPK2, já foram associadas a interação direta com as co-chaperonas Hsp40/DNAJc8 e Aha1, que mediam a interação com suas chaperonas Hsp70 e Hsp90, respectivamente. O complexo Hsp70/Hsp40 atua ancorando as SRPKs no citoplasma, enquanto o complexo Hsp90/Aha1 promove a translocação das SRPKs para o núcleo. As proteínas SRPKs ao serem fosforiladas aumentam a sua associação a Hsp90 e conseqüente translocação para o núcleo (Zhou et al, 2012).

A família de proteínas 14-3-3 por sua vez, age prevenindo a localização excessiva de SRPK no núcleo, mesmo sob condições de forte estimulação por EGF, o que pode causar efeitos tóxicos no núcleo. A proteína 14-3-3 β ao ser superexpressa, bloqueia a interação das SRPKs com Hsp70 e também com Hsp90 (Zhou et al, 2012). Juntos, estes dados sugerem que as SRPKs são finamente reguladas por complexos heat shock e por membros da família 14-3-3 durante o curso da sinalização por EGF. Estes resultados explicam porque as SRPKs não são totalmente translocadas para o núcleo em células induzidas com EGF.

Apesar das SRPKs serem capazes de fosforilar proteínas SR residentes nos speckles nucleares, é difícil determinar o papel exato das diferentes cinases envolvidas na fosforilação dos fatores de splicing da família SR (Giannakouros et al, 2011; Wang et al, 2004). A fosforilação do domínio RS é um pré-requisito para a montagem do spliceossomo e o splicing em geral. A SRPK1 foi encontrada associada a U1-snRNP, que está envolvido na seleção do sítio de splicing 5' (Kamachi et al, 2002), enquanto SRPK2 é requerida para a formação do complexo U4U6-U5 tri-snRNP, que está envolvido na seleção do sítio de splicing 3' (Mathew et al, 2008). No entanto, experimentos *in vitro* demonstraram que em elevadas concentrações, as SRPKs podem inibir o splicing, sugerindo a necessidade de um balanço entre cinases e fatores de splicing a serem fosforilados.

A interação entre SRPK1a, uma isoforma que possui uma inserção de 171 aminoácidos em seu domínio N-terminal e é similar a SRPK1 na especificidade do substrato e na localização subcelular, e SAFB1 (Scaffold Attachment Factor B1) já havia sido relatada (Nikolakaki et al, 2001). Mais recentemente, foi verificado que SAFB1 estaria de fato inibindo a atividade não só de SRPK1a, mas também de SRPK1 *in vitro*, e que sua região rica em RE (Arginina-Acido Glutâmico) é redundante para a inibição observada. A inibição da atividade cinase é causada pela direta ligação de SAFB1 a SRPK1a e SRPK1. E também

existem evidências para a ligação *in vitro* SAFB2 a estas duas cinases, apesar de que com afinidades diferentes. O complexo SRPK/SAFB está presente no núcleo de células HeLa e que a ativação enzimática da SRPK1 localizada na matriz nuclear esta reprimida (Chen & Sudol, 1995).

As SRPKs também estão envolvidas com a reorganização dos speckles nucleares, que são desfeitos durante a metáfase e remontados conforme a progressão do ciclo celular na mitose (Jang et al, 2008). O que foi proposto é que as SRPKs (e potencialmente membros das famílias Akt e Clk-cinases) podem ter um papel chave, no início da mitose, primeiro mediando o destacamento da heterocromatina periférica da membrana nuclear interna através da fosforilação do domínio RS do LBR (lamin B receptor), um dos principais fatores de ancoramento da cromatina à membrana interna nuclear. E, subsequentemente, a remoção de HP1 (heterochromatin protein 1), um importante componente da heterocromatina interfásica, da cromatina mitótica, conduzindo assim a condensação cromossômica (Giannakouros et al, 2011).

Por outro lado, o acoplamento dos domínios de cromatina ao envelope nuclear resultam na sua inativação transcricional, e as proteínas HP1 são constituintes bem conhecidas da cromatina "silenciada". A translocação nuclear regulada das SRPKs pode contribuir para o reposicionamento e a descondensação de um loci gênico específico, conduzindo assim à ativação da transcrição destes (Giannakouros et al, 2011). Tudo isto demonstra o papel central destas cinases no processo de splicing, controlando a distribuição intracelular dos fatores de splicing nas células interfásicas e a reorganização dos speckles durante a mitose (Jang et al, 2008).

2.3. O envolvimento das SRPKs em diferentes doenças

As proteínas SRPKs também já foram relacionadas à doenças neurodegenerativas, nas quais elas agem desencadeando a progressão do ciclo celular de neurônios diferenciados, promovendo apoptose, inibindo a polimerização de microtúbulos e a alongação axonal (Jang et al, 2009; Hong et al, 2011 e 2012 & Chan & Ye, 2013). Em doenças como o Alzheimer e a isquemia cerebral, SRPK2 é fosforilada por Akt em sua Thr-492, promovendo sua translocação para o núcleo, onde ela fosforila SC35 e então inativa p53, levando a uma up-regulação de ciclina D1, reentrada no ciclo celular e apoptose neuronal (Jang et al, 2009). A apoptose também pode se dar pela translocação da porção N-terminal de SRPK2, clivada por

caspases em seus resíduos de Asp-139 e Asp-403, para o núcleo e interação com VP160, além da condensação de cromatina (Hong, Jang & Ye, 2011).

A inibição destes eventos, se dá pelas proteínas 14-3-3 de duas formas: uma é pela ligação de 14-3-3 a SRPK2, fosforilada por Akt, impedindo sua ação sobre ciclina D1, degradação e clivagem por caspases; a outra é pela fosforilação de BAD e consequente ligação a 14-3-3, inibindo assim a função pró-apoptótica de deste (Jang et al, 2009 & Hong, Jang & Ye, 2011).

A ação das SRPKs sobre a polimerização dos microtúbulos e alongação axonal deficiente, se dá pela fosforilação das proteínas tau em sua Ser-214, suprimindo suas funções. Tau é uma proteína do complexo MAP (microtubule-associated proteins) que age remodelando a rede de microtúbulos, principalmente no axônio neuronal, onde ela é bastante expressa (Black et al, 1996 & Samsonov et al, 2004). Em doenças relacionadas a sua disfunção, tau está hiperfosforilada, redistribuída dos microtúbulos e forma agregados aberrantes nos neurônios (Grundke-Iqbal et al., 1986), que aumentam quando SRPK2 está superexpressa. Os microtúbulos então não são bem organizados, o que resulta na perda de um transporte intracelular efetivo, integridade dos neurônios é afetada e eventualmente a morte neuronal. O esgotamento da expressão de SRPK2 no hipocampo de camundongos APP/PS1, um modelo animal bem estabelecido para Alzheimer (Kurt et al., 2001), reduz a fosforilação de tau e a formação de filamentos helicoidais pareados (Hong et al, 2012). Uma evidência da participação de SRPK2 nestes eventos, é que sua atividade está aumentada nos neurônios de camundongos e pacientes com Alzheimer (Hong et al, 2012).

As proteínas SRPKs também exercem um importante papel na replicação viral e montagem das proteínas do nucleocapsídeo. A montagem do nucleocapsídeo dos vírus da hepatite B (HBV) e do Epstein-Barr vírus (EBV), é dependente da fosforilação de resíduos de serina no domínio C-terminal (CTD) das proteínas do capsídeo, Cp183 e BLRF2, respectivamente. A fosforilação destes sítios pode-se dar tanto por SRPK1 quanto SRPK2 (Daub et al, 2002 e Duarte et al, 2013). Em HBV, a ligação de SRPK2 ao CTD de Cp183 estagna a montagem do nucleocapsídeo, a fim de evitar a formação de partículas virais, sem material genético. A montagem prossegue com a fosforilação das proteínas SR (Chen, Wang & Zlotnick, 2011). Além disso, as SRPKs também estão envolvidas com a replicação de HBV, HIV (vírus da imunodeficiência humana), HCV (vírus da hepatite C) e EBV (Zheng et al, 2005; Fukuhara et al, 2006; Karakama et al, 2010 & Duarte et al, 2013).

Ambas, SRPK1 e SRPK2, podem suprimir a replicação de HBV ao reduzir a eficiência de empacotamento do pgRNA (pregenomic RNA), sem que a formação das partículas do nucleocapsídeo sejam afetadas. Esse efeito supressivo de SRPK1 e SRPK2 na replicação de HBV não pode ser explicado por suas atividades de fosforilação, já que a superexpressão destas cinases não tem efeito detectável na fosforilação das proteínas do nucleocapsídeo de HBV *in vivo* e seus mutantes que perderam a atividade cinase ainda podem suprimir a replicação do DNA de HBV (Zheng et al, 2005). Quanto à replicação do HIV, sabe-se que a expressão do HIV diminui a atividade e a quantidade de proteínas SR. No entanto, a fosforilação de SRp75 por SRPK2, pode aumentar em até 20 vezes a expressão do HIV. O aumento da atividade de SRPK2 regula positivamente a expressão do HIV. Também foi verificado que, o uso de inibidores de SRPK2, como o SRPIN340, suprime a produção não só do HIV, como também de outros vírus, como o de Sindbis em ensaio de placa (Fukuhara et al, 2006) e na inibição da replicação do HCV, suprimindo de uma forma dose-dependente a expressão do seu replicon subgenômico. Este efeito inibitório não está associado a efeitos anti-proliferativos ou citotóxicos nas células hospedeiras (Karakama et al, 2010).

Dessa forma, as SRPKs além de controlarem o splicing alternativo de vários genes envolvidos na replicação celular, surgem como uma alternativa no controle da infecção viral ao serem alvos terapêuticos na inibição da replicação e da encapsulação destes.

2.4. As SRPKs e o câncer

O interesse em SRPKs como alvos terapêuticos no tratamento de câncer, surgiu da observação de que a SRPK1 se mostra altamente expressa em tumores de mama, pâncreas e cólon (Hayes, Carriagan & Miller, 2007), bem como na leucemia aguda de células T induzida pelo vírus-1 da leucemia de células T humana (Hishizawa et al, 2005). Assim, linhagens de células derivadas de tumores da mama, do pâncreas e do cólon, quando tem o gene da SRPK1 inativado, exibem a proliferação celular diminuída, aumentam o potencial apoptótico e a sensibilidade a quimioterápicos comuns como a cisplatina e gemcitabina (Hayes, Carriagan & Miller, 2007).

Estudos anteriores demonstram que as SRPKs são reguladas durante o ciclo celular e, da mesma forma, exercem influência sobre o progresso deste. Mecanismos de sinalização celular induzem a translocação dessas cinases do citoplasma para o núcleo no limite das fases G2-M. A SRPK2, por exemplo, fosforila a proteína SR Acinus, que potencializa a transcrição

de ciclinas A1, envolvidas na maquinaria de regulação do ciclo celular, especialmente na transição das fases G₁-S e G₂-M (Jang et al, 2008). Portanto, estas ciclinas são indiretamente reguladas pelas SRPKs, conseqüentemente, podemos dizer que o ciclo celular é indiretamente regulado por estas cinases.

A inativação de SRPK2 ou Acinus induz forte repressão na proliferação de linhagens de leucemia, levando ao acúmulo de células na fase G₁. Por outro lado, a superexpressão de SRPK2 ou Acinus provoca um proeminente acúmulo de células na fase G₂-M e um decréscimo de células na fase G₁. Estes resultados levam a crer que a SRPK2 e Acinus são elementos chave na regulação do ciclo celular e são essenciais para a proliferação celular. A Acinus além de regular a transcrição de ciclinas, também é integrante do complexo ASAP (apoptosis-associated and splicing-associated protein), que inibe o processamento do RNA e acelera a progressão da morte celular após a indução de apoptose (Jang et al, 2008).

No estudo realizado por Jang et al em 2008, os níveis de expressão de SRPK2 e acinus foram monitorados em linhagens de células leucêmicas e de células da medula óssea leucêmica. A localização subcelular de acinus parece ser predominantemente nuclear em linhagens de células leucêmicas mieloide (CLM) e células leucêmicas linfóide (CLL). Além disto, ela foi mais expressa em CLM e pouco expressa em CLL. Em contraste, os maiores níveis de expressão de SRPK2 foram encontrados em CLL. Nas CLMs os níveis de expressão variaram com os maiores sendo encontrados em NB4 e U-937, moderados em K562 e HL-60 e os menores em HEL e KG₁. Outro destaque é para a localização subcelular de SRPK2 que é predominantemente citoplasmática em CLM, mas parece ser citoplasmática e nuclear em CLL. Isto demonstra que algum mecanismo regulatório alternativo está envolvido na translocação de SRPK2 para dentro do núcleo, o que implicaria no aumento da fosforilação de acinus, aumento da transcrição de ciclina, progressão do ciclo celular e conseqüentemente aumento da proliferação desordenada de células leucêmicas.

A ação das SRPKs no splicing alternativo do fator de crescimento epitelial vascular (VEGF – vascular epithelial growth factor) foi investigada em trabalho de 2010 (Nowak et al, 2010). VEGF é um componente regulador chave na angiogênese fisiológica e patológica. No splicing alternativo de VEGF são geradas duas isoformas principais VEGF₁₆₅ – proximal – pró-angiogênica (Houck et al, 1991) e VEGF_{165b} – distal – anti-angiogênica (Woolard et al, 2004), dependendo do sítio de splicing no exon 8. O uso de IGF-1 (insulin-like growth factor-1), down-regula a expressão de VEGF_{165b} e promove a escolha do sítio proximal, aumentando a expressão da forma pró-angiogênica (Nowak et al, 2008). Este efeito é

revertido quando são utilizados inibidores de SRPK como o SRPIN340, promovendo a escolha do sítio de splicing distal, ou seja, da forma anti-angiogênica. A superexpressão de SRPK1 diminui a expressão da forma anti-angiogênica de VEGF e conseqüentemente a expressão total de VEGF. Já a superexpressão de SRPK2 não afetou a produção VEGF_{165b}, embora tenha reduzido a expressão total de VEGF (Nowak et al, 2010). O papel das SRPKs no controle da expressão das formas pró- e anti- angiogênicas pode ser explorado como estratégia terapêutica num esforço para diminuir a vascularização de tecidos tumorais.

A obtenção de informações inéditas sobre interações proteína-proteína é de alta relevância para o desvendamento dos mecanismos de regulação da atividade de SRPK2, o que contribuirá para o entendimento de seu papel na oncogênese da leucemia e outros tipos de tumores. Tais achados certamente subsidiarão o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o controle de sua atividade anormal.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi identificar novos parceiros de interação da SR cinase SRPK2, através de sua região espaçadora, aqui nominada como S-SRPK2, como forma de entender seus mecanismos de regulação e atividade. Para isso, a região S-SRPK2 foi subclonada no vetor de expressão em leveduras pBTM116K, e o screening de proteínas procedeu pelo método de duplo-híbrido em leveduras com o uso de uma biblioteca de cDNA de leucócitos, sendo encontradas 19 novas interações.

3. METODOLOGIA

3.1. Amplificação da região espaçadora e clonagem em vetor de clonagem

O primeiro passo deste trabalho foi amplificar a região espaçadora (S-SRPK2) a partir do cDNA completo da proteína SRPK2 clonado em plasmídeo de expressão em bactérias pET28a (Tabela 1).

Tabela 1 – Plasmídeos

Plasmídeos	Características
pET 28a	T7 Promoter, His Tag, MCS, lacI, Kan ^r
pGEM	lacZ, Amp ^r
pBTM 116K	ADHI Promoter, LexA BD, MCS, Trp1, Kan ^r
pGAD424	ADHI Promoter, Gal4 AD, MCS, Leu2, Amp ^r
pACT2	ADHI Promoter, Gal4 AD, MCS, Leu2, Amp ^r

A delimitação da região espaçadora foi baseada no trabalho de Wang et al, 1998 e em análises de predição de estrutura de proteínas pelo servidor PSIPRED (Figura 7).

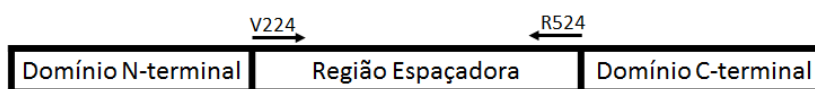


Figura 7 – Delimitação da região espaçadora da proteína SRPK2. A região delimitada foi determinada baseada no trabalho de Wang et al, 1998 e em análises de predição de estrutura de proteínas pelo servidor PSIPRED e abrange os aminoácidos entre a valina 224 e a arginina 524.

Os primers utilizados nesta amplificação foram SSRPK2_BglEco_S e SSRPK2_SalI_AS (Tabela 2).

Tabela 2 – Primers sintetizados para este trabalho

Nome	Sequência	Fabricante
SSRPK2_BglEco_S	5' AGATCTGAATTCGTGGATGATGCATATGTGAGAAG 3'	IDT
SSRPK2_SalI_AS	5' GTCGACCTATCTAATTTTATCTGCATTCCGCG 3'	IDT
5' LexA	5' CGTCAGCAGAGCTTCACCATTG 3'	Invitrogen
ScreeningAmp5'	5' CTATTTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC 3'	Invitrogen
ScreeningAmp3'	5' GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGA 3'	Invitrogen

A amplificação foi processada através de uma reação de polimerase em cadeia (PCR). As amostras foram preparadas em solução de 20 μ L, sendo 5,0 μ L de H₂O MiliQ, 2 μ L de 10X AccuPrime™ PCR Buffer (Invitrogen), 0,8 μ L de MgCl₂ 50 mM (Promega), 5 μ L de dNTPs 2 mM, 1 μ L de cada primer 10 μ M/mL (S – sense e AS – antisense), 0,2 μ L de AccuPrime™ Taq High Fidelity (Invitrogen) e 5 μ L do plasmídeo pET28a/SRPK2. Os ciclos de temperatura da PCR estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Ciclo de temperaturas utilizadas para a amplificação da região espaçadora de S-SRPK2

Ciclo de PCR	
	95°C → 2'
	95°C → 1'
Ciclos	53°C → 1'
	68°C → 1'
Ciclagem: 23 vezes	
	68°C → 10'
	4°C → ∞

A verificação da PCR se deu por eletroforese de DNA em gel de agarose 1% (v/v), acrescido de 1x10⁻⁴% (v/v) de brometo de etídeo. O tampão utilizado na preparação do gel e

na cuba foi o tampão Tris-Acetato-EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) (TAE) 1X (Quadro 1).

Quadro 1 – Tampões e meios

Nome	Componentes
Tampão TAE	Tris-base 8 mM, EDTA 0,1 mM e ácido acético glacial até atingir o pH 8
Tampão Z	Na ₂ HPO ₄ 60 mM, Na ₂ H ₂ PO ₄ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO ₄ 1 mM, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 0,025% (p/v), pH 7
Meio LB	Triptona 1%, Extrato de Leveduras 0,5% e NaCl 1%. Meio sólido: acrescentar Ágar 1,5%
Meio SOB	Triptona 2%, Extrato de Leveduras 0,5%, NaCl 0,058% e KCl 0,02%
Meio SOC	Ao meio SOB acrescentar 4% de Glicose 20% e 4% de MgCl 1M
Meio YPD	Extrato de Leveduras 1%, Peptona 2%, Glicose 2% e Adenina 0,003%. Meio sólido: acrescentar Ágar 2%
Meio SD	Yeast Nitrogen Base (YNB) 0,17%, Glicose 2%, Adenina 200 mg/L, Arginina 200 mg/L, Isoleucina 300 mg/L, Lisina 300 mg/L, Metionina 200 mg/L, Fenilalanina 500 mg/L, Treonina 2000 mg/L, Tirosina 300 mg/L, Valina 1500 mg/L e Uracila 200 mg/L. Meio sólido: acrescentar Ágar 3%

O produto da PCR foi extraído e purificado do gel de agarose com o Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas) e clonado com o kit comercial de clonagem pGEM®-T Easy Vector Systems (Tabela 1).

3.2. Preparação de células termocompetentes para transformação

O próximo passo foi amplificar a quantidade de vetores pGEM/S-SRPK2 em bactéria *Escherichia coli*, linhagem DH 5 α (Tabela 4). A transformação das bactérias se deu por choque térmico, no entanto, antes disso foi preciso preparar as células para se tornarem termocompetentes.

Tabela 4 – Linhagem e genótipo dos microrganismos utilizados neste trabalho

Linhasagens	Genótipo
DH 5 α	endA1 recA1 hsdR17 supE44 gyrA96 thi-1 relA1 _lacU169 (ϕ 80lacZ_M15) Tetr _(mcrA)183 _(mcrCB-hsdSMR-mrr)173
L40	(trp1-901, his3 Δ 200, leu2-3, ade2 LYS2::(lexAop)4-HIS3 URA3::(lexAop)8- lacZ GAL4),

Foram selecionadas três colônias isoladas de *E. coli* DH 5 α , semeadas previamente em meio sólido Luria-Bertani (LB) (Quadro 1), e feito um pré-inóculo em 10mL de meio LB líquido, incubado por 6 horas a 37°C e agitação de 250 rpm. 5 mL deste pré-inóculo foram então transferidos para um erlenmeyer com 125 mL de meio LB líquido, que foi incubado overnight a 18°C e agitação de 150rpm. No dia seguinte, assim que a cultura atingiu a D.O.₆₀₀ 0,55; ela foi transferida para um banho de gelo por 10 minutos. As células foram então centrifugadas em tubos Falcon estéreis de 50 mL a 4°C, 4000 rpm por 10 minutos. Em seguida, as células foram cuidadosamente ressuspendidas em 30 mL de solução TB (guardada na geladeira) e armazenadas em gelo por 10 minutos. Novamente, as células foram centrifugadas a 4°C, 4000 rpm por 10 minutos. O pellet resultante da centrifugação, foi ressuspendido em 8 mL de solução TB e 560 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido), e incubado no gelo por mais 10 minutos. Por fim as células foram aliquotadas em tubo eppendorf (50 μ L por tubo) e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C.

3.3. Transformação das bactérias por choque térmico e extração do DNA plasmidial

Tendo em mãos as células termocompetentes, o vetor pGEM/S-SRPK2 foi adicionado às células de *E. coli* DH 5 α termocompetentes à uma concentração de 50 μ g/mL. Estas células foram incubadas no gelo por 30 minutos e em seguida submetidas ao choque térmico, a 42° C por 60 segundos, retornando imediatamente com a mistura para o gelo. Foram então

adicionados 1 mL de meio LB sem antibiótico às células, que foram incubadas no shaker a 180 rpm, 37°C, por 1,5 horas. Após este período, as células foram centrifugadas a 10000 rpm por 1,5 minutos e concentradas para 100 µL do mesmo meio. Elas foram então semeadas em meio LB sólido acrescido do antibiótico correspondente à resistência do vetor, sempre a concentração de 50 µg/mL. A placa de Petri com o meio LB sólido semeada com as bactérias transformadas, foi mantida em estufa a 37° C por 16 horas.

Desta placa de Petri, foram selecionadas de 3 a 5 colônias isoladas de bactéria, que foram inoculadas separadamente em 5 mL de meio LB líquido contendo o antibiótico apropriado à concentração de 50µg/mL. Os inóculos foram incubados por 14 horas a 37° C, 180 rpm. Deste inóculo foi retirado 1mL e feito estoque a 20% de glicerol armazenado em ultrafreezer -80°C. Outros 1,4 mL do inóculo foram transferidos para tubo eppendorf de 1,5 mL e centrifugados a 10000 rpm por 60 s. O sobrenadante foi descartado e os 1,4 mL de inóculo restantes foram adicionados e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado de células que se formou foi adicionado 200 µL da solução 1 (Tris-HCl 25mM, EDTA 10mM, Glicose 50mM, pH 8) e 5 µL de RNase (10mg/mL) ressuspensando completamente o pellet. Após 5 minutos foram adicionados 200 µL da solução 2 (NaOH 200mM e SDS 1%) ao tubo, e este foi agitado por inversão (6 vezes) e incubado no gelo por outros 5 minutos. Por fim foram adicionados 150 µL da solução 3 (Acetato de Potássio 3 M e pH ajustado para 5,5, com Ácido Acético Glacial) ao tubo, e novamente este foi agitado por inversão e incubado no gelo por 5 minutos.

Após este período, o tubo foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante resultante foi coletado e transferido para um tubo novo. Essa etapa foi repetida mais uma vez. Posteriormente foram adicionados 600 µL de isopropanol ao tubo e este foi novamente agitado por inversão e a solução foi incubada em freezer por 5 minutos e centrifugada a 10000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 100 µL de etanol 70%. A solução foi centrifugada a 10000 rpm por 5 minutos, o etanol descartado e o pellet após completamente seco, foi ressuspensado em 30 µL de água MiliQ autoclavada e estocado a -20 °C.

3.4. Reação de clivagem e clonagem em vetor de expressão em leveduras

Para verificar se o fragmento correspondente a S-SRPK2 foi clonado corretamente em pGEM, foi montada uma reação de clivagem com as enzimas de restrição EcoRI (Promega, 5000 U) e Sall (Promega, 1500 U) utilizando-se 0,5 µL de cada enzima, 5 µL de DNA plasmidial e 2,0 µL de tampão O 10X (Promega). O volume final foi completado para 20,0 µL com água MiliQ autoclavada e a reação foi incubada por 2 horas a 37°C.

A digestão foi analisada por eletroforese de DNA em gel de agarose e a banda correspondente à S-SRPK2 foi extraída e purificada do gel pelo Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas) para ser clonada em vetor de expressão em leveduras pBTM116K (Tabela 1). A reação de ligação consistia em 0,5 µL de DNA plasmidial (pBTM116K linear clivado com EcoRI e Sall), e 5µL do fragmento S-SRPK2, na proporção (1:5), 1,0 µL de tampão de reação 10X (Fermentas - Tris-HCl pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, DTT 1 mM e 25 de polietileno glicol-8000) e 0,5 µL de T4 DNA ligase (Fermentas - 1000 U). O volume foi completado para 10 µL com água MiliQ autoclavada e a reação foi incubada à temperatura de 16°C por 14 horas.

Após este período, o plasmídeo pBTM116K/S-SRPK2 foi inserido e amplificado em *E. coli* DH 5α por choque térmico da mesma forma como descrito em 3.3. Os próximos passos foram a extração plasmidial e além da confirmação de clonagem por digestão, foi feito um sequenciamento pela empresa Myleus Biotechnology, por eletroforese capilar em aparelho ABI3130, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1. para verificar a sequência de nucleotídeos do fragmento S-SRPK2.

3.5. Transformação de leveduras

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* L40 (Tabela 4) foram transformadas com diferentes construções (Tabela 5) para testar a viabilidade de conduzir o duplo-híbrido de leveduras usando pBTM116K/S-SRPK2 como plasmídeo isca.

Tabela 5 – Construções utilizadas como controle nos ensaios para estudo da ativação dos genes repórteres *his3* e *lacZ*

Construções	Controle
pBTM ₁₁₆ K Ø	Negativo
pBTM ₁₁₆ K Ø + pGAD ₄₂₄ Ø	Negativo
pBTM ₁₁₆ K/S-SRPK2	Negativo
pBTM ₁₁₆ K/S-SRPK2 + pGAD ₄₂₄ Ø	Negativo
pBTM ₁₁₆ K/Ki-1/57 + pGAD ₄₂₄ Ø	Negativo
pBTM ₁₁₆ K/Ki-1/57 + pACT ₂ /RACK ₁	Positivo (interação forte) ⁽¹⁾
pBTM ₁₁₆ K/Ki-1/57 + pGAD ₄₂₄ /SFRS ₉	Positivo (interação fraca) ⁽²⁾

Ø: vazio

(1) Nery et al, 2004

(2) Bressan et al, 2009

Uma colônia isolada de *S. cerevisiae* plaqueada em meio YPD sólido (Yeast Extract-Peptide-Dextrose) (Quadro 1), foi inoculada em um pré-inóculo de 5 mL de meio YPD líquido, sendo este submetido à rotação de 180 rpm, 30°C por 14 horas. Após este período, o pré-inóculo foi transferido para 50 mL de YPD líquido, e submetido às mesmas condições descritas anteriormente. Após 3 horas, foram feitas medições em espectrofotômetro até que a cultura atingisse uma D.O.₆₀₀ entre 0,5 e 0,7. Atingida a D.O. ideal, a cultura foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspensionado em água deionizada autoclavada para lavagem das células e retirada do meio de cultura. O passo anterior foi repetido por mais duas vezes, sendo que na última o pellet não foi ressuspensionado em água e sim no mix de transformação. O mix de transformação é composto por 240 µL de PEG (polietilenoglicol) 50%, 36 µL de acetato de lítio 1M, 30 µL de DNA plasmidial e 5 µL de DNA de esperma de salmão (DNA carreador) 10 mg/mL, previamente desnaturado a 95° C por 10 minutos. Após adição do mix de transformação às células, estas foram mantidas em banho-maria a 30°C por 30 minutos e posteriormente a 42° C por 25 minutos. Após este período, todo o conteúdo foi centrifugado a 8000 rpm por um minuto e o pellet ressuspensionado em 1 mL de água deionizada autoclavada para a lavagem das células e retirada total do mix de transformação. O passo anterior foi repetido por mais duas vezes, sendo que na última o pellet foi concentrado para 100 µL e plaqueado em meio seletivo SD (Synthetic Drop-out) apropriado. Meio SD –TRP sólido (Quadro 1) quando a levedura foi transformada somente com o plasmídeo isca (pBTM116K), ou meio sólido SD –TRP –LEU, quando transformado com o plasmídeo isca e o plasmídeo presa (pGAD₄₂₄ ou pACT₂). As placas foram mantidas em estufa a 30°C por 3 dias.

3.6. Primeiro ensaio para estudo da ativação dos genes repórter

3.6.1. his3

O gene *his3* é encontrado no genoma de leveduras *S. cerevisiae* e codifica uma enzima intermediária na via de síntese da histidina chamada imidazol glicerol-fosfato desidratase. O experimento consiste em testar a capacidade dos clones em crescer na ausência de histidina e na presença do inibidor competitivo da imidazol glicerol-fosfato desidratase, o 3AT (3-Amino-1,2,4-triazol). Este crescimento demonstra uma forte ativação da transcrição do gene *his3*.

A ativação do gene repórter *his3* foi monitorada pela capacidade dos clones de leveduras crescerem em meio sólido SD –TRP –HIS (Quadro 1) quando a levedura foi transformada somente com o plasmídeo isca (pBTM116K), ou meio sólido SD –TRP –LEU –HIS, quando transformado com o plasmídeo isca e o plasmídeo presa (pGAD₄₂₄ ou pACT₂) (Tabela 1). O meio sólido SD foi acrescido de concentrações crescentes de 3 AT (0 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM e 50 mM). As placas de Petri foram divididas em 7 setores (correspondentes às construções controles), nos quais, em cada setor foram pingadas 3 gotas de 5 µl de 3 colônias diferentes, mas da mesma construção, em triplicata. Uma colônia isolada foi ressuspensa em 50 µl de água MiliQ autoclavada, e desta solução que foi pipetado os 5 µl do ensaio.

As placas foram mantidas a 30°C por 3 dias e após este período, a ativação do gene repórter *his3* foi monitorada pela capacidade de crescimento em meio sem histidina.

3.6.2. lacZ

Das placas de Petri utilizadas no estudo da ativação do gene repórter *his3*, foi realizado o estudo da ativação do gene repórter *lacZ*. Um papel filtro foi aderido às colônias, agindo como um carimbo. Em seguida, este foi deixado em nitrogênio líquido por 3 minutos. O papel filtro foi então transferido para uma placa de Petri, e umedecido com a solução reveladora (10 ml de tampão Z (Quadro 1), 167 µl de x-Gal 20mg/ml e 27 µl de 2-β-mercaptoetanol puro). A placa de Petri foi levada à estufa 37°C por 4 horas. Colônias capazes

de ativarem o gene repórter lacZ adquiriram coloração azul devido a metabolização do substrato X-Gal pela β -galactosidase, produto do gene repórter.

3.7. Duplo-híbrido de leveduras

O sistema de duplo-híbrido em leveduras é um procedimento utilizado para identificar novas interações proteína-proteína. O sistema consiste em dividir os domínios codificadores do fator de transcrição em dois plasmídeos, um deles codificando para o domínio de ativação e o outro para o domínio de ligação ao DNA. Quando as proteínas que carregam estes domínios interagem entre si, elas reconstituem o fator de transcrição e transativam a transcrição de genes repórteres, normalmente lacZ e his3.

Para a execução do duplo-híbrido, as leveduras *S. cerevisiae* L40 foram co-transformadas com o plasmídeo contendo a proteína isca (pBTM 116 K/S-SRPK2) e com o plasmídeo codificador das proteínas presa (biblioteca de cDNA de leucócitos humanos em pACT2 - Clontech). A transformação procedeu como descrito no item 3.5, com a ressalva que, o volume do mix de transformação foi multiplicado por 30 para aumentar a eficiência de transformação e o conteúdo foi distribuído em 20 placas de 150mm de diâmetro contendo meio sólido SD –TRP –LEU –HIS acrescido de 30mM de 3 AT (3-amino-1,2,4-triazol). Estas foram incubadas em estufa à 30°C por 120 horas. Após este período, as colônias que cresceram foram, então, submetidas à ensaios de ativação dos genes repórteres lacZ e his3.

3.8. Segundo ensaio para estudo da ativação dos genes repórter

3.8.1. lacZ

A análise qualitativa da ativação do gene repórter lacZ foi feita pelo teste do Azul. Em meio sólido, as colônias provenientes do screening foram estriadas sobre uma membrana de nitrocelulose colocada sobre o meio SD –TRP –LEU em placas de Petri, e mantidas em estufa 30°C por 3 dias. Após este período, a membrana de nitrocelulose foi retirada cuidadosamente das placas e mantidas em nitrogênio líquido por 20 segundos. A membrana de nitrocelulose foi então transferida para uma nova placa de Petri, e umedecida com a solução reveladora

(10mL de tampão Z, 167 μ L de X-Gal 20mg/mL e 27 μ L de 2- β -mercaptoetanol puro). A placa de Petri foi levada a estufa 37° C por 2 horas e após este período foi observado quais colônias adquiriram a coloração azulada.

A análise quantitativa da ativação do gene repórter lacZ foi feita pelo ensaio da medida da atividade da β - galactosidase. Os clones provenientes do screening foram crescidos em 5mL de meio líquido SD –TRP –LEU até a D.O._{.600} 0,8 – 1,0. A seguir as culturas foram centrifugadas em tubos Falcon 15mL a 2000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi então descartado e as células ressuspensas em 1mL de tampão Z. O próximo passo foi gotejar 3 gotas de clorofórmio e 2 gotas de SDS 0,1% com pipetas Pasteur e vortexar a velocidade máxima por 10 segundos. As amostras foram então pré-incubadas a 28°C por 5 minutos e em seguida foi iniciada a reação adicionando-se 200 μ L de ONPG 4 mg/mL (ortho-Nitrophenyl- β -galactoside). A reação foi parada quando os controles adquiriram uma coloração amarelo pálido (cerca de 75 minutos) com 500 μ L de Na₂CO₃ 1M. Os restos celulares foram removidos por centrifugação à 2000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um tubo novo de eppendorf de 1,5mL. A D.O. foi novamente aferida, agora na região de 420 nm e a atividade da β -galactoside é expressa em unidades segundo a seguinte expressão:

$$D.O.420$$

$$D.O.600 \times \text{Volume (mL)} \times \text{Tempo (min)}$$

3.8.2. his 3

Os clones provenientes do screening foram crescidos em 5 mL de meio líquido SD –TRP –LEU até a D.O._{.600} 1,0. Destes inóculos foram pipetadas 3 gotas de 2 μ l de um mesmo inóculo em meio sólido SD –TRP –LEU –HIS acrescido de concentrações crescentes de 3 AT (30 mM, 50 mM, 70 mM, e 100 mM). As placas de Petri foram divididas em quadrantes, nos quais, as 3 gotas foram pipetadas, cada quadrante correspondendo a um inóculo. A primeira gota foi proveniente do inóculo de D.O._{.600} 1,0, a segunda foi proveniente deste mesmo inóculo diluído 10 vezes e a terceira o inóculo foi diluído 100 vezes. As placas foram mantidas a 30°C por 3 dias e após este período, a ativação do gene repórter his3 foi monitorada pela tolerância de crescimento em meio sem histidina acrescido de inibidor.

3.9. Extração de DNA plasmidial de leveduras

Os clones que foram selecionados nos testes de ativação dos genes repórteres descritos anteriormente prosseguiram para a extração plasmidial de leveduras. Cada colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio SD –LEU e incubada à 30°C, 200 rpm por 65 horas. Após este período, os inóculos foram centrifugados a 10000 rpm por 3 minutos em tubos eppendorf e o sobrenadante resultante descartado. O pellet foi ressuscitado em 1 mL de Rescue Buffer (5 mL de Tris-Base 1M, 2,5 mL de EDTA 500mM, 150 µL de β-mercaptoetanol, H₂O MiliQ q.s.p), e foram adicionados 200 µL de pérolas de vidro a cada eppendorf, sendo estes vortexados em velocidade máxima por 20 segundos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 10000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante descartado. O próximo passo foi ressuscitar o pellet, juntamente com as pérolas de vidro, em 30 µL de Solução de Lise (1 µL de Zymolyase (Zymo Research) 2000 U, 1 µL de Buffer, 5 µL de RNase 10mg/mL e H₂O MiliQ q.s.p), e incubar a reação no shaker à 30°C, 200 rpm por 1 hora. A seguir, foram adicionados 164 µL de SDS 10%, os tubos vortexados por 20 segundos e incubados à temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente foram adicionados 260 µL de Acetato de Potássio 3M, vortexados por 20 segundos novamente e incubados à temperatura ambiente por outros 5 minutos. As amostras foram então incubadas à -80°C por 30 minutos. O próximo passo foi centrifugar a 10000 rpm por 10 minutos e então transferir o sobrenadante para tubos novos. O passo anterior foi repetido uma vez. Ao novo tubo foram adicionados 600 µL de isopropanol e a solução foi incubada em freezer por 5 minutos e novamente centrifugado a 10000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 100 µL de etanol 70%. A solução foi centrifugada a 10000 rpm por 5 minutos, o etanol descartado e o pellet após completamente seco, foi ressuscitado em 30 µL de água MiliQ autoclavada e estocado a -20 °C.

3.10. Preparação de células eletrocompetentes

O DNA plasmidial extraído dos clones de levedura foi inserido em bactérias *E. coli* DH 5α eletrocompetentes. Com isto foi preciso preparar células eletrocompetentes. De uma placa previamente semeada, foi selecionada uma única colônia isolada de *E. coli* DH 5α e

feito um pré-inóculo em 5 mL de meio SOC (Quadro 1), incubado a 37°C e agitação de 250 rpm overnight. Na manhã seguinte, este pré-inóculo foi vertido em 2 erlenmeyers com 250 mL de meio SOC cada, sem antibiótico. Os erlenmeyers foram mantidos a 37°C e agitação de 250 rpm por cerca de 3 horas até que atingissem a D.O.₆₀₀ entre 0,4 e 0,6 nm. Atingida a D.O. desejada, o conteúdo foi dividido em garrafas de 250mL e centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos, 4 °C. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em H₂O MiliQ autoclavada para lavagem das células. Este passo foi repetido 3 vezes. O próximo passo foi concentrar todo o conteúdo em uma única garrafa e ressuscitar o pellet em 50 mL de glicerol 10% frio e estéril (mantê-lo no gelo por todo o tempo). Após centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos, 4 °C, o sobrenadante foi descartado imediatamente para evitar perda de células. Este passo também foi repetido 3 vezes. Por fim, o pellet total foi transferido para um Falcon de 50mL e ressuscitado em 1 mL de glicerol 10% gelado. As células foram aliqüotadas em tubos eppendorf, 50 µL cada e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C.

3.11. Transformação por eletroporação

Os vetores dos clones extraídos na etapa anterior foi adicionado às células de *E. coli* DH 5α por eletroporação à uma concentração de 50µg/mL. A solução vetor mais células foi transferida para cubetas de eletroporação de 0,1 mm de gap mantidas em gelo até o momento da eletroporação. A eletroporação se deu em eletroporador utilizando-se uma corrente de 1800 W. A seguir as cubetas foram retornadas ao gelo e as células em seu interior, diluídas em 1 mL de meio LB sem antibiótico. Essa solução foi transferida para tubos eppendorf e mantidas em um shaker a 180rpm, 37° C, por 1,5 horas. Após este período, as células foram centrifugadas a 10000 rpm por 1,5 minutos e concentradas para 100 µL do mesmo meio, sendo semeadas em meio LB sólido acrescido de ampicilina 50µg/mL, porque queríamos selecionar apenas os plasmídeos pACT₂ com o cDNA da biblioteca de leucócitos. As placas foram mantidas em estufa a 37° C por cerca de 20 horas.

3.12. Extração plasmidial, amplificação do cDNA da biblioteca de leucócitos e confirmação por sequenciamento

A extração plasmidial ocorreu como em 3.3. Para verificar a presença do cDNA da biblioteca de leucócitos nos plasmídeos extraídos, estes foram preparados para amplificação por PCR em solução da seguinte maneira: 11,75 μL de H_2O , 2 μL de 10X Kapa Taq Buffer A (Kapa Biosystems), 1 μL de MgCl_2 25mM (Kapa Biosystems), 2 μL de dNTPs 2mM, 1 μL de cada primer 10 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ (ScreeningAmp5' e ScreeningAmp3') (Tabela 2), 0,25 μL de Kapa Taq DNA Polymerase (Kapa Biosystems) e 1 μL de DNA plasmidial, totalizando 20 μL de reação. O ciclo de temperaturas utilizadas estão descrita na Tabela 6.

Tabela 6 - Ciclo de temperaturas utilizadas para a amplificação dos clones.

Ciclo de PCR	
	95°C → 2'
	95°C → 1'
Ciclos	58°C → 1'
	72°C → 1'
	Ciclagem: 23 vezes
	72°C → 10'
	4°C → ∞

Finalmente as amostras foram preparadas e mandadas para sequenciamento para identificação dos clones selecionados. O sequenciamento foi processado pela empresa Myleus Biotechnology, por eletroforese capilar em aparelho ABI3130, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1.

4. RESULTADOS

4.1. Amplificação da região espaçadora e clonagem em vetor de expressão em leveduras

Para amplificação da região espaçadora da proteína SRPK2, nominada neste trabalho como região S-SRPK2, foi utilizado como molde o cDNA completo da proteína SRPK2 previamente clonado no vetor de expressão em bactérias pET28a. A região amplificada foi definida baseada no trabalho de Wang et al. 1998 e em análises de predição de estruturas de proteínas pelo servidor PSIPRED. Os primers utilizados na amplificação foram SSRPK2_BglEco_S e SSRPK2_SalI_AS descritos na Tabela 2. A região amplificada tem 300 aminoácidos (V224-R524), sendo o produto resultante da reação de PCR de 906pb. A reação foi processada como descrito em 3.1. e o fragmento amplificado pode ser observado na figura 8 abaixo:



Figura 8 – PCR de amplificação da região S-SRPK2. Gel de agarose do produto gerado pela PCR.

O fragmento S-SRPK2 foi purificado do gel e clonado em vetor de clonagem pGEM®-T Easy Vector (Promega). A seguir, o vetor já ligado ao fragmento, pGEM/S-SRPK2, foi inserido e amplificado em bactérias *E. coli* DH5 α termocompetentes pelo método da transformação por choque térmico.

. O próximo passo foi fazer a extração do DNA plasmidial e proceder a confirmação da clonagem, feita através de uma clivagem para simples verificação da presença do fragmento no plasmídeo, como pode ser visto na figura 9.

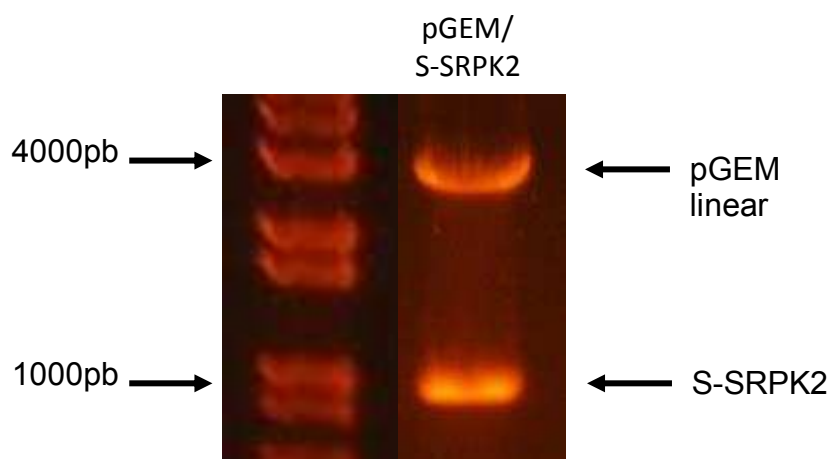


Figura 9 – Reação de clivagem do pGEM®-T Easy. Gel de agarose da clivagem do plasmídeo pGEM®-T Easy/S-SRPK2.

Confirmada a clonagem do fragmento S-SRPK2 em pGEM®-T Easy, o próximo passo foi proceder a subclonagem do fragmento em plasmídeo de expressão em leveduras pBTM 116K e novamente aos protocolos descritos acima: transformação e amplificação do plasmídeo em *E. coli* DH5 α termocompetentes, extração do DNA plasmidial e confirmação da clonagem por clivagem. Também foi adicionada uma etapa de confirmação da clonagem por sequenciamento para verificar a correta sequência de nucleotídeos do fragmento S-SRPK2. Este foi processado utilizando os primers 5' LexA e SSRPK2_SalI_AS descritos na Tabela 2.

4.2. Testes de transativação

Assim que foi obtido o clone pBTM 116K/S-SRPK2, o próximo passo foi transformar as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* cepa L40 com as combinações de plasmídeos controle descritos na Tabela 5, para verificar se os plasmídeos a serem usados na triagem de proteínas transativavam a transcrição dos genes repórteres *his3* e *lacZ*.

O primeiro teste realizado foi quanto a transativação do gene repórter *his3*. Quando o meio não foi acrescido de 3AT, observou-se um nítido crescimento de todas as colônias, transformadas com os diversos tipos de controle. Contudo, ao aumentamos a concentração de 3 AT (5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 50 mM), o crescimento dos clones transformados com os controles negativos e com o controle positivo de interação fraca diminuiu, enquanto que

aqueles transformados com o controle positivo de interação forte não diminuiu. No entanto, aqueles que estavam transformados com o plasmídeo contendo a região S-SRPK2, também não diminuíram seus crescimentos. O crescimento do clone contendo a região S-SRPK2 só foi afetado com a co-transformação do plasmídeo presa, pGAD₄₂₄ Ø e com concentrações acima de 30mM de 3AT. Os resultados deste ensaio podem ser vistos no Quadro A1, Apêndice A.

O segundo teste realizado foi o ensaio de transativação do gene repórter lacZ. Os resultados obtidos neste teste foram coerentes com aqueles visto no teste de transativação do gene his3. O controle positivo de forte interação apresentou coloração intensa mesmo em altas concentrações de 3AT, demonstrando que é capaz de transativar a expressão de lacZ. Enquanto que o controle positivo de fraca interação perdeu coloração após um leve aumento na concentração de 3 AT (a partir de 10mM). Os clones de controle negativo não apresentaram coloração demonstrando que não são transativados. No entanto, o controle negativo contendo o plasmídeo que codifica para a S-SRPK2, apresentou intensa coloração azul mesmo em altas concentrações de 3AT. Este efeito foi amenizado quando combinado com o plasmídeo presa, pGAD₄₂₄ Ø, em concentrações acima de 20mM de 3AT. Os resultados deste ensaio podem ser visualizados no Quadro A2, Apêndice A.

Os resultados que obtivemos nos testes preliminares de transativação dos genes repórteres com a construção pBTM116K/S-SRPK2 foram desfavoráveis a sua utilização no screening de proteínas. As leveduras transformadas com este plasmídeo apresentavam crescimento mesmo em altas concentrações de 3AT, demonstrando uma transativação do gene repórter his3 e coloração intensamente azul nos testes de transativação do gene repórter lacZ. No entanto, quando combinávamos a transformação de pBTM116K/S-SRPK2 com o plasmídeo presa pGAD₄₂₄ Ø e mais uma concentração de 30 mM de 3AT, pudemos assegurar a inibição da transativação dos genes repórteres, tanto o his3 quanto o lacZ. Com estes dados em mãos e após intensa discussão e estudos, tivemos a segurança de prosseguir com o screening de proteínas pelo método de duplo-híbrido em leveduras.

4.3. Screening de proteínas pelo método de duplo-híbrido em leveduras e confirmação dos clones

O screening foi executado exatamente como descrito em 3.7. No total, foram contabilizadas 119 colônias que prosseguiram para os ensaios de ativação dos genes

repórteres, lac Z e his3. O primeiro teste realizado foi a avaliação qualitativa da ativação do gene repórter lacZ. Dos 119 clones iniciais, 112 cresceram sob a membrana de nitrocelulose e 73 apresentaram coloração azulada. O próximo teste foi a avaliação quantitativa da ativação do gene repórter lacZ. Dos 85 clones testados, 9 foram eliminados. Por fim, a prototrofia a HIS foi conduzida com 79 clones. Os resultados destes testes podem ser verificados no Apêndice B.

Com estes resultados em mãos foram selecionados 68 clones que prosseguiram para a extração de DNA plasmidial de leveduras. Este DNA plasmidial obtido foi utilizado para transformação de bactérias por eletroporação. Por fim, o DNA plasmidial foi novamente extraído das bactérias e preparado para sequenciamento. O sequenciamento foi processado utilizando os primers ScreeningAmp5' e ScreeningAmp3' descritos na tabela 2.

Estas sequências foram analisadas pelo programa Blast, disponível no site da NCBI. Dentre as sequências, aquelas que apresentavam sequência de DNA codificante (CDS - Coding DNA Sequence) clonada, foram agrupadas no Quadro 2.

Quadro 2 – Clones que interagem com a região espaçadora da proteína SRPK2

N° do clone	Nome da sequência/ ID da sequência	Intervalo de nucleotídeos clonado, CDS da proteína e região clonada	Nome da proteína (ID do gene)	Sigla	Função atribuída	Referências
S1	Homo sapiens isolate 1933900 mitochondrion/ JX153171.1	7848-8293 7585-8268 Core e C-terminal	Cytochrome c oxidase subunit II (4513)	COX2	Transferência de elétrons do citocromo c para a subunidade catalítica 1.	Capaldi et al, 1983; Garcia-Horsman et al, 1994 e Silkjaer et al, 2013
S15	PREDICTED: Homo sapiens major histocompatibility complex, class I, B (HLA-B), transcript variant X2, mRNA/ XM_005275377.1	558-1395 370-1458 Core	Major histocompatibility complex, class I, B (3106)	HLA-B	Apresentação de antígenos derivados do lúmen do retículo endoplasmático (sistema imune)	Rizvi et al, 2014
S18	Homo sapiens Smad nuclear interacting protein 1(SNIP1), mRNA/ NM_024700.3	117-659 116-1306 N-terminal	Smad nuclear interacting protein 1 (79753)	SNIP1	Coativador transcricional. Aumenta a atividade de c-Myc e inibe as vias de TGF- β e NF-kB. Regula a estabilidade do mRNA de ciclina D1, proliferação celular e câncer.	Kim et al, 2000 e 2001; Roche et al, 2004 e Fujii et al, 2006
S26	Homo sapiens ribosomal protein S20, mRNA (cDNA clone MGC:102930 IMAGE:30386230), complete cds/ BC087850.1	1-507 94-453 Proteína inteira	Ribosomal protein S20 (6224)	RPS20	Proteína ribossomal componente da subunidade 40S do ribossomo.	Daftuar et al, 2013
S28	Homo sapiens selectin L (SELL), transcript variant 1, mRNA/ NM_000655.4	107-997 166-1323	Selectin L (6402)	SELL	Molécula de adesão de leucócitos. Atua na migração para órgãos linfoides secundários e sítios de	Bevilacqua et al, 1991 e Kadono et al, 2002

		N-terminal			inflamação.	
S31	Homo sapiens thymosin beta 4, X-linked (TMSB4X), mRNA/ NM_021109.3	30-628 79-213 Proteína inteira	Thymosin beta 4, X-linked (7114)	TMSB4 X	Proteína sequestradora de actina, regulando sua polimerização. Envolvida na proliferação, migração e diferenciação celular.	Cenni et al, 2003; Sosne et al, 2004 e Crockford et al, 2010
S35	Homo sapiens EF-hand domain family, member D2 (EFHD2), mRNA/ NM_024329.5	56-889 78-800 Proteína inteira	EF-hand domain family, member D2 (79180)	EFHD2	Regula o acesso de cofilina aos filamentos de F-actina	Huh et al, 2013
S46	Homo sapiens ribosomal protein S27 pseudogene 3 (RPS27P3) on chromosome 12/ NG_005391.3	124-459 101-446 Core e C-terminal	Ribosomal protein S27 pseudogene 3 (654365)	RPS27P3	Pode ser uma componente da subunidade ribossomal 40S.	Balasubramanian et al, 2009 e Xiong et al, 2011
S48	PREDICTED: Homo sapiens SUN domain containing ossification factor (SUCO), transcript variant X2, mRNA/ XM_005245251.2	134-702 400-3678 N-terminal	SUN domain containing ossification factor (51430)	SUCO	Sem função reconhecida. Codifica uma proteína transmembrana putativa.	Røsok et al, 2000
S53	Homo sapiens nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin) (NPM1), transcript variant 1, mRNA/ NM_002520.6	165-1039 246-1130 N-terminal e core	Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin) (4869)	NPM1	Chaperona envolvida no remodelamento da cromatina, mitose, reparação do DNA, replicação e transcrição. Função na biogênese de ribossomos e regulação da via de ARF/p53 e de SUMO. Inibição de DNases ativada por caspase e previne	Gjerset 2006, Lee et al, 2008, Yun et al, 2008, Lindström 2011 e Federici & Falini, 2013

					apoptose.	
S55	Homo sapiens N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase, gamma subunit (GNPTG), mRNA/ NM_032520.4	62-941 68-985 N-terminal e core	N-acetylglucosamine -1-phosphate transferase, gamma subunit (84572)	GNPTG	Codifica a subunidade γ do complexo N-acetilglicosamina-1-fosfotransferase.	Qian et al, 2010
S57.2	Homo sapiens lymphocyte antigen 86 (LY86), mRNA/ NM_004271.3	3-867 35-523 Proteína inteira	Lymphocyte antigen 86 (9450)	LY86 (MD-1)	Associa-se à RP105 e regula sua expressão na superfície de células B. Regulação da ativação da imunidade inata de monócitos.	Miura et al, 1998 e Begum et al, 1999
S68	Homo sapiens spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1 (SAT1), transcript variant 1, mRNA/ NM_002970.3	31-895 195-710 Proteína inteira	Spermidine/ spermine N1-acetyltransferase 1 (6303)	SAT 1	Catalisa a acetilação de espermidina e espermina, e está envolvida na regulação da concentração intracelular de poliaminas e o seu transporte para fora das células.	Casero et al, 1991 e Perez-Leal et al, 2012
S72	Homo sapiens solute carrier family 12 (potassium/chloride transporter), member 4 (SLC12A4), transcript variant 5, mRNA/ NM_001145964.1	3016-3781 105-3269 C-terminal	Solute carrier family 12 (potassium/ chloride transporter), member 4 (6560)	SLC12A 4	Media o movimento acoplado de íons de potássio e cloreto através da membrana plasmática.	Hebert et al, 2004
S73	Homo sapiens cDNA FLJ75933 complete cds, highly similar to Homo sapiens zinc finger protein 24 (KOX 17) (ZNF24), mRNA/ AK291246.1	104-835 171-1277 N-terminal e core	Zinc finger protein 24 (7572)	ZNF24	Controle do desenvolvimento da expressão de genes	Thiesen et al, 1990 e Rousseau-Merck et al, 1991
S80	Homo sapiens cDNA FLJ75197 complete cds, highly similar to Homo	93-948 400-2694	Transient receptor potential cation channel,	TRPV2	Codifica um canal iônico que é ativado a altas temperaturas acima	Benham, Gunthorpe &

	sapiens transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 2, mRNA/ AK289705.1	N-terminal	subfamily V, member 2 (51393)		de 52°C. Esta proteína deve estar envolvida na transdução de respostas de calor à alta temperatura nos gânglios sensoriais.	Davis, 2003
S96	Homo sapiens cDNA, FLJ92222, Homo sapiens ribosomal protein, large P2 (RPLP2), mRNA/ AK311954.1	16-333 74-421 N-terminal e core	Ribosomal protein, large, P2 (6181)	RPLP2	Codifica uma fosfoproteína ribossomal que é um componente da subunidade 60S. Participa do passo de alongação da síntese de proteínas.	Gardner-Thorpe et al, 2004
S101	Homo sapiens CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain (CD74), transcript variant 2, mRNA/ NM_004355.3	200-1068 188-886 Core e C-terminal	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain (972)	CD74	Regula a apresentação de antígenos para resposta imune. Receptor de superfície celular para citocinas MIF (Macrophage migration inhibitory factor) que inicia a via de sobrevivência e proliferação celular. Interage com APP (amyloid precursor protein) e suprime a produção de amiloide β (Abeta).	Kudo et al, 1985 e Calandra & Roger, 2003
S102	Homo sapiens lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin), mRNA (cDNA clone MGC:831 IMAGE:3143290), complete cds/ BC007673.1	1424-1999 77-1960 C-terminal	Lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin) (3936)	CP1	Atua na polimerização de actina e migração celular.	Klemke et al, 2007 e Freeley et al, 2012
S106	PREDICTED: Homo sapiens major histocompatibility complex, class I,	739-1615	Major histocompatibility complex, class I, B	HLA-B	Apresentação de antígenos derivados do lúmen do retículo	Rizvi et al, 2014

	B (HLA-B), transcript variant X1, mRNA/ XM_005275535.2	34-1251 C-terminal	(3106)		endoplasmático (sistema imune)	
--	---	-----------------------	--------	--	--------------------------------	--

As demais, cuja região clonada não é codificante, foram agrupadas no quadro C1, no Apêndice C.

5. DISCUSSÃO

5.1. Interações proteicas relacionadas a vias de migração, diferenciação, proliferação, sobrevivência celular e angiogênese

5.1.1. T β 4

A primeira proteína descrita é proveniente do clone 31, TMSB4X Thymosin beta 4, X-linked, também chamada FX, TB4X, PTMB4 e TMSB4. Neste trabalho ela será tratada por T β 4 para meios de simplificação. T β 4 é uma proteína sequestradora de G-actina que exerce função na regulação da polimerização de F-actina. Ela também está envolvida na proliferação celular, migração e diferenciação, angiogênese, sobrevivência celular, modulação de citocinas, quimiocinas e proteases específicas, up-regulação de moléculas da matriz e expressão de genes, e down-regulação da maioria dos fatores de transcrição nuclear. Quando liberada no meio extracelular, seja por secreção, lise ou necrose, exerce uma segunda função reparando e regenerando tecidos danificados (Crockford et al, 2010). O gene que codifica esta proteína está localizado no cromossomo X e escapa à inativação deste, ele também possui um homólogo no cromossomo Y.

Em humanos, a T β 4 é um polipeptídeo de 43 resíduos, que está majoritariamente desestruturado em solução aquosa. Com algumas conformações α hélice preferencialmente observadas. No entanto, a interação com G-actina induz o dobramento de T β 4 e a formação estruturada de α hélices N- e C-terminais ligadas por um loop flexível (Crockford et al, 2010 e Mannherz & Hannappel, 2009). A localização celular de T β 4 é citoplasmática difusa, ocasionalmente, com uma aparência pontilhada ao longo das fibras de estresse contendo actina. Além disso, T β 4 também é encontrada dentro do núcleo da célula e na membrana nuclear (Cha et al, 2003).

A maioria das funções descritas acima, mantêm uma relação estreita com a via de sinalização desencadeada pelo complexo T β 4-PINCH-ILK. Este complexo é ativado por PI3K, assim como Akt (Bock-Marquette et al, 2004). A subunidade α -parvin do complexo T β 4-PINCH-ILK estimula a translocação de Akt do citoplasma para a membrana (Fukuda et al, 2003), onde ela será duplamente fosforilada por PDK1 em Thr-308 e por mTORC2 em

Ser-473 (Figura 10). Akt está envolvida em diversas vias de sinalização celular, dentre elas migração, diferenciação, proliferação e sobrevivência celular.

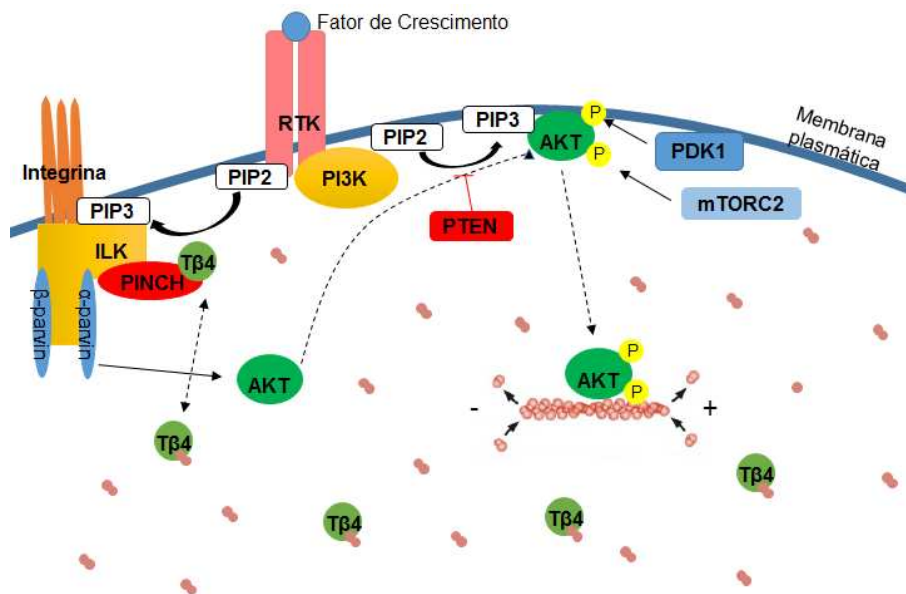


Figura 10 – Representação esquemática da via de sinalização do complexo Tβ4/PINCH/ILK na polimerização de actina. Tβ4 é uma proteína sequestradora de G-actina, no entanto quando complexada com PINCH e ILK, estimula a polimerização de F-actina. PI3K ativa o complexo Tβ4/PINCH/ILK e a cinase Akt na membrana celular. A subunidade α-parvin estimula a translocação de Akt para a membrana onde ela será duplamente fosforilada por PDK1 e mTORC2. Fosforilada, Akt interage diretamente com F-actina, promovendo sua polimerização.

Acredita-se que o papel de Tβ4 nestes eventos esteja ligado ao fato de que ela promove um equilíbrio dinâmico entre G- e F-actina, essencial para a rápida reorganização do citoesqueleto. Quando não complexada com PINCH e ILK, Tβ4 estaria sequestrando G-actina e evitando a fosforilação de Akt. Ao se complexar com PINCH e ILK, Tβ4 libera G-actina e promove a fosforilação de Akt. Proteína esta que interage com F-actina através de seu domínio N-terminal PH (Pleckstrin Homology), agindo em sua polimerização (Cenni et al, 2003 e Crockford et al, 2010).

Não foi encontrada na literatura nenhum relato da interação direta entre Tβ4 e SRPK2. No entanto, na comunicação feita ao Journal of Cell Science por Loh e colaboradores em 2012, Loh fala do papel essencial das SRPKs na formação do cariossomo e na montagem dos microtúbulos em fusos nos oócitos de *Drosophila*. A perda de SRPK afeta severamente a

montagem dos microtúbulos em fusos acentrossomais nos oócitos maduros e subsequentemente, a bi-orientação e a segregação dos cromossomos meióticos também foi defectiva. O que nos leva a crer que a interação entre T β 4 e SRPK2 pode estar relacionada ao controle do citoesqueleto, seja ele na migração, diferenciação ou proliferação celular.

A migração celular também é influenciada por T β 4 no nível do gene através da up-regulação da expressão de laminina-5 (Sosne et al, 2004). Laminina-5 não é somente um componente dos filamentos de ancoramento localizado na membrana basal de regiões como a pele, córnea, conjuntiva e outros tecidos, mas também uma proteína da membrana basal sub-epitelial única que se acredita ser um dos melhores ligantes para adesão de queratinócitos e migração (Sosne et al, 2004; Hormia et al, 1995 e Larjava et al, 1993).

Com relação a sobrevivência celular, Akt também é conhecida como cinase de sobrevivência por atuar regulando diretamente a sobrevivência celular: BAD, Caspase-9 e SAPK, por regular a transcrição de genes que atuam na sobrevivência celular: FoxO Forkhead, NF- κ B, Mdm2, CREB e YAP e também na regulação metabólica da sobrevivência celular (Song, Ouyang & Bao 2005). T β 4 por sua vez atua prevenindo a apoptose diminuindo alterações mitocondriais de dano e a liberação do citocromo c, aumentando a expressão de bcl-2 e diminuindo a ativação de caspases. T β 4 também reduz a inflamação e inibe o influxo e adesão de células inflamatórias, down-regula mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas) e reduz a infiltração de células inflamatórias (Crockford et al, 2010) (Figura 11).

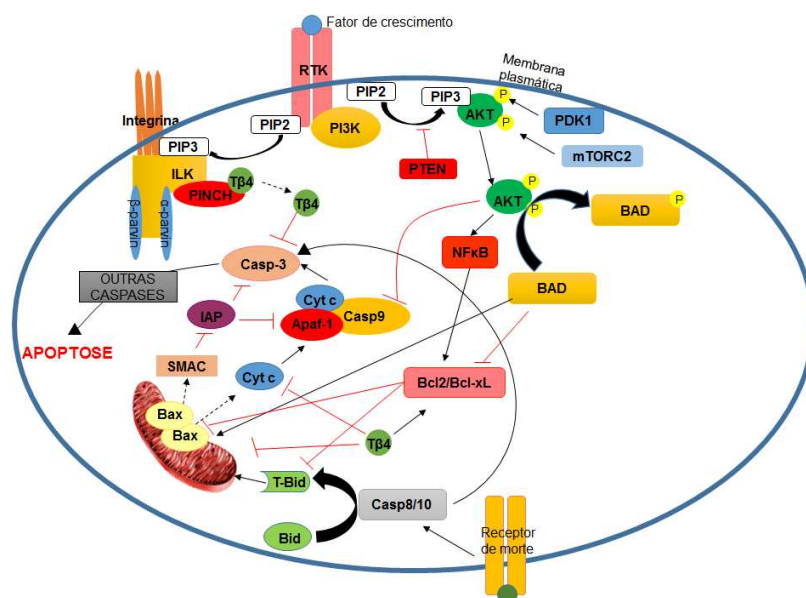


Figura 11 – Representação esquemática das vias anti-apoptóticas envolvendo AKT e T β 4. Akt atua inibindo BAD e o complexo Apaf-1/Casp9/Cyt-c e estimulando a transcrição de NF- κ B. T β 4 por sua vez, atua diminuindo alterações mitocondriais de dano e a liberação do citocromo c, aumentando a expressão de bcl-2 e diminuindo a ativação de caspases.

As SRPKs também já foram relacionadas a sobrevivência celular. No trabalho de Hayes e seus colaboradores em 2006, eles observaram que a down-regulação de SRPK1 por siRNA, em linhagens de células tumorais pancreáticas, diminuiu a capacidade proliferativa e aumentou o potencial apoptótico de uma maneira dose-dependente. A clivagem de SRPK2 por caspases induzindo apoptose já foi relatada em trabalhos anteriores (Kamachi et al, 2002; Jang et al, 2008 e 2009), e em 2011, foi demonstrado que SRPK2 quando clivada por caspase-3 em suas Asp-139 e Asp-403, a porção N-terminal se transloca para o núcleo e promove a apoptose induzida por VP16. A fosforilação de SRPK2 por Akt previne sua clivagem por caspases (Hong, Jang & Ye, 2011). Interessantemente, a inibição de caspase-3 por T β 4 também já foi relatada (Moon, Song & Yang, 2007), o que nos faz acreditar que T β 4 e SRPK2 podem estar interagindo em vias anti-apoptóticas que visam a sobrevivência celular.

Esta mesma via, PI3K/T β 4-PINCH-ILK/Akt, também controla a transcrição do VEGF que age na angiogênese (Tan et al., 2004) (Figura 12). A subunidade do complexo T β 4-PINCH-ILK, β -parvin, intermedia a transmissão do sinal de ILK para Akt, controlando o fluxo de sinais e inibindo a superativação desta via. Quando β -parvin é inibido, a via fica superativada levando a uma transmissão descontrolada dos sinais para os fatores downstream. A superativação da transcrição de VEGF é uma das características primárias de um tumor, já que a vascularização é importante para o transporte de nutrientes e oxigênio. A atividade de ILK também é estimulada por VEGF e outros fatores de crescimento, assim como a adesão celular a matriz extracelular (Kimura et al, 2010), o que leva a um ciclo de retroalimentação positiva.

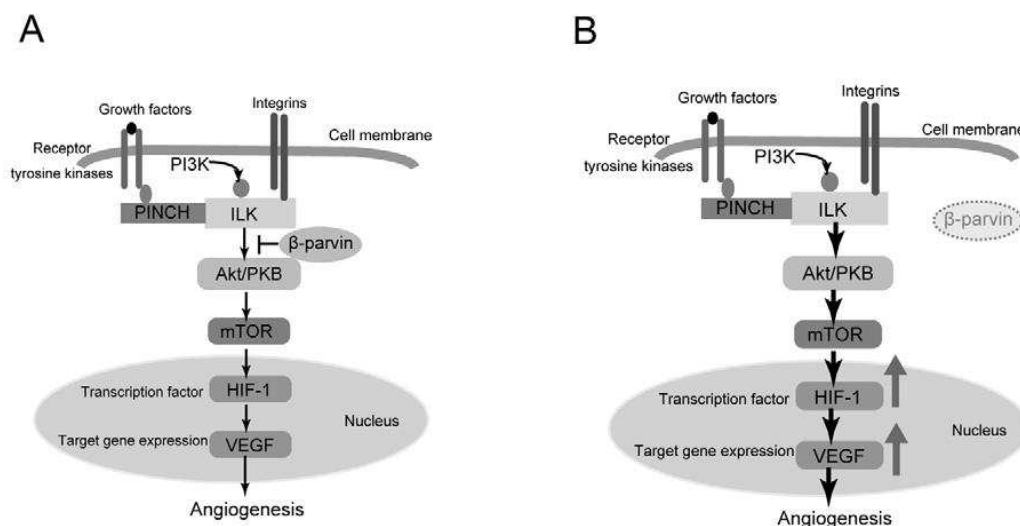


Figura 12 – Representação esquemática do papel de β -parvin na via de sinalização de ILK-Akt/PKB. (A) Estado normal e fisiológico. ParvB deve agir como modulador para prevenir a transmissão de excesso de sinais. (B) Estado de esgotamento de ParvB. Sem a regulação de ParvB, sinais em excesso devem ser transmitidos de uma maneira descontrolada para os alvos downstream. Figura retirada de Kimura M, Murakami T, Kizaka-Kondoh S, Itoh M, Yamamoto K, Hojo Y, Takano M, Kario K, Shimada K & Kobayashi E 2009. Functional molecular imaging of ILK-mediated Akt/PKB signaling cascades and the associated role of β -parvin. *Journal of Cell Science* 123: 747-755

5.1.2. Swiprosin-1

A segunda proteína envolvida em vias de migração celular proveniente do screening com a região espaçadora de SRPK2, veio do clone 35. EFHD2 EF-hand domain family member D2 é mais conhecida como swiprosin-1. O domínio EF-hand consiste em um motivo estrutural hélice-volta-hélice, no qual íons Ca^{2+} se ligam. Este domínio estrutural também está presente na proteína de sinalização calmodulina e na proteína muscular troponina-C. A estrutura secundária de swiprosin-1 inclui regiões desordenadas na extremidade N-terminal, seguido de potenciais locais de ligação de domínio SH3 (Kroczeck et al, 2010), dois domínios EF-hand e um domínio coiled-coil no C-terminal (Dütting, Brachs & Mielenz, 2011).

Swiprosin-1 é encontrada em protuberâncias da membrana do tipo microviloso e lamelipodia, juntamente com a actina e proteínas ligadas a mesma. A superexpressão de swiprosin-1 aumenta a formação de lamelipodia e espalhamento celular, enquanto o knockdown mostra redução no espalhamento e na migração celular (Kwon et al, 2013).

A função principal de swiprosin-1 é regular o acesso de cofilina aos filamentos de F-actina. A cofilina é uma proteína de ligação à actina que despolimeriza seus microfilamentos. Ela cliva e despolimeriza a extremidade (-) impedindo a remontagem, por consequência, cria mais extremidades (+) nos fragmentos de filamentos. Quando não fosforilada em sua Ser-183 e na presença de Ca^{2+} , swiprosin-1 promove o agrupamento dos filamentos de F-actina impedindo o acesso da cofilina a eles (Huh et al, 2013). A deleção dos motivos EF-hand reduz parcialmente esta atividade. O Ca^{2+} também é responsável por induzir a dimerização de swiprosin-1 em seu domínio coiled-coil. Além dos motivos EF-hand, a região rica em lisina (Lys) do domínio coiled-coil também é essencial para regulação da atividade de agregação de F-actina (Kwon et al, 2013).

Swiprosin-1 interage diretamente com F-actina, mas não promove polimerização através do complexo Arp2/3, responsável por iniciar a ramificação e polimerização de actina. Porém, ela foi efetiva na inibição da sua despolimerização mediada por cofilina em uma dose-dependente. No entanto, não foram encontradas interações endógenas entre swiprosin-1 e cofilina. Parece que swiprosin-1 age bloqueando o acesso da cofilina à F-actina, mas este mecanismo ainda não é bem esclarecido. Apenas sabe-se que a atividade de swiprosin-1 é dependente de seu estado de fosforilação na Ser-183 (Figura13). Quando EGF (Epidermal Growth Fator) induz a fosforilação de swiprosin-1 na Ser-183, inibe o agrupamento de F-actina sem que swiprosin-1 perca afinidade por esta, mas permitindo o acesso da cofilina aos filamentos, resultando em sua despolimerização e/ou clivagem (Huh et al, 2013) (Figura 14).

Serine predictions				
Name	Pos	Context	Score	Pred
Sequence	11	ATKLSRRLQ	0.092	.
Sequence	50	EALGSADCE	0.031	.
Sequence	56	DCELSAKLL	0.508	*S*
Sequence	74	GEPQSPSRR	0.985	*S*
Sequence	76	PQSPSRRVF	0.057	.
Sequence	90	FKEFSRKQI	0.955	*S*
Sequence	146	EDFDSKLSF	0.212	.
Sequence	149	DSKLSFREF	0.992	*S*
Sequence	169	LQEDSGLCV	0.008	.
Sequence	178	LARLSEIDV	0.990	*S*
Sequence	183	EIDVSSEGV	0.951	*S*
Sequence	184	IDVSSEGVK	0.076	.
Sequence	192	KGAKSFFEA	0.980	*S*
Sequence	204	AINVSSRFE	0.216	.
Sequence	205	INVSSRFEE	0.855	*S*
Sequence	237	KELQSTFK-	0.034	.

Figura 13 – Predição dos sítios de fosforilação de swiprosin-1. Análise feita pelo servidor Netphos 2.0.

É importante destacar que a ativação da via PI3K/AKT/SRPK2 também é induzida por EGF (Zhou et al, 2012). O que nos leva a supor que o sinal de fosforilação de swiprosin-1 pode estar passando por esta via, e que swiprosin-1, que possui vários sítios de fosforilação SSR, pode estar sendo fosforilada por SRPK2.

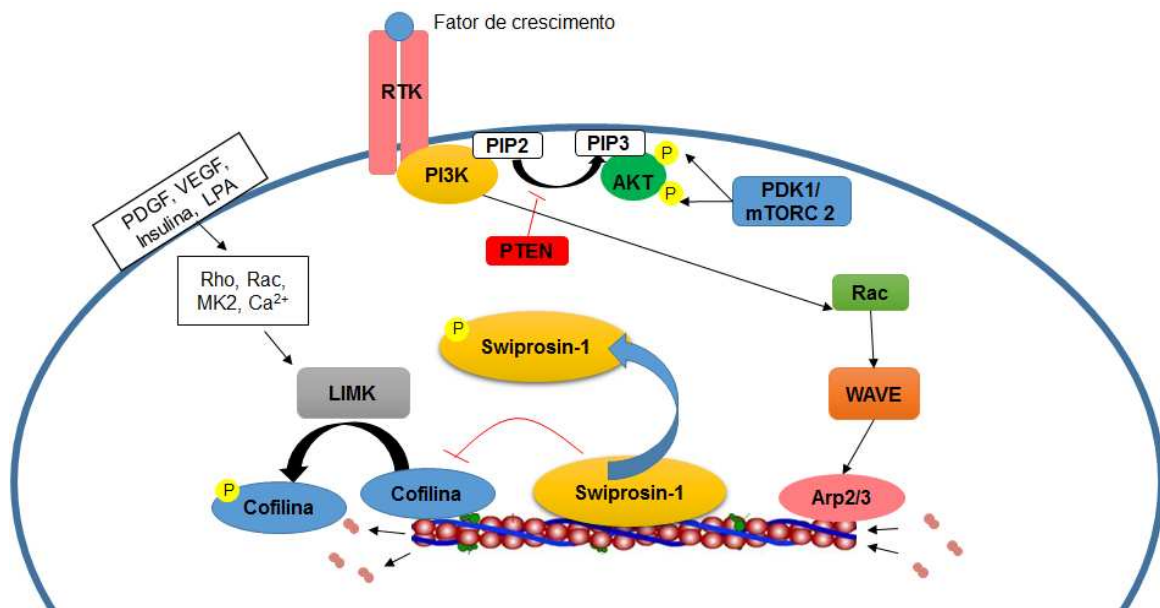


Figura 14 – Representação esquemática das vias de sinalização de polimerização e despolimerização de actina e o papel da swiprosin-1. Swiprosin-1 age regulando o acesso de cofilina à F-actina.

5.1.3. SNIP-1

Outra proteína encontrada em nosso screening foi a Smad nuclear interacting protein 1 (SNIP1). Proveniente do clone 18, apenas a porção N-terminal foi clonada, e portanto deve ser a região com a qual SRPK2 interage.

SNIP1 é uma proteína de 396 aminoácidos que contém um sinal de localização nuclear (NLS - nuclear localization signal) bipartido na extremidade N-terminal e um

domínio FHA (forkhead associated) na extremidade C-terminal, um motivo que se liga à epítopos de fosfo-treonina expresso em uma variedade de proteínas nucleares, sugerindo que ele desempenha um papel de ancoramento análogo ao de SH2 (Kim et al, 2000 e Durocher & Jackson, 2002). A localização de SNIP 1 é nuclear, com característica distribuição subnuclear em speckles (Kim et al, 2000 e Roche et al, 2004). Esta proteína funciona como um coativador transcricional que aumenta a atividade de c-Myc e inibe a sinalização de TGF- β e NF- κ B (Fujii et al, 2006, Kim et al, 2000 e 2001).

Os membros da superfamília TGF- β exercem um papel crítico no controle do crescimento e diferenciação celular ao controlar a transcrição de vários genes. TGF- β é um tipo de citocina secretada por muitos tipos celulares, que age como um fator antiproliferativo em células epiteliais normais e em estágio precoces da oncogênese. Muitas células que produzem TGF- β , também apresentam receptores para tal em sua superfície, desencadeando uma sinalização autócrina. Células cancerosas têm a sua produção de TGF- β aumentada, atuando também sobre as células vizinhas (Clark & Coker, 1998).

Os efeitos de TGF- β são principalmente mediados por proteínas Smad. Nesta via, os dímeros de TGF- β se ligam ao receptor tipo II que recruta e fosforila o receptor tipo I, este então, recruta e fosforila R-Smad (receptor regulated SMAD). R-SMAD se liga à Smad4 e forma um complexo heterodimerico, que entra no núcleo da célula e regula a transcrição de vários genes, incluindo aqueles que ativam a via de MAPK 8 (mitogen-activated protein kinase 8), que desencadeia apoptose. A regulação ocorre através da interação física e cooperação funcional com fatores de transcrição de ligação ao DNA e coativadores CBP ou p300 (Derynck & Zhang, 2003).

O NF- κ B é um complexo de proteínas que também controla a transcrição do DNA. Ele é encontrado em quase todos os tipos de células animais e está envolvido nas respostas celulares para estímulos como o estresse, citocinas, radicais livres, irradiação ultravioleta, LDL oxidado e antígenos bacteriais ou virais. Em estado inativo, as subunidades do NF- κ B, RelA e p50 estão complexadas com a proteína inibitória I κ B α , difusas no citosol. Quando recebe um estímulo pelos receptores na membrana, I κ B kinase (IKK) é ativada e fosforila I κ B α , liberando as subunidades RelA e p50 que são translocadas para o núcleo, onde irão agir juntamente com coativadores na transcrição de vários genes (Gilmore 2006, Brasier 2006 e Perkins 2007).

O domínio N-terminal de SNIP1 pode interagir tanto com a proteína de sinalização da família TGF- β , Smad4, quanto com o fator de transcrição de NF- κ B, p65/RelA. O mesmo

domínio pode também se ligar ao domínio C/H1 dos coativadores transcricionais CBP e p300 (Kim et al, 2000 e 2001). A superexpressão de SNIP1 ou de seu N-terminal inibem a ativação transcricional de ambos Smad4 e NF- κ B ao bloquear suas interações com os coativadores CBP/p300 (Kim et al, 2000 e 2001) (Figura 15).

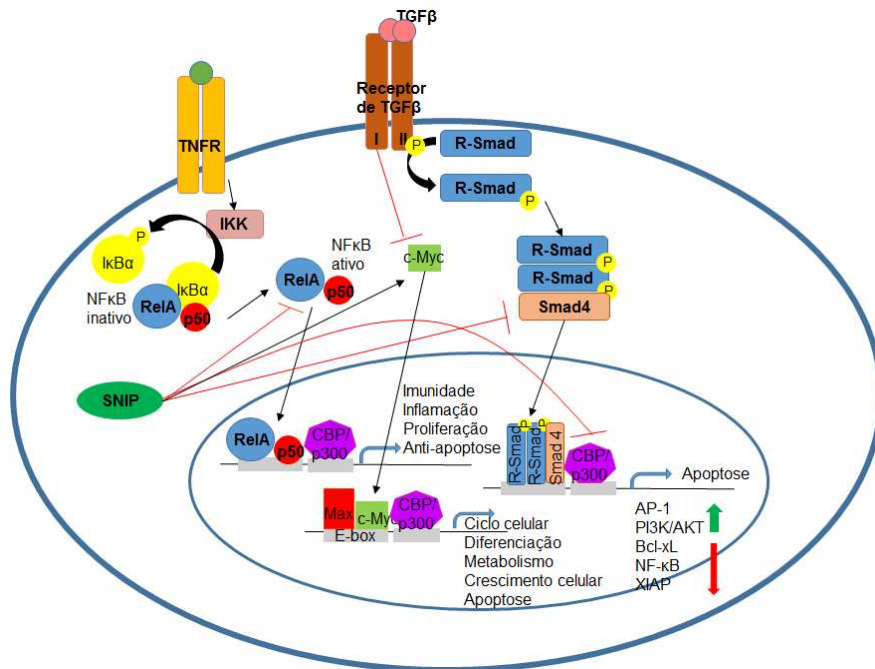


Figura 15 – Representação esquemática das vias de inibitórias de SNIP1.

Numa via de sinalização que integra SNIP 1 e SRPK2, SNIP 1 deve estar downstream a SRPK2. SNIP 1 sendo um coativador transcricional, deve sofrer regulação por SRPK2, que é uma recrutadora de fatores de transcrição. Além disso, SRPK2 também já foi relacionada à regulação de ciclinas e progressão do ciclo celular. SNIP 1 também regula a estabilidade do mRNA da ciclina D1 e deve exercer um papel na proliferação celular e na progressão do câncer. O esgotamento de SNIP1 resultou na inibição da atividade do promotor de ciclina D1 de um modo dependente do local de ligação anteriormente caracterizado para a família de fatores de transcrição AP-1 (Roche et al, 2004). Assim, a interação entre SNIP 1 e SRPK2 também pode estar relacionada à progressão do ciclo celular.

5.1.4. NPM1 e as proteínas ribossomais (RPS20, RPS27P3 e RPLP2)

A proteína proveniente do clone 53 é a nucleofosmina (nucleophosmin - nucleolar phosphoprotein B23, numatrin) conhecida como NPM1, ou apenas NPM, ou ainda B23. Ela é uma proteína abundante e ubiquitariamente expressa, principalmente localizada no nucléolo (Kang et al, 1975; Schmidt-Zachmann et al, 1987), mas continuamente translocada entre o núcleo e o citoplasma (Borer et al, 1989). A atividade principal de NPM1 é a biogênese de ribossomos. Ela tem sido associada a estimulação da expressão do RNA ribossomal (rRNA) (Murano et al, 2008), processamento e montagem do RNA pré-ribossomal (Savkur & Olson, 1998) e exportação do ribossomo para o citoplasma (Maggi et al, 2008). Nos últimos anos, no entanto, o número de processos celulares nos quais a NPM1 participa, assim como o número de interações celulares, tem aumentando exponencialmente e a proteína é agora suposta a exercer um papel também no remodelamento da cromatina (Okuwaki et al, 2011a-b), duplicação do centrôssomo (Wang et al, 2005), replicação, recombinação, transcrição e reparo do DNA, assim como no controle da progressão do ciclo celular e sobrevivência em resposta a variados estímulos de estresse (Colombo, Alcalay & Pelicci, 2011).

Muito do interesse nesta proteína surgiu de sua relevância em doenças humanas. NPM1 é frequentemente superexpressa em tumores de diferentes origens histológicas, incluindo gástrica, ovariana, bexiga e carcinomas de próstata (Grisendi et al, 2006). Além disso, o locus de NPM1 está frequentemente envolvido em translocações cromossômicas ou se encontra deletado em neoplasias hematológicas (Grisendi et al, 2006 & Falini et al, 2007). Notavelmente, NPM1 tem sido caracterizado como o gene mutado mais frequente em leucemia mieloide aguda (Acute Myeloid Leukemia - AML) (Falini et al, 2007), cerca de 30% dos casos (Falini et al, 2005). As mutações alteram o domínio de ligação ao DNA C-terminal da proteína e resulta em sua exportação nuclear aberrante e localização citosólica estável (Para revisão consultar Federici & Falini, 2013).

A porção C-terminal da proteína NPM1 é muito importante no estabelecimento de interações protéicas. PIP3 nuclear compete com Akt para se ligar preferencialmente à porção C-terminal de NPM1 no nucleoplasma (Kwon et al, 2010). Esta interação forma um complexo que media os efeitos anti-apoptóticos do fator de crescimento do nervo (NGF - nerve growth factor), inibindo a atividade de fragmentação do DNA da DNase ativadora de caspase (CAD - caspase-activating DNase). NPM1 associa-se diretamente com Akt em resposta ao tratamento com NGF, aumentando a estabilidade protéica de Akt, prevenindo a clivagem proteolítica de

NPM1 por caspase 3 in vitro e in vivo, promovendo a sobrevivência celular e a progressão do ciclo celular (Lee et al, 2008).

É interessante destacar que NPM1 não sumorilada interage fortemente com Akt no nucleoplasma na ausência de fatores de crescimento, e que a isoforma de Akt2 regula especificamente a atividade de progressão do ciclo celular de NPM1 (Lee et al, 2008). De fato, a perda da expressão de NPM1 atenua a proliferação celular e aumenta a apoptose (Itahana et al, 2003 e Grisendi et al, 2005), sugerindo que NPM1 pode ter ambas as funções, de potencial oncogênico e de supressor de tumores.

As porções da proteína NPM1 pescadas em nosso screening foram o N-terminal e o core. O que de fato, é bastante coerente com os dados que nós pudemos observar na literatura. Em um suposto complexo formado por NPM1, Akt e SRPK2, Akt estaria se ligando a porção C-terminal de NPM1, enquanto SRPK2 estaria se ligando a porção N-terminal. As funções deste complexo provavelmente devem ser as mesmas descritas anteriormente, agindo na sobrevivência celular e progressão do ciclo celular. No entanto, as características da porção N-terminal de NPM1 nos dá indícios de outras funções. Esta região possui dois sinais de exportação nuclear ricos em leucina (NES - nuclear export signals), reconhecidos pelo sistema de transporte exportina1-Crm1 (Wang et al, 2005 e Yu et al, 2006). Estas proteínas não foram relacionadas à interação com SRPK, mas SRPK2 poderia estar mediando o transporte de NPM1 para fora do núcleo. A porção N-terminal também funciona como um clássico domínio chaperona histônico: é capaz de montar octâmeros de histona (Namboodiri et al, 2004), de transferir nucleossomos para naked DNA (Okuwaki et al, 2001a), de descondensar cromatina de espermatozoides in vitro (Okuwaki et al, 2001b), e de auxiliar na renaturação de proteínas desnaturadas quimicamente (Szebeni & Olson, 1999). O domínio N-terminal tem sido reportado como mediador das interações entre NPM1 e uma gama de outras proteínas, incluindo p53, p14arf, e proteínas ribossomais (Colombo et al, 2011, Grisendi et al, 2006 & Lindstrom, 2011).

As proteínas ribossomais RPS20, RPS27P3 e RPLP2 provenientes respectivamente dos clones 26, 46 e 96, foram encontradas em nosso screening. Alterações no nucléolo, o local de produção de ribossomos, têm sido longamente associadas ao câncer, e mutações em várias proteínas ribossomais (RPs) têm sido associadas como um aumento do risco de câncer em doenças humanas (Daftuar et al, 2013). As proteínas encontradas em nosso screening já foram reconhecidas como proteínas que interagem com o complexo mdm2/p53 (Daftuar et al, 2013 & Xiong et al, 2011). Elas atuam inibindo mdm2 e estimulando p53, revelando assim,

uma via de sinalização RP-Mdm2-p53 que é fundamental para a vigilância da biogênese de ribossomos. Sendo assim, a SRPK2 pode ter também, um papel importante na regulação da biogênese de ribossomos.

A maneira pela qual NPM1 controla a progressão do ciclo celular e a sobrevivência celular é principalmente por seu papel na via p53/p14ARF/mdm2, onde ela atua se ligando a p14ARF e regulando p53 (Gjerset, 2006). Enquanto a formação de complexo entre ARF e NPM retém ARF no nucléolo e previne a ativação de p53 por ARF; os tratamentos de danos ao DNA promovem uma redistribuição subnuclear transiente de ARF para o nucleoplasma, onde ele interage com mdm2 e promove a ativação de p53 (Gjerset, 2006). O resultado dá suporte para o modelo proposto no qual o nucléolo serve como um sensor de estresse upstream de p53, e onde ARF liga os sinais de estresse nucleolar aos efetores nucleoplasmáticos da resposta de estresse (Gjerset, 2006). Em células cancerosas, ARF acumula no nucléolo, enquanto p53 e mdm2 são amplamente nucleoplasmáticas (Quelle et al, 1995; Pomerantz et al, 1998; Weber et al, 1999; Zhang & Xiong 1999).

Em condições normais, em que a célula está crescendo e proliferando, NPM1, juntamente com a topoisomerase I, está ligado a p14ARF, mantendo-a no nucléolo (Bertwistle et al, 2004 & Korgaonkar et al, 2005), enquanto mdm2 está ligado a p53 inibindo-o no nucleoplasma (Haupt et al, 1997 & Kubbutat et al, 1997). Ao receber sinais de estresse oncogênico, ocorre uma redistribuição de NPM1/p14ARF do nucléolo para o nucleoplasma e p14ARF é liberado do complexo NPM1/p14ARF/topo I e começa a sequestrar mdm2 e inibir sua atividade sob p53 (David-Pfeuty & Nouvian-Dooghe, 2002 & Lee et al, 2005). p53 agora livre, ativa um mecanismo de retroalimentação que aumenta expressão de mdm2 (Wu et al, 1993). No entanto, estes mdm2 recém sintetizados são sequestrados por NPM1, culminando na acumulação de p53. p53 acumulado age inibindo a progressão do ciclo celular e promovendo apoptose (Figura 16) (Maltzman & Czyzyk, 1984; Kastan et al, 1991 e 1992; Shieh et al, 1997 & Siliciano et al, 1997).

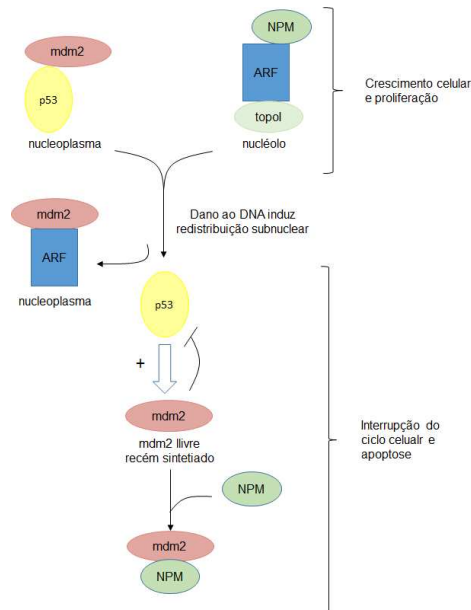


Figura 16 – Representação esquemática da redistribuição subnuclear após dano ao DNA. O modelo descreve as mudanças nos complexos ARF e possíveis papéis sequenciais exercidos por ARF e NPM na regulação da função de p53 seguido de dano ao DNA, através da ligação a mdm2. Figura inspirada na figura 2 de Gjerset RA 2006. DNA damage, p14ARF, nucleophosmin (NPM/B23), and cancer. *Journal of Molecular Histology* 37(5–7): 239–51

5.2. SRPK2, integrando as vias

Pudemos observar que a maioria das proteínas discutidas neste trabalho guardam de certa forma, uma relação principalmente com o ciclo, a proliferação e a sobrevivência celular. Quando o contexto é então uma célula cancerosa e a função destas proteínas descritas se encontra alterada, exarcebada, com superexpressão, podemos então associa-las à aceleração da progressão do ciclo celular, proliferação exarcebada, sobrevivência celular quando vias apoptóticas deveriam estar ativas. Estas características promovem o desenvolvimento, estabelecimento e espalhamento de tumores no organismo. Outras funções desempenhadas por estas proteínas resultam na angiogênese, diferenciação e migração celular, características essenciais para o estabelecimento de um tumor. Ainda, proteínas como a Tβ4, SNIP1 e a NPM1 agem na transcrição de outras proteínas, podendo influenciar diversos aspectos do metabolismo celular.

A SRPK2 neste contexto, é suposta exercer um papel centralizador na transmissão de sinais do meio extracelular para as proteínas efetoras intracelulares. E mais do que isso, por ser uma proteína citosólica e nuclear, ela deve mediar a transmissão de sinais entre o citoplasma e o nucleoplasma. A T β 4 deve ser uma reguladora da atividade de SRPK2, no entanto, todas as demais proteínas: Swiprosin-1, SNIP1, NPM1, as proteínas ribossomais, todas estas parecem estar downstream e devem sofrer regulação por parte de SRPK2. Na Figura 17 podemos ver um resumo do que foi discutido neste trabalho e inferir a função de SRPK2 na transmissão do sinal dos fatores de crescimento para as proteínas efetoras.

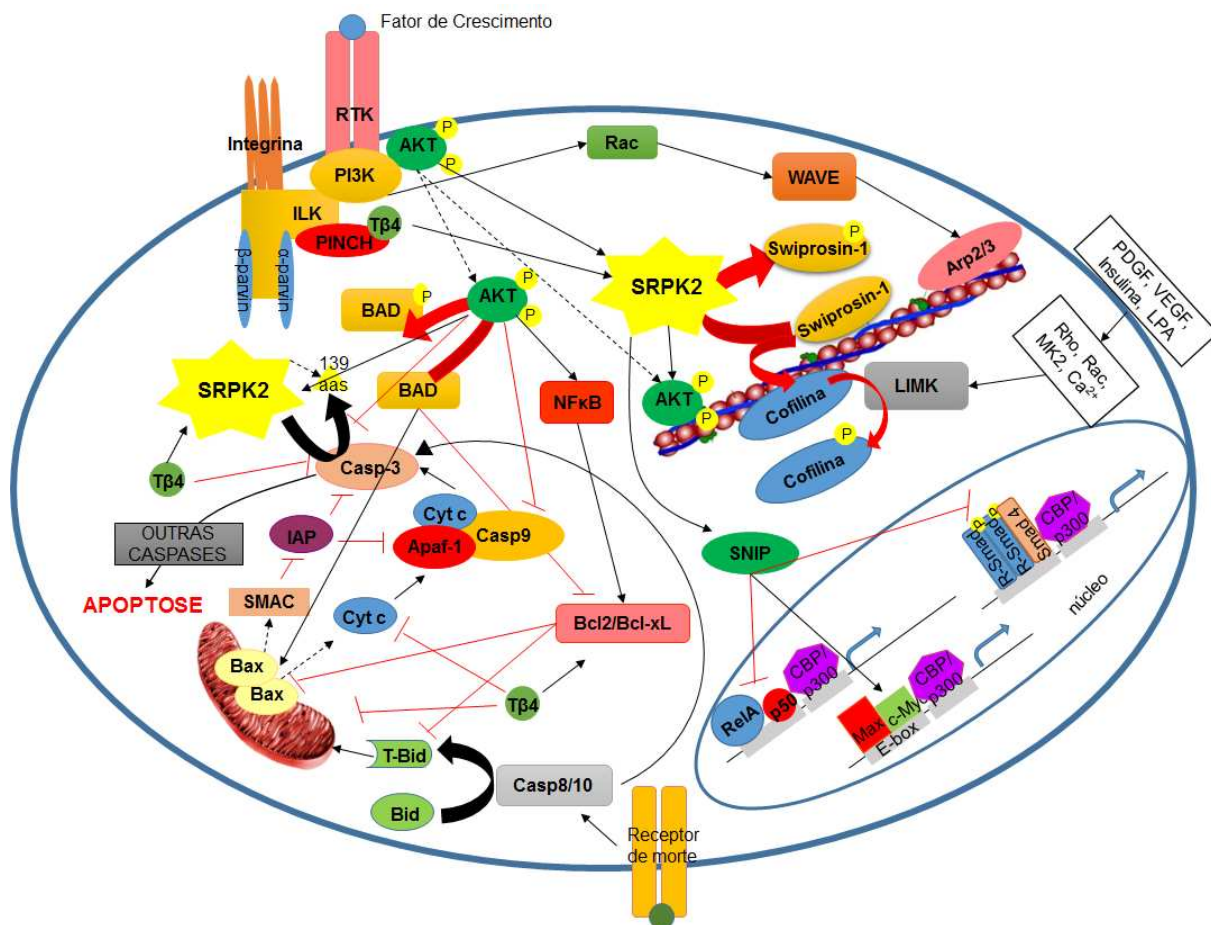


Figura 17 – Representação esquemática envolvendo todas as vias descritas no texto e o suposto papel da SRPK2 nelas.

5.3. Perspectivas Futuras

As proteínas que não foram consideradas nesta discussão ainda serão investigadas cuidadosamente. No entanto, em uma rápida verificação das funções foi possível relacioná-las a processos celulares como ativação do sistema imune, transporte de membrana, controle da expressão de genes, dentre outros. Estes resultados sugerem novos mecanismos moleculares para a atuação da SRPK2 no processo tumorigênico.

Nos próximos meses novos experimentos deverão ser realizados com o intuito de confirmar as interações averiguadas no screening, tanto em experimentos *in vitro* quanto *in vivo*. Experimentos como imunoprecipitação, co-localização e imunolocalização, auxiliarão na confirmação das interações. Para avaliar o efeito da SRPK2 sobre as proteínas parceiras, deverão ser conduzidos experimentos de ensaio de fosforilação e também com o uso de inibidores. Experimentos que envolvam a superexpressão ou esgotamento das proteínas parceiras são necessários para melhor verificar o efeito destas sobre o metabolismo e fisiologia celular.

Os resultados obtidos até o momento são animadores e prometem auxiliar no entendimento do papel da SRPK2 no processo oncogênico e subsidiar o desenvolvimento de novas estratégias antitumorais.

6. CONCLUSÕES

O screening com o duplo híbrido de leveduras nos revelou 19 novas interações, sendo que destas, 7 foram discutidas neste trabalho.

A SRPK2 surge como um novo ligante de T β 4, possivelmente agindo em vias de diferenciação, proliferação, sobrevivência e migração celular.

A possível fosforilação de Swiprosin-1 por SRPK2 reforça a ação desta na migração celular. Pois, a fosforilação transiente de Swiprosin-1, permitindo o acesso de cofilina a F-actina cria novos polos de polimerização que ramificam e mudam a direção da migração celular.

A ação de SRPK2 sob SNIP1 provavelmente culmina na promoção da sobrevivência celular ao inibir a transcrição de genes pró-apoptóticos.

A proteína SRPK2 pode ser um terceiro componente do complexo Akt/NPM1, sendo ativada por Akt e ligando-se a porção N-terminal de NPM1. Este complexo potencialmente age na sobrevivência celular.

SRPK2 pode estar agindo também no transporte de NPM1 do núcleo para o citoplasma.

As proteínas ribossomais RPS20, RPS27P3 e RPLP2, juntamente com NPM1 e SRPK2 possivelmente estão envolvidas na biogênese de ribossomos. Mutações nestas proteínas aumentam o risco de câncer em doenças humanas.

Os resultados obtidos são animadores, pois mostram interações coerentes com o papel potencialmente oncogênico de SRPK2.

As demais proteínas que ainda não foram investigadas profundamente, como SELL, CD74, CP1 e GNTPG, mas que apresentam funções relacionadas a este papel de proliferação, sobrevivência e migração celular, merecem ser estudadas. Pois certamente irão contribuir para esclarecer melhor as vias de sinalização celular que a SRPK2 explora para promover a proliferação e sobrevivência celular.

Além disto, experimentos complementares que comprovem a interação entre SRPK2 e as proteínas encontradas no screening, *in vitro* e *in vivo*, devem ser conduzidos nos próximos meses para certificar as interações e localizar a posição exata de cada componente nas vias de sinalização.

REFERÊNCIAS

- Aubol BE, Plocinik RM, McGlone ML, Adams JA 2012. Nucleotide release sequences in the protein kinase SRPK1 accelerate substrate phosphorylation. *Biochemistry* 51:6584–6594
- Bae J, Leo CP, Hsu SY & Hsueh AJ 2000. MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (33): 25255–61
- Balasubramanian S, Zheng D, Liu YJ, Fang G, Frankish A, Carriero N, Robilotto R, Cayting P & Gerstein M 2009. Comparative analysis of processed ribosomal protein pseudogenes in four mammalian genomes. *Genome Biology* 10(1):R2
- Begum NA, Tsuji S, Nomura M, Shida K, Azuma I, Hayashi A, Matsumoto M, Seya T & Toyoshima K 1999. Human MD-1 homologue is a BCG-regulated gene product in monocytes: its identification by differential display. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 256(2):325-9
- Benham CD, Gunthorpe MJ & Davis JB 2003. TRPV channels as temperature sensors. *Cell Calcium* 33(5-6): 479-487
- Bertwistle D, Sugimoto M & Sherr CJ 2004. Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Molecular Cell Biology* 24:985–996
- Bevilacqua M, Butcher E, Furie B, Furie B, Gallatin M, Gimbrone M, Harlan J, Kishimoto K, Lasky L, McEver R, Paulson J, Rosen S, Seed B, Siegelman M, Springer T, Stoolman L, Tedder T, Varki A, Wagner D, Weissman I & Zimmerman G 1991. Selectins: A family of adhesion receptors. *Cell* 67 (2): 233
- Black MM, Slaughter T, Moshiah S, Obrocka M & Fischer I 1996. Tau is enriched on dynamic microtubules in the distal region of growing axons. *The Journal of Neuroscience* 16, 3601-3619
- Blaustein M, Pelisch F, Tanos T, Muñoz MJ, Wengier D, Quadrana L, Sanford JR, Muschietti JP, Kornblihtt AR, Cáceres JF, et al. 2005. Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nature Structural & Molecular Biology* 12: 1037–1044
- Blencowe BJ 2000. Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends in Biochemical Sciences* 25 (3): 106-110
- Blencowe BJ 2006. Alternative splicing: New insights from global analyses. *Cell* 126 (1): 37-47
- Bock-Marquette I, Saxena A, White MD, DiMaio JM & Srivastana D 2004. Thymosin β 4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature* 432: 466-472
- Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM & Nigg EA 1989. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56:379–390
- Boyd D, Vecoli C, Belcher DM, Jain SK & Drysdale JW 1985. Structural and functional relationships of human ferritin H and L chains deduced from cDNA clones. *The Journal of Biological Chemistry* 260(21):11755-61
- Brasier AR 2006. The NF- κ B Regulatory Network. *Cardiovascular Toxicology* 06: 111–130
- Bressan GC, Quaresma AJ, Moraes EC, Manfioli AO, Passos DO, Gomes MD & Kobarg J 2009. Functional association of human Ki-1/57 with pre-mRNA splicing events. *FEBS* 276(14):3770-83
- Brinkman BM 2004. Splice variants as cancer biomarkers. *Clinical Biochemistry* 37 (7): 584-94
- Calandra T & Roger T 2003. Macrophage migration inhibitory factor: A regulator of innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 3:791–800

- Capaldi RA, Malatesta F & Darley-Usmar VM 1983. Structure Of Cytochrome C Oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 726: 135-148
- Casero RA Jr, Celano P, Ervin SJ, Applegren NB, Wiest L & Pegg AE 1991. Isolation and characterization of a cDNA clone that codes for human spermidine/spermine N1-acetyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry* 266(2):810-4
- Cenni V, Sirri A, Riccio M, Lattanzi G, Santi S, Pol A, Maraldi NM & Marmiroli S 2003. Targeting of the Akt/PKB kinase to the actin skeleton. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60: 2710–2720
- Cha HK, Jeong MJ & Kleinman HK 2003. Role of thymosin beta 4 in tumor metastasis and angiogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* 95: 1674–1680
- Chan CB & Ye K 2013. Serine-arginine protein kinases: new players in neurodegenerative diseases? *Reviews in the Neuroscience* 24(4):401-13
- Chen C, Wang JC & Zlotnick A 2011. A kinase chaperones hepatitis B virus capsid assembly and captures capsid dynamics in vitro. *PLoS Pathogens*. 7(11):e1002388
- Choglay AA, Chapple JP, Blatch GL & Cheetham ME 2001. Identification and characterization of a human mitochondrial homologue of the bacterial co-chaperone GrpE. *Genetics* 267(1):125-34
- Clark DA & Coker R 1998. Transforming growth factor-beta (TGF- β). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30: 293±298
- Collins CA & Guthrie C 2000. The question remains: is the spliceosome a ribozyme? *Nature Structural Biology* 7: 850 – 854
- Colombo E, Alcalay M & Pelicci PG 2011. Nucleophosmin and its complex network: a possible therapeutic target in hematological diseases. *Oncogene* 30:2595–2609
- Cooper TA, Wan L & Dreyfuss G 2009. RNA and disease. *Cell* 136 (4): 777-93
- Crockford D, Turjman N, Allan C & Angel J 2010. Thymosin β 4: structure, function, and biological properties supporting current and future clinical applications. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1194: 179–189
- Daftuar L, Zhu Y, Jacq X & Prives C 2013. Ribosomal proteins RPL37, RPS15 and RPS20 regulate the Mdm2-p53-MdmX network. *PLoS One* 8(7):e68667
- Daub H, Blencke S, Habenberger P, Kurtenbach A, Dennenmoser J, Wissing J, Ullrich A & Cotton M 2002. Identification of SRPK1 and SRPK2 as the Major Cellular Protein Kinases Phosphorylating Hepatitis B Virus Core Protein. *Journal of Virology* 76 (16): 8124–813716
- David-Pfeuty T, Nouvian-Dooghe Y (2002) Human p14(Arf): an exquisite sensor of morphological changes and of short-lived perturbations in cell cycle and in nucleolar function. *Oncogene* 21:6779–6790
- Derynck R & Zhang YE 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-b family signaling. *Nature* 425: 577-584
- Duarte M, Wang L, Calderwood MA, Adelmant G, Ohashi M, Roecklein-Canfield J, Marto JA, Hill DE, Deng H & Johannsen E 2013. An RS motif within the Epstein-Barr virus BLRF2 tegument protein is phosphorylated by SRPK2 and is important for viral replication. *PLoS One* 8(1):e53512
- Durocher D, Henckel J, Fersht AR & Jackson SP 1999. The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. *Molecular Cell* 4(3):387–394
- Durocher D & Jackson SP 2002. The FHA domain. *FEBS Letters* 513: 58–66

Dütting S, Brachs S & Mielenz S 2011. Fraternal twins: Swiprosin-1/EFhd2 and Swiprosin-2/EFhd1, two homologous EF-hand containing calcium binding adaptor proteins with distinct functions. *Cell Communication and Signaling* 9:2

Endicott JA, Noble MEM & Johnson LN 2012. The Structural Basis for Control of Eukaryotic Protein Kinases. *Annual Review of Biochemistry* 81:587–613

Ezumi Y, Uchiyama T & Takayama H 2000. Molecular cloning, genomic structure, chromosomal localization, and alternative splice forms of the platelet collagen receptor glycoprotein VI. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 277 (1): 27–36

Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A, Bigerna B, Pacini R, Pucciarini A, Liso A, Vignetti M, Fazi P, Meani N, Pettrossi V, Saglio G, Mandelli F, Lo-Coco F, Pelicci PG, Martelli MF; GIMEMA Acute Leukemia Working Party 2005. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *The New England Journal of Medicine* 352:254–266

Falini B, Nicoletti I, Bolli N, Martelli MP, Liso A, Gorello P, Mandelli F, Mecucci C & Martelli MF 2007. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica* 92:519–532

Fardilha M, Cruz e Silva OAB & Cruz e Silva OF 2008. A importância do mecanismo de “splicing” alternativo para a identificação de novos alvos terapêuticos. *Acta Urológica* 25 (1): 39-47

Federici L & Falini B 2013. Nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia: a tale of protein unfolding and mislocalization. *Protein Science* 22(5):545-56

Freeley M, O'Dowd F, Paul T, Kashanin D, Davies A, Kelleher D & Long A 2012. L-plastin regulates polarization and migration in chemokine-stimulated human T lymphocytes. *The Journal of Immunology* 188(12):6357-70

Fujii M, Lyakh LA, Bracken CP, Fukuoka J, Hayakawa M, Tsukiyama T, Soll SJ, Harris M, Rocha S, Roche KC, Tominaga S, Jen J, Perkins ND, Lechleider RJ & Roberts AB 2006. SNIP1 is a candidate modifier of the transcriptional activity of c-Myc on E box-dependent target genes. *Molecular Cell* 24(5): 771–783

Fujise K, Zhang D, Liu J & Yeh ET 2000. Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (50): 39458–65

Fukuda T, Chen K, Shi X & Wu C 2003. PINCH-1 is an obligate partner of integrin-linked kinase (ILK) functioning in cell shape modulation, motility, and survival. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 51324–51333

Fukuhara T, Hosoya T, Shimizu S, Sumi K, Oshiro T, Yoshinaka Y, Suzuki M, Yamamoto N, Herzenberg LA, Herzenberg LA & Hagiwara M 2006. Utilization of host SR protein kinases and RNA-splicing machinery during viral replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(30):11329-33

García-Horsman JA, Barquera B, Rumbley J, Ma J & Gennis RB 1994. The Superfamily of Heme-Copper Respiratory Oxidases. *Journal of Bacteriology* 5587-5600

Gardner-Thorpe J, Ito H, Ashley SW & Whang EE 2004. Ribosomal protein P2: a potential molecular target for antisense therapy of human malignancies. *Anticancer Research* 23 (6C): 4549–60

Ghosh G & Adams JA 2011. Phosphorylation mechanism and structure of serine-arginine protein kinases. *FEBS Journal* 278 (4): 587-597

Giannakouros T, Nikolakaki E, Mylonis I & Georgatsou E 2011. Serine-arginine protein kinases: a small protein kinase family with a large cellular presence. *FEBS Journal* 278 (4): 570–586

Gilmore TD 2006. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25: 6680–6684

- Gjerset RA 2006. DNA damage, p14ARF, nucleophosmin (NPM/B23), and cancer. *Journal of Molecular Histology* 37(5–7): 239–51
- Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, Cheng K, Khandker L, Manova K & Pandolfi PP 2005. Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature* 437(7055):147-53
- Grisendi S, Mecucci C, Falini B & Pandolfi PP 2006. Nucleophosmin and cancer. *Nature Reviews Cancer* 6:493–505
- Gui JF, Lane WS & Fu XD 1994a. A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature* 369:678-682
- Gui JF, Tronchere H, Chandler SD & Fu XD 1994b. Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 10824–10828
- Gutschner T, Hämmerle M, Eissmann M, Hsu J, Kim Y, Hung G, Revenko A, Arun G, Stentrup M, Gross M, Zörnig M, MacLeod AR, Spector DL & Diederichs S 2013. The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer Research* 73 (3): 1180–9
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A & Oren M 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387:296–299
- Hayes GM, Carrigan PE & Miller LJ 2007. 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* 67 (5): 2072-80
- He C, Zhou F, Zuo Z, Cheng H & Zhou R 2009. A Global View of Cancer-Specific Transcript Variants by Subtractive Transcriptome-Wide Analysis. *PLoS ONE* 4 (3): e4732
- Hebert SC, Mount DB & Gamba G 2004. Molecular physiology of cation-coupled Cl⁻ cotransport: the SLC12 family. *Pflugers Arch* 447(5):580-93
- Hildebrand JD, Taylor JM & Parsons JT 1996. An SH3 domain-containing GTPase-activating protein for Rho and Cdc42 associates with focal adhesion kinase. *Molecular Cell Biology* 16 (6): 3169–78
- Hishizawa M, Imada K, Sakai T, Ueda M, Hori T & Uchiyama T 2005. Serological identification of adult T-cell leukaemia-associated antigens. *British Journal of Haematology* 130 (3): 382-90
- Hoefen RJ & Berk BC 2006. The multifunctional GIT family of proteins. *Journal of Cell Science* 119(Pt 8):1469-75
- Hong Y, Jang SW & Ye K 2011. The N-terminal Fragment from Caspase-cleaved Serine/Arginine Protein-specific Kinase2 (SRPK2) Translocates into the Nucleus and Promotes Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 286:777-786
- Hong Y, Chan CB, Kwon IS, Li X, Song M, Lee HP, Liu X, Sompol P, Jin P, Lee HG, Yu SP & Ye K 2012. SRPK2 phosphorylates tau and mediates the cognitive defects in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 32(48):17262-72
- Hormia M, Falk-Marzillier J, Plopper G, Tamura RN, Jones JC & Quaranta V 1995. Rapid spreading and mature hemidesmosome formation in HaCaT keratinocytes induced by incubation with soluble laminin-5r. *The Journal of Investigative Dermatology* 105(4):557-61
- Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B & Leung DW 1991. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Molecular Endocrinology* 5: 1806–1814
- Huh YH, Kim SH, Chung K-H, Oh S, Kwon M-S, Choi H-W, Park ZY, Jun C-D & Song WK 2013. Swiprosin-1 modulates actin dynamics by regulating the F-actin accessibility to cofilin. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70:4841–4854

- Itahana K, Bhat KP, Jin A, Itahana Y, Hawke D, Kobayashi R & Zhang Y 2003. Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Molecular Cell* 12(5):1151-64
- Jang SW, Yang S, Ehlén A, Dong S, Khoury H, Chen J, Persson JL & Ye K 2008. Serine/Arginine Protein-Specific Kinase 2 Promotes Leukemia Cell Proliferation by Phosphorylating Acinus and Regulating Cyclin A1. *Cancer Research* 68: 4559-4570
- Jang SW, Liu X, Fu H, Rees H, Yepes M, Levey A & Ye K 2009. Interaction of Akt-phosphorylated SRPK2 with 14-3-3 Mediates Cell Cycle and Cell Death in Neurons. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 24512–24525
- Jiang K, Patel NA, Watson JE, Apostolatos H, Kleiman E, Hanson O, Hagiwara M & Cooper DR 2009. Akt2 regulation of Cdc2-like kinases (Clk/Sty), serine/arginine-rich (SR) protein phosphorylation, and insulin-induced alternative splicing of PKC β II messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 150: 2087–2097
- Kaarbø M, Storm ML, Qu S, Wæhre H, Risberg B, Danielsen HE & Saatcioglu F 2013. TCTP is an androgen-regulated gene implicated in prostate cancer. *PLoS One* 8(7):e69398
- Kadono T, Venturi GM, Steeber DA & Tedder TF 2002. Leukocyte rolling velocities and migration are optimized by cooperative L-selectin and intercellular adhesion molecule-1 functions. *The Journal of Immunology* 169(8):4542-50
- Kalnina Z, Zayakin P, Silina K & Linē A 2005. Alterations of pre-mRNA splicing in cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 42 (4): 342-57
- Kamachi M, Le TM, Kim SJ, Geiger ME, Anderson P & Utz PJ 2002. Human autoimmune sera as molecular probes for the identification of an autoantigen kinase signaling pathway. *The Journal of Experimental Medicine* 196 (9): 1213-1226
- Kang YJ, Olson MO, Jones C & Busch H 1975. Nucleolar phosphoproteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells. *Cancer Research* 35:1470–1475
- Karakama Y, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Oooka M, Azuma S, Tsuchiya K, Onogi H, Hagiwara M & Watanabe M 2010. Inhibition of hepatitis C virus replication by a specific inhibitor of serine-arginine-rich protein kinase. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 54(8):3179-86
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Research* 51:6304–6311
- Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ Jr 1992. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71:587–597
- Kim RH, Wang D, Tsang M, Martin J, Huff C, de Caestecker MP, Parks WT, Meng X, Lechleider RJ, Wang T & Roberts AB 2000. A novel smad nuclear interacting protein, SNIP1, suppresses p300-dependent TGF-beta signal transduction. *Genes & Development* 14(13): 1605–1616
- Kim RH, Flanders KC, Birkey Reffey S, Anderson LA, Duckett CS, Perkins ND & Roberts AB 2001. SNIP1 inhibits NF-kappa B signaling by competing for its binding to the C/H1 domain of CBP/p300 transcriptional co-activators. *Journal of Biology Chemistry* 276(49): 46297–46304
- Kimura M, Murakami T, Kizaka-Kondoh S, Itoh M, Yamamoto K, Hojo Y, Takano M, Kario K, Shimada K & Kobayashi E 2009. Functional molecular imaging of ILK-mediated Akt/PKB signaling cascades and the associated role of β -parvin. *Journal of Cell Science* 123: 747-755
- Kirschbaum-Slager N, Lopes GMP, Galante PAF, Riggins GJ & Souza SJ 2004. Splicing factors are differentially expressed in Tumors. *Genetics and Molecular Research* 3 (4): 512-520

- Klemke M, Rafael MT, Wabnitz GH, Weschenfelder T, Konstandin MH, Garbi N, Autschbach F, Hartschuh W & Samstag Y 2007. Phosphorylation of ectopically expressed L-plastin enhances invasiveness of human melanoma cells. *International Journal of Cancer* 120(12):2590-9
- Korgaonkar C, Hagen J, Tompkins V, Frazier AA, Allamargot C, Quelle FW & Quelle DE 2005. Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function. *Molecular Cell Biology* 25:1258–1271
- Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P & Craig RW 1993. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (8): 3516–20
- Krämer, A 1996. The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annual Review of Biochemistry* 65:367-409
- Kroczek C, Lang C, Brachs S, Grohmann M, Dütting S, Schweizer A, Nitschke L, Feller SM, Jäck HM & Mielenz D 2010. Swiprosin-1/EFhd2 Controls B Cell Receptor Signaling through the Assembly of the B Cell Receptor, Syk, and Phospholipase C γ 2 in Membrane Rafts. *The Journal of Immunology* 184: 000–000
- Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH 1997. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387:299–303
- Kudo J, Chao L-Y, Narni F & Saunders GF 1985. Structure of the human gene encoding the invariant γ -chain of class II histocompatibility antigens. *Nucleic Acids Research* 13: 24
- Kuroyanagi N, Onogi H, Wakabayashi T & Hagiwara M 1998. Novel SR-Protein-Specific Kinase, SRPK2, Disassembles Nuclear Speckles. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 242: 357–364
- Kurt MA, Davies DC, Kidd M, Duff K, Rolph SC, Jennings KH & Howlett DR 2001. Neurodegenerative changes associated with beta-amyloid deposition in the brains of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes. *Experimental Neurology* 171: 59– 71
- Kwon IS, Lee KH, Choi JW & Ahn JY 2010. PI(3,4,5)P3 regulates the interaction between Akt and B23 in the nucleus. *BMB Reports* 43(2):127-32
- Kwon M-S, Park KR, Kim Y-D, Na B-R, Kim H-R, Choi H-J, Piragyte I, Jeon H, Chung KH, Song WK, Eom SH & Jun C-D 2013. Swiprosin-1 Is a Novel Actin Bundling Protein That Regulates Cell Spreading and Migration. *PLoS ONE* 8(8): e71626
- Larjava H, Salo T, Haapasalmi K, Kramer RH & Heino J 1993. Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. *Journal of Clinical Investigation* 92(3): 1425–1435
- Lee C, Smith BA, Bandyopadhyay K & Gjerset RA 2005. DNA damage disrupts the p14ARF-B23(nucleophosmin) interaction and triggers a transient subnuclear redistribution of p14ARF. *Cancer Research* 65:9834–9842
- Lee SB, Xuan Nguyen TL, Choi JW, Lee KH, Cho SW, Liu Z, Ye K, Bae SS & Ahn JY 2008. Nuclear Akt interacts with B23/NPM and protects it from proteolytic cleavage, enhancing cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (43): 16584–9
- Liberek K, Marszalek J, Ang D, Georgopoulos C & Zyllicz M 1991. Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 2874±2878
- Lindström MS 2011. NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. *Biochemistry Research International* 2011: 195209
- Loh BJ, Cullen CF, Vogt N & Ohkura H 2012. The conserved kinase SRPK regulates karyosome formation and spindle microtubule assembly in Drosophila oocytes. *Journal of Cell Science* 125: 4457–4462
- Lucibello M, Gambacurta A, Zonfrillo M, Pierimarchi P, Serafino A, Rasi G, Rubartelli A & Garaci E 2011. TCTP is a critical survival factor that protects cancer cells from oxidative estresse-induced cell-death. *Experimental Cell Research* 317(17):2479-89

- Maggi LB, Jr, Kuchenruether M, Dadey DY, Schwoppe RM, Grisendi S, Townsend RR, Pandolfi PP & Weber JD 2008. Nucleophosmin serves as a rate-limiting nuclear export chaperone for the Mammalian ribosome. *Molecular Cell Biology* 28:7050–7065
- Maltzman W & Czyzyk L 1984. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Molecular Cell Biology* 4:1689–1694
- Mannherz HG & Hannappel E 2009. Intracellular and Extracellular Activities of β -Thymosins. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 66: 839–851
- Mathew R, Hartmuth K, Möhlmann S, Urlaub H, Ficner R & Lührmann R 2008. Phosphorylation of human PRP28 by SRPK2 is required for integration of the U4/U6-U5 tri-snRNP into the spliceosome. *Nature Structural & Molecular Biology* 15: 435 – 443
- Miura Y, Shimazu R, Miyake K, Akashi S, Ogata H, Yamashita Y, Narisawa Y & Kimoto M 1998. RP105 is associated with MD-1 and transmits an activation signal in human B cells. *Blood* 92(8):2815-22
- Moon EY, Song JH, Yang KH 2007. Actin-sequestering protein, thymosin-beta-4 (TB4), inhibits caspase-3 activation in paclitaxel-induced tumor cell death. *Oncology Research* 16(11):507-16
- Murano K, Okuwaki M, Hisaoka M & Nagata K 2008. Transcription regulation of the rRNA gene by a multifunctional nucleolar protein, B23/nucleophosmin, through its histone chaperone activity. *Molecular Cell Biology* 28:3114–3126
- Nery FC, Passos DO, Garcia VS & Kobarg J 2004. Ki-1/57 interacts with RACK1 and is a substrate for the phosphorylation by phorbol 12-myristate 13-acetate-activated protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 279(12):11444-55
- Nowak DG, Woolard J, Amin EM, Konopatskaya O, Saleem MA, Churchill AJ, Lodomery MR, Harper SJ & Bates DO 2008. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *Journal of Cell Science* 121: 3487–3495
- Nowak DG, Amin EM, Rennel ES, Hoareau-Aveilla C, Gammons M, Damodoran G, Hagiwara M, Harper SJ, Woolard J, Lodomery MR & Bates DO 2010. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms: a novel therapeutic strategy for angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 285(8):5532-40
- Oda T, Kayukawa K, Hagiwara H, Yudate HT, Masuho Y, Murakami Y, Tamura TA & Muramatsu MA 2000. A novel TATA-binding protein-binding protein, ABT1, activates basal transcription and has a yeast homolog that is essential for growth. *Molecular Cell Biology* 20(4):1407-18
- Okuwaki M, Iwamatsu A, Tsujimoto M & Nagata K 2001a. Identification of nucleophosmin/B23, an acidic nucleolar protein, as a stimulatory factor for in vitro replication of adenovirus DNA complexed with viral basic core proteins. *Journal of Molecular Biology* 311:41–55
- Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M & Nagata K 2001b. Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Letters* 506:272–276
- Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ & Blencowe BJ 2008. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature Genetics* 40: 1413 – 1415
- Pelengaris S & Khan M 2003. The many faces of c-MYC. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 416: 129–136
- Perez-Leal O, Barrero CA, Clarkson AB, Casero RA Jr & Merali S 2012. Polyamine-regulated translation of spermidine/spermine-N1-acetyltransferase. *Molecular Cell Biology* 32(8):1453-67
- Perkins ND 2007. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. *Molecular Cell Biology* 8: 49-62

- Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C & DePinho RA 1998. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92:713–723
- Premont RT, Claing A, Vitale N, Perry SJ & Lefkowitz RJ 2000. The GIT family of ADP-ribosylation factor GTPase-activating proteins. Functional diversity of GIT2 through alternative splicing. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (29): 22373–80
- Qian Y, Lee I, Lee WS, Qian M, Kudo M, Canfield WM, Lobel P & Kornfeld S 2010. Functions of the alpha, beta, and gamma subunits of UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. *The Journal of Biological Chemistry* 285(5):3360-70
- Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA & Sherr CJ 1995. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83:993–1000
- Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P & Baltimore D 1993. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 259:1157–1161
- Rizvi SM, Salam N, Geng J, Qi Y, Bream JH, Duggal P, Hussain SK, Martinson J, Wolinsky SM, Carrington M & Raghavan M 2014. Distinct assembly profiles of HLA-B molecules. *The Journal of Immunology* 192(11):4967-76
- Roberts GC & Smith CW 2002. Alternative splicing: combinatorial output from the genome *Current Opinion in Chemical Biology* 6 (3): 375-83
- Roche KC, Wiechens N, Owen-Hughes T & Perkins ND 2004. The FHA domain protein SNIP1 is a regulator of the cell cycle and cyclin D1 expression. *Oncogene* 23: 8185–8195
- Rousseau-Merck MF, Huebner K, Berger R & Thiesen HJ 1991. Chromosomal localization of two human zinc finger protein genes, ZNF24 (KOX17) and ZNF29 (KOX26), to 18q12 and 17p13-p12, respectively. *Genomics* 9(1):154-61
- Rousselet E, Benjannet S, Hamelin J, Canuel M & Seidah NG 2011. The proprotein convertase PC7: unique zymogen activation and trafficking pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 286(4):2728-38
- Røsok Ø, Pedeutour F, Odeberg J, Lundeberg J & Aasheim H-C 2000. The C1orf9 Gene Encodes a Putative Transmembrane Member of a Novel Protein Family. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 267: 855–862
- Samsonov A, Yu JZ, Rasenick M & Popov SV 2004. Tau interaction with microtubules in vivo. *Journal of Cell Sciences* 117 (Pt 25): 6129-41
- Savkur RS & Olson MO 1998. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Research* 26:4508–4515
- Schmidt-Zachmann MS, Hugle-Dorr B & Franke WW 1987. A constitutive nucleolar protein identified as a member of the nucleoplasmin family. *EMBO Journal* 6:1881–1890.
- Schwerk C & Schulze-Osthoff K 2005. Regulation of Apoptosis by Alternative Pre-mRNA Splicing. *Molecular Cell* 19 (1): 1-13
- Sheen VL, Ganesh VS, Topcu M, Sebire G, Bodell A, Hill RS, Grant PE, Shugart YY, Imitola J, Khoury SJ, Guerrini R & Walsh CA 2004. Mutations in ARFGEF2 implicate vesicle trafficking in neural progenitor proliferation and migration in the human cerebral cortex. *Nature Genetics* 36(1):69-76
- Shepard PJ & Hertel KJ 2009. The SR protein family. *Genome Biology* 10 (10): 242
- Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C 1997. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91:325–334

- Siliciano JD, Canman CE, Taya Y, Sakaguchi K, Appella E & Kastan MB 1997. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Development* 11:3471–3481
- Silkjaer T, Nyvold CG, Juhl-Christensen C, Hokland P & Nørgaard JM 2013. Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II variations predict adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukaemia. *European Journal of Haematology* 91(4):295-303
- Skotheim RI & Nees M 2007. Alternative splicing in cancer: Noise, functional, or systematic? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (7-8): 1432-49
- Song G, Ouyang G & Bao S 2005. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9 (1): 59-71
- Sosne G, Xu L, Prach L, Mrock LK, Kleinman HK, Letterio JJ, Hazlett LD & Kurpakus-Wheater M 2004. Thymosin β 4 stimulates laminin-5 production independent of TGF-beta. *Experimental Cell Research* 293(1):175-83
- Tan C, Cruet-Hennequart S, Troussard A, Fazli L, Costello P, Sutton K, Wheeler J, Gleave M, Sanghera J & Dedhar S 2004. Regulation of tumor angiogenesis by integrin-linked kinase (ILK). *Cancer Cell* 5: 79-90
- Tano K, Mizuno R, Okada T, Rakwal R, Shibato J, Masuo Y, Ijiri K & Akimitsu N 2010. MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes. *FEBS Letters* 584 (22): 4575–80
- Thiesen HJ 1990. Multiple genes encoding zinc finger domains are expressed in human T cells. *New Biology* 2(4):363-74
- Venables JP 2004. Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Research* 64 (21): 7647-7654
- Venables JP 2006. Unbalanced alternative splicing and its significance in cancer. *Bioessays* 28 (4): 378-86
- Wang HY, Lin W, Dyck JA, Yeakley JM, Songyang Z, Cantley LC & Fu XD 1998. 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* 140: 737-750
- Wang Z, Rolish ME, Yeo G, Tung V, Mawson M & Burge CB 2004. Systematic Identification and Analysis of Exonic Splicing Silencers. *The Journal of Cell Biology* 119 (6): 831-845
- Wang W, Budhu A, Forgues M, Wang XW 2005. Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nature Cell Biology* 7:823–830
- Wang Z, Xiao X, Van Nostrand E & Burge CB 2006. General and Specific Functions of Exonic Splicing Silencers in Splicing Control. *The Journal of Cell Biology* 23 (1): 61-70
- Ward AJ & Cooper TA 2010. The pathobiology of splicing. *The Journal of Pathology* 220 (2): 152-63
- Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ & Bar-Sagi D 1999. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nature Cell Biology* 1:20–26
- Wu MH, Chang JH & Yung BY 2002. Resistance to UV-induced cell-killing in nucleophosmin/B23 over-expressed NIH 3T3 fibroblasts: enhancement of DNA repair and up-regulation of PCNA in association with nucleophosmin/B23 overexpression. *Carcinogenesis* 23:93–100
- Xiong X, Zhao Y, He H & Sun Y. Ribosomal protein S27-like and S27 interplay with p53-MDM2 axis as a target, a substrate and a regulator. *Oncogene* 30(15):1798-811
- Yu Y, Maggi LB, Jr, Brady SN, Apicelli AJ, Dai MS, Lu H & Weber JD 2006. Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export. *Molecular Cell Biology* 26:3798–3809

Yun CY & Fu XD 2000. Conserved SR protein kinase functions in nuclear import and its action is counteracted by arginine methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology* 150 (4): 707-18

Yun C, Wang Y, Mukhopadhyay D, Backlund P, Kolli N, Yergey A, Wilkinson KD & Dasso M 2008. Nucleolar protein B23/nucleophosmin regulates the vertebrate SUMO pathway through SENP3 and SENP5 proteases. *The Journal of Cell Biology* 183 (4): 589-95

Zahler AM, Lane WS, Stolk JA & Roth MB 1992. SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes & Development* 6: 837-847

Zhang Y & Xiong Y 1999. Mutations in human ARF exon 2 disrupt its nucleolar localization and impair its ability to block nuclear export of MDM2 and p53. *Molecular Cell* 3:579-591

















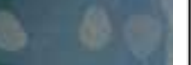















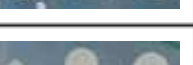
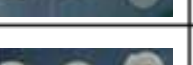




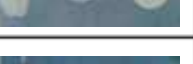


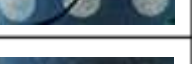
Zhang J, de Toledo SM, Pandey BN, Guo G, Pain D, Li H & Azzam EI 2012. Role of the translationally controlled tumor protein in DNA damage sensing and repair. *Proceedings of National Academy of Science* 109(16):E926-33

Zheng Y, Fu XD & Ou JH 2005. Suppression of hepatitis B virus replication by SRPK1 and SRPK2 via a pathway independent of the phosphorylation of the viral core protein. *Virology* 342(1):150-8










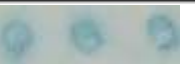
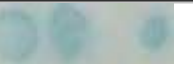








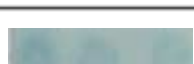


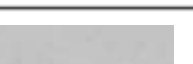


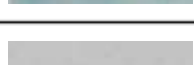
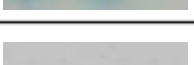




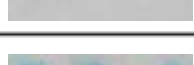





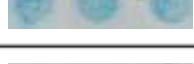
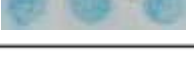


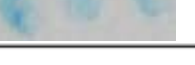
Zhou Z, Qiu J, Liu W, Zhou Y, Plocinik RM, Li H, Hu Q, Ghosh G, Adams JA, Rosenfeld MG & Fuemail X-D 2012. The Akt-SRPK-SR Axis Constitutes a Major Pathway in Transducing EGF Signaling to Regulate Alternative Splicing in the Nucleus. *Molecular Cell* 47(3): 422-433

APÊNDICE A – Ensaios de transativação dos genes repórteres

Quadro A1 – Ensaio de transativação do gene repórter his3





























































Controles	Concentração de 3AT					
	0mM	5mM	10mM	20mM	30mM	50mM
pBTM116K \otimes						
pBTM116K/S-SRPK2						
pBTM116K \otimes + pGAD424 \otimes						
pBTM116K/S-SRPK2 + pGAD424 \otimes						
pBTM116K/Ki-1/57 + pGAD424 \otimes						
pBTM116K/Ki-1/57 + pACT2/RACK1						
pBTM116K/Ki-1/57 + pGAD424/SFRS9						
























































Quadro A2 - Ensaio de transativação do gene repórter lacZ

Controles	Concentração de 3AT					
	0mM	5mM	10mM	20mM	30mM	50mM
pBTM116K \otimes						
pBTM116K/S-SRPK2						
pBTM116K \otimes + pGAD424 \otimes						
pBTM116K/S-SRPK2 + pGAD424 \otimes						
pBTM116K/Ki-1/57 + pGAD424 \otimes						
pBTM116K/Ki-1/57 + pACT2/RACK1						
pBTM116K/Ki-1/57 + pGAD424/SFRS9						

APÊNDICE B - Ensaio de ativação dos genes repórteres dos clones obtidos pelo screening com S-SRPK2

Quadro B1 - Ensaio qualitativo da ativação do gene repórter lacZ

1	2	3	5	6	8	9	10	11	12	13	14
											
15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
											
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	39
											
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
											
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
											

65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76
											
77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
											
89	90	91	92	93	94	95	96	99	100	101	102
											
103	104	105	106	107	108	109	110	111	113	114	115
											
116	117	118	119	pBTM \varnothing + pGAD \varnothing			pBTM Ki-1/57 + pGAD2 SFRS9		pBTM Ki-1/57 + pACT2 RACK1		
											

Quadro B2 - Ensaio quantitativo da ativação do gene repórter lacZ

Clone	D.O.600	D.O.420	Atividade β -gal		Clone	D.O.600	D.O.420	Atividade β -gal
S1	0,659	0,485	2,45		S43	1,115	2,441	7,30
S2	1,568	0,859	1,83		S44	1,739	0,158	0,30
S6	1,773	0,056	1,05		S46	1,124	2,623	7,78
S8	1,992	0,074	0,12		S47	1,024	1,253	4,08
S10	1,687	0,121	0,24		S48	1,010	1,363	4,50
S11	1,372	2,584	6,28		S51	1,053	2,015	6,38
S12	1,807	0,107	0,20		S53	0,920	2,652	9,61
S15	0,544	1,785	10,94		S55	0,928	2,054	7,38
S16	0,874	2,579	9,84		S57	0,990	0,984	3,31
S18	0,772	1,856	8,01		S58	1,154	1,513	4,37
S19	0,313	0,515	5,48		S59	1,042	1,814	5,80
S20	0,993	0,704	2,36		S60	0,512	2,699	17,00
S21	0,997	1,513	5,06		S61	1,226	2,539	6,90
S23	0,989	1,356	4,57		S62	1,826	0,156	0,28
S26	1,038	1,617	5,19		S63	1,015	1,414	4,64
S28	0,979	1,446	4,92		S64	1,216	3,000	8,20
S31	0,986	0,864	2,92		S65	1,084	2,589	7,96
S33	1,883	0,257	0,45		S66	1,168	2,992	8,54
S34	1,319	1,671	4,22		S67	1,195	0,718	2,00
S35	1,116	2,675	7,99		S68	1,181	1,724	4,87
S36	1,219	0,082	0,22		S69	1,002	2,275	7,57
S42	1,068	2,705	8,44		S70	1,984	0,224	0,38

S71	1,079	1,336	4,13		S99	0,891	2,330	8,72
S72	0,960	1,214	4,22		S100	0,831	2,112	8,47
S73	0,978	1,696	5,78		S101	0,456	1,306	9,5
S76	1,111	1,430	4,29		S102	1,079	3,000	9,27
S78	1,216	2,6	7,13		S103	1,086	3,000	9,21
S79	1,355	0,142	0,35		S104	0,871	3,000	11,48
S80	1,027	0,835	2,71		S105	1,276	3,000	7,84
S81	0,960	0,963	3,34		S106	1,019	3,000	9,81
S82	0,985	3,000	10,15		S107	1,103	3,000	9,07
S83	0,833	2,249	9,00		S108	1,015	2,902	9,53
S84	1,090	3,000	9,17		S109	1,292	3,000	7,74
S85	1,056	3,000	9,47		S110	0,879	1,788	6,78
S87	1,201	3,000	8,33		S111	0,946	2,502	8,82
S88	0,981	3,000	10,19		S113	1,519	3,000	6,58
S89	0,847	2,867	11,00		S114	1,077	3,000	9,29
S90	0,759	2,963	13,00		S115	0,877	2,327	8,84
S91	0,583	1,921	10,98		S116	0,972	1,501	5,15
S92	1,113	3,000	8,98		S117	1,054	2,363	7,47
S93	0,985	3,000	10,15		S118	0,972	1,957	6,71
S94	1,105	3,000	9,05		pBTMØ+pGADØ	1,008	0,089	0,29
S95	0,892	3,000	11,21		pBTM Ki-1/57+ pACT2 RACK1	0,667	0,334	1,67
S96	1,113	3,000	8,98		pBTM Ki-1/57+ pGAD SFRS9	0,955	0,111	0,39

*Os rachurados são aqueles que foram descartados por não atingirem os valores de referência positivos

Quadro B3 – Ensaio de ativação do gene repórter his3. Ensaio de tolerância do crescimento na ausência de histidina.

[] de 3AT	Clone 1	Clone 2	Clone 6	Clone 11	Clone 15	Clone 16	Clone 18	Clone 19
30 mM								
50 mM								
70 mM								
100 mM								
[] de 3AT	Clone 20	Clone 21	Clone 23	Clone 26	Clone 28	Clone 31	Clone 33	Clone 34
30 mM								
50 mM								
70 mM								
100 mM								
[] de 3AT	Clone 35	Clone 42	Clone 43	Clone 46	Clone 47	Clone 48	Clone 51	Clone 53
30 mM								
50 mM								
70 mM								
100 mM								

[] de 3AT	Clone 55	Clone 57	Clone 58	Clone 59	Clone 60	Clone 61	Clone 63	Clone 64
30 mM								
50 mM								
70 mM								
100 mM								
[] de 3AT	Clone 65	Clone 66	Clone 67	Clone 68	Clone 69	Clone 71	Clone 72	Clone 73
30 mM								
50 mM								
70 mM								
100 mM								
[] de 3AT	Clone 76	Clone 78	Clone 80	Clone 81	Clone 82	Clone 83	Clone 84	Clone 85
30 mM								
50 mM								
70 mM								
100 mM								

[] de 3AT	Clone 87	Clone 88	Clone 89	Clone 90	Clone 91	Clone 92	Clone 93	Clone 94
30 mM								
50 mM								
70 mM								
100 mM								
[] de 3AT	Clone 95	Clone 96	Clone 99	Clone 100	Clone 101	Clone 102	Clone 103	Clone 104
30 mM								
50 mM								
70 mM								
100 mM								
[] de 3AT	Clone 105	Clone 106	Clone 107	Clone 108	Clone 109	Clone 110	Clone 111	Clone 113
30 mM								
50 mM								
70 mM								
100 mM								

[] de 3AT	Clone 114	Clone 115	Clone 116	Clone 117	Clone 118	Clone 119
30 mM						
50 mM						
70 mM						
100 mM						
[] de 3AT	Clone pBTM Ø + pGAD Ø		Clone pBTM Ki-1/57 + pAT2 RACK1		Clone pBTM Ki-1/57 + pGAD SFRS9	
30 mM						
50 mM						
70 mM						
100 mM						

APÊNDICE C – Resultado dos sequenciamentos realizados com os clones obtidos pelo screening com S-SRPK2.

QUADRO C1 – Clones em que a SRPK2 interage com regiões não codificadoras de proteína

Nº do clone	Nome da sequência/ ID da sequência	Região clonada e CDS da proteína	Nome da proteína	Sigla	ID do gene	Função atribuída	Referencias
S2	Homo sapiens proprotein convertase subtilisin/kexin type 7, mRNA (cDNA clone MGC:12699 IMAGE:4125594), complete cds/ BC006357.2	2852-3303 150-1925	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 7	PCSK7	9159	Processamento de precursores latentes de proteínas em seus produtos biologicamente ativos	Rousselet et al, 2011
S11	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 8q24, clone: KB1585F1, complete sequence/ AP005857.3	87127-86342 -	-	-	-	-	-
S16	Homo sapiens activator of basal transcription 1, mRNA (cDNA clone MGC:51778 IMAGE:5574755), complete cds/ BC048812.1	994-1374 39-857	Activator of basal transcription 1	ABT1	29777	Ativação da transcrição basal de promotores	Oda et al, 2000
S20	Homo sapiens PAC clone RP5-1119N5 from 14q24.3, complete	95073-94212 -	-	-	-	-	-

	sequence/ AC004968.1						
S43	Homo sapiens isolate 5151204 mitochondrion, complete genome/ KF162227.1	2118-2992 -	-	-	-	-	-
S47	Human DNA sequence from clone RP11-85A1 on chromosome 10, complete sequence/ AL353719.10	72134-71761 -	-	-	-	-	-
S51	Homo sapiens bestrophin 1 (BEST1), RefSeqGene on chromosome 11/ NG_009033.1	20231-19683 19844-20008, 20104-20229, 20486-20632	Ferritin, heavy polypeptide 1	FTH1	2495	Estocagem de ferro em estado solúvel e não-tóxico	Boyd et al, 1985
S57.1	Homo sapiens bestrophin 1 (BEST1), RefSeqGene on chromosome 11/ NG_009033.1	20231-19684 19844-20008, 20104-20229, 20486-20632	Ferritin, heavy polypeptide 1	FTH1	2495	Estocagem de ferro em estado solúvel e não-tóxico	Boyd et al, 1985
S58	Homo sapiens clone BN2 mitochondrion, complete genome/ EF114275.1	2017-2325 -	-	-	-	-	-
S60	Homo sapiens isolate HGDP00722 mitochondrion, complete genome/ KJ445926.1	1685-2402 -	-	-	-	-	-
S61	Homo sapiens chromosome 17, clone hRPC.971_F_3, complete sequence/ AC004150.8 AC004150	63974-64742 -	-	-	-	-	-

S63	Homo sapiens chromosome 17, clone hRPC.971_F_3, complete sequence/ AC004150.8 AC004150	63974-64751 -	-	-	-	-	-
S65	Homo sapiens chromosome 19 clone CTD-3116E22, complete sequence/ AC008759.9	37220-36365 -	-	-	-	-	-
S69	Homo sapiens autism susceptibility candidate 2 (AUTS2), RefSeqGene on chromosome 7/ NG_034133.1	1118522-1119383 -	-	-	-	-	-
S71	Homo sapiens myeloid cell leukemia 1 (MCL1), RefSeqGene on chromosome 1/ NG_029146.1	8926-9768 5209-5896, 6248-6495, 7248-7364	Myeloid cell leukemia 1	MCL1	4170	Este gene sofre splicing alternativo, no qual o produto mais longo (isoforma 1) aumenta a sobrevivência celular inibindo a apoptose, enquanto os produtos mais curtos (isoforma 2 e isoforma 3) promovem apoptose e são indutores de morte.	Kozopas et al, 1993, Bae et al, 2000 e Fujise et al, 2000
S81	Homo sapiens chromosome 19 clone CTC-483I11, complete sequence/ AC008532.7	128199-129049 -	-	-	-	-	-
S84	Human DNA sequence from clone RP11-168O16 on chromosome 1, complete sequence/ AL358473.10	38710-37853 -	-	-	-	-	-
S85	BAC sequence from the SPG4	93453-94306	-	-	-	-	-

	candidate region at 2p21-2p22 BAC 559D11 of library RPCI-11 from chromosome 2 of Homo sapiens (Human)/ AL133243.3	-					
S87	Homo sapiens Rho GTPase activating protein 26 (ARHGAP26), RefSeqGene on chromosome 5/ NG_016711.1	445085-445935 441472-441747, 448271-448362	Rho GTPase activating protein 26	ARHGA P26	23092	Proteína ativada por GTPase que se liga a cinases de adesão focal e media a atividade de proteínas de ligação a GTP RhoA e Cdc42.	Hildebrand, Taylor & Parsons, 1996
S88	Homo sapiens GrpE-like 1, mitochondrial (E. coli) (GRPEL1), mRNA/ NM_025196.2	885-1502 42-695	GrpE-like 1, mitochondrial (E. coli)	GRPEL1	80273	DnaJ e GrpE juntos estimulam a atividade ATPase de DnaK. GrpE se liga ao domínio ATPase de DnaK desencadeando a liberação de ADP, acelerando assim a dissociação do substrato.	Choglay et al, 2001 e Liberek et al, 1991
S89	Homo sapiens chromosome 5 clone CTC-458I2, complete sequence/ AC010260.7	50287-49430 -	-	-	-	-	-
S90	Homo sapiens glycoprotein VI (platelet) (GP6), RefSeqGene on chromosome 19/ NG_031963.1	16363-16656 15403-15687, 17994-18047	Glycoprotein VI	GP6	51206	Receptor para colágeno e exerce um papel crítico na agregação de plaquetas induzida por colágeno e formação de trombos.	Ezumi, Uchiyama & Takayama, 2000
S94	Homo sapiens chromosome 19 clone CTC-246B18, complete sequence/ AC011445.6 AC011445	115918-115163 -	-	-	-	-	-

S99	Homo sapiens BAC clone RP11-342I1 from 4, complete sequence/ AC108053.3	34720-33866 -	-	-	-	-	-
S100	Homo sapiens G protein-coupled receptor kinase interacting ArfGAP 2 (GIT2), RefSeqGene on chromosome 12/ NG_029885.1	12929-13076 12322-12427, 17696-17782	G protein-coupled receptor kinase interacting ArfGAP 2	GIT2	9815	Regula a dinâmica do citoesqueleto e participa na internalização de receptores e tráfego de membrana. Reprime a extensão lamelipodial e a renovação adesões focais, e é pensado estar regulando a motilidade celular.	Premont et al, 2000 e Hoefen & Berk, 2006
S103	Homo sapiens BAC clone RP11-299H21 from 2, complete sequence/ AC013722.8	184457-185338 180200-180397, 188222-188265	-	-	-	-	-
S104	Human DNA sequence from clone RP11-502H18 on chromosome 1, complete sequence/ AL390718.11	112734-113072 -	-	-	-	-	-
S105	Homo sapiens CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain, mRNA (cDNA clone MGC:31825 IMAGE:4853578), complete cds/ BC018726.1	895-1327 12-710	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	CD74	972	Regula a apresentação de antígenos para resposta imune. Também serve como um receptor de superfície celular para citocina de macrófagos MIF (migration inhibitory factor) que, quando se liga a proteína codificada, inicia a	Kudo et al, 1985 e Calandra & Roger, 2003

						via de sobrevivência e proliferação celular. Esta proteína também interage com APP (amyloid precursor protein) e suprime a produção de amiloide β (Abeta).	
S107	Homo sapiens 3 BAC RP11-572O6 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence/ AC141002.8	88620-89099 -	-	-	-	-	-
S109	Homo sapiens ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2 (brefeldin A-inhibited) (ARFGEF2), RefSeqGene on chromosome 20/ NG_011490.1	15262-16134 5153-5273, 24462-24492	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2 (brefeldin A-inhibited)	ARFGEF 2	10564	Exerce um papel no tráfego intracelular de vesículas. Está envolvida na ativação de ARFs acelerando a substituição de GDP ligado a GTP e está envolvida no transporte de Golgi.	Sheen et al, 2004
S113	Homo sapiens haplogroup I2a mitochondrion, complete genome/ KM052373.1	4426-5314 4472-5513	ND2 - NADH dehydrogenase subunit 2	-	-	-	-
S116	Homo sapiens chromosome 5, P1 clone 632A8 (LBNL H29), complete sequence/ AC004749.1	2350-1896 -	-	-	-	-	-
S117	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4128378, ***** WARNING:	22-845 -	Tumor protein, translationally-controlled	TPT1	7178	Relacionado a crescimento celular progressão do ciclo celular,	Lucibello et al, 2011; Zhang et al,

	chimeric clone ****/ BC007842.1		1			transformação maligna e inibição da apoptose. Como molécula extracelular exerce um importante papel em células imunes.	2012 & Kaarbø et al, 2013
S118	Homo sapiens PRO1859 mRNA, complete cds/ AF132202.2	726-303 394-561	Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)	MALAT 1	378938	Regula a expressão de genes associados a metástase. Também regula positivamente a motilidade celular através da regulação transcricional e/ou pós-transcricional de genes relacionados a motilidade.	Tano et al, 2010 e Gutschner et al, 2013