

ISABELLE BEZERRA CORDEIRO

Estudos proteômicos revelam um novo papel da proteína

FAK na regulação do splicing do mRNA

CAMPINAS - SP

2014

ii





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

Isabelle Bezerra Cordeiro

Estudos proteômicos revelam um novo papel da proteína

FAK na regulação do splicing do mRNA

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Dr. Kleber Gomes Franchini

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA ISABELLE BEZERRA CORDEIRO E ORIENTADA PELO DR. KLEBER GOMES FRANCHINI,

1 auch

CAMPINAS - SP 2014 Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca do Instituto de Biologia Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

 Cordeiro, Isabelle Bezerra, 1983-Estudos proteômicos revelam um novo papel da proteína FAK na regulação do *splicing* do mRNA / Isabelle Bezerra Cordeiro. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.
 Orientador: Kleber Gomes Franchini. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
 1. Imunoprecipitação. 2. Interatoma. 3. Espectrometria de massas. 4. Proteínatirosina quinases de adesão focal. I. Franchini, Kleber Gomes, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Proteomic studies reveals new functions of FAK as regulator of mRNA splicing Palavras-chave em inglês: Immunoprecipitation Interactome Mass spectrometry Focal adhesion protein-tyrosine kinases Área de concentração: Bioquímica Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular Banca examinadora: Kleber Gomes Franchini [Orientador] Celso Eduardo Benedetti Gabriela Vaz Meirelles Fabio Marcio Squina Deborah Schechtman Data de defesa: 03-07-2014 Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

BANCA EXAMINADORA

Dr. Kleber Gomes Franchini (orientador)

Dr. Celso Eduardo Benedetti

<u>andu'ni</u> itura Kleben

Assinatura

UsoBue a

Assinatura

Gabriela des mairelles Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Dra. Gabriela Vaz Meirelles

Dr. Fabio Marcio Squina

Profa. Dra. Deborah Schechtman

Dra. Carolina Fernanda Manfredi Zambon Clemente

Dr. Mário Tyago Murakami

Profa. Dra. Carmen Verissima Ferreira Halder

DEDICATÓRIA

À minha família

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini, pelo seu exemplo de amor à Ciência, pela oportunidade, confiança e apoio nessa jornada.

À Dra. Adriana Franco Paes Leme e o grupo Massas, pelo apoio e total suporte nas análises por espectrometria de massas.

Ao Dr. Jorg Kobarg e Ângela Saito, pelo apoio e auxílio com os experimentos de *splicing*.

Ao amigo MSc.Sílvio Consonni, pelo entusiasmo, apoio e suporte na obtenção das imagens de microscopia confocal.

À Dra. Aline Mara, pela amizade, orientação e apoio durante a realização dos experimentos.

À incansável MSc. Renata Rocha, pelo auxílio e apoio na construção das linhagens permanentes de FAK.

Aos meus amigos do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular e de Biociências, Ana Paula, Ana Helena, Alisson, Estela, Maruska, Michelle, João, Carla, Carlos, Érico, Jamilson, Leandro, Danieli, Talita, Raphael, Silvana, Márcia por proporcionarem um ambiente agradável de trabalho, sempre com boas sugestões.

Aos meus queridos pais, José Pedro Cordeiro e Geny Cordeiro, por serem um exemplo de vida para mim. Às minhas irmãs amadas Michelle, Emmanuelle e Giselle pelas motivações do dia-a-dia. Aos meus avós, pelos incansáveis telefonemas que amenizavam as saudades. À minha sogra Maria Souza, por suas palavras positivas e motivadoras sempre.

Ao meu amado esposo Ricardo Souza, pelo apoio inestimável, companheirismo e garra em abraçar o doutorado juntamente a mim.

Ao Laboratório Nacional de Biociências, por proporcionar a execução dos experimentos.

À Unicamp

À FAPESP, pela concessão da bolsa.

"Cedo ou tarde você vai perceber, como eu, que há uma diferença entre conhecer o caminho e percorrer o caminho." (The Matrix)

RESUMO

A proteína Focal Adhesion Kinase (FAK; PTK2) participa de vários processos celulares. A identificação das proteínas parceiras de FAK tem contribuído para o entendimento de suas múltiplas funções celulares. Utilizando um sistema de indução de FAK fusionada a uma cauda de FLAG, combinada com análises por espectrometria de massas (MS), identificamos proteínas associadas à FAK em células HEK293. Um total de 153 proteínas foram repetidamente identificadas com alta resolução por experimentos de MS. Além de confirmar interações já previamente descritas como Paxillin (PXN), Heat shock protein Hsp90 (HSP90) e Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein (TGFB111), as análises por MS revelaram um novo conjunto de proteínas associadas à FAK, incluindo proteínas envolvidas nas vias de síntese de proteínas, expressão gênica, crescimento celular, proliferação, morte e sobrevivência celular. Além disso, análises de bioinformática das vias indicaram que a FAK se associa com um conjunto de 30 proteínas envolvidas com a via de modificação pós-transcricional do RNA, incluindo a proteína Serine/arginine-rich splicing factor 2 (SC-35; SRSF2), que é um marcador de speckles nucleares. Esse conjunto de proteínas está associado ao spliceossomo e um conjunto similar de proteínas também foi identificado com os experimentos que utilizaram somente o domínio FERM da FAK. Validações por Western Blotting e imunocitoquímica demonstraram que FAK se associa e colocaliza com a proteína SC-35 no núcleo celular. Ainda identificamos um papel funcional da FAK no splicing do mRNA. Demonstramos que FAK pode modificar o padrão de splicing de um gene repórter E1A ao ser superexpressa em células HEK. Nosso trabalho propõe novas funções da FAK no núcleo, indicando que esta pode estar envolvida em eventos relacionados à função do RNA, como a regulação do *splicing* do mRNA.

Palavras-chave: Focal adhesion kinase, imunoprecipitação, interatoma, espectrometria de massas

ABSTRACT

Focal adhesion kinase (FAK; PTK2) has roles in many cellular processes. The identification of protein partners for FAK has greatly contributed to our understanding of its multiple function. Using inducible FLAG-tagged FAK combined with affinity/purification mass spectrometry (MS) approach, we identified proteins associated with FAK in HEK293 cells. A total of 153 proteins were repeatedly detected in highresolution MS measurements. Beyond the well characterized partnering with Paxillin (PXN), Heat Shock protein 90 (HSP90) and Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein (TGFB111), analysis of MS data uncovered novel sets of proteins that associate with FAK, playing a role in protein synthesis, gene expression, cellular growth, proliferation, death and survival. In addition, the network analysis established the unexpected finding that a module of 30 proteins linked to RNA post-transcriptional modifications are recruited by FAK, including Serine/arginine-rich splicing factor 2 (SC-35; SRSF2), which is a marker of the nuclear speckles. Indeed, this module is found to be enriched by proteins associated with spliceosome. Remarkably, a similar set of proteins was also recruited by FAK N-terminal FERM domain. Biochemical and imunofluorescence validations established that FAK associates and co-localizes with SC-35 protein at the cell nuclei. We further pinpoint a functional role of FAK in mRNA splicing. We showed that FAK can modify the splicing site selection of the adenoviral E1A minigene in a dosedependent manner. Our work provides new insights into the molecular function of FAK in the nucleus, indicating that it may be involved in events related to RNA function, such as pre-mRNA splicing.

Keywords: Focal adhesion kinase, immunoprecipitation, interactome, mass spectrometry.

Sumário

1.INTRODUÇÃO
1.1. A proteína FAK (Focal Adhesion Kinase)
1.2. Funções da FAK no núcleo
1.3. O Splicing alternativo
2.OBJETIVOS
OBJETIVO GERAL
OBJETIVOS ESPECÍFICOS55
3.MATERIAL E MÉTODOS
3. 1. MATERIAL
3.1.1. Reagentes químicos e soluções59
3.1.2. Reagentes gerais
3.1.3. Anticorpos
3.1.4. Kits
3.1.5. Reagentes de Cultura de Células62
3.2. MÉTODOS
3.2.1. Geração das linhagens HEK Flp-In e indução da superexpressão da proteína
FAK64
3.2.2. Extração de proteínas69
3.2.3. Western Blotting
3.2.4. Coloração pelo nitrato de prata71
3.2.5. Imunoprecipitação dos extratos citosólicos e nucleares provenientes de células
Flp-in com superexpressão de FAK fusionada à sequência FLAG

3.2.6. Digestão e análise por espectrometria de massas	3
3.2.7. Análise por espectrometria de massas e processamento dos dados obtidos74	4
3.2.8. Transfecção do gene repórter em células FAK Flp-in induzíveis	6
3.2.9. Extração total do RNA e síntese do cDNA7	7
3.2.10. Análise dos fragmentos por PCR	8
3.2.11. Marcação por imunofluorescência das células HEK Flp-In que superexpressam FAK	ı 8
4.RESULTADOS	1
4.1. As células FLAG-FAK- <i>Flp-In</i> 8	3
4.2. Padronização da superexpressão de FAK em células <i>Flp-In</i> 8.	5
4.3. Extração de proteínas por fracionamento celular8	7
4.4. Obtenção dos extratos citosólicos e nucleares das células com superexpressão de	
FLAG-FAK	8
4.5. Imunoprecipitação dos extratos citosólicos e nucleares com o uso do anticorpo anti- <i>Flag</i> acoplado à resina de agarose	9
4.6. Identificação das proteínas por espectrometria de massas	2
4.6.1. Análises da localização subcelular e classes das proteínas identificadas9	2
4.6.2. Análise das funções celulares e moleculares com o uso do programa Ingenuity9.	5
4.7. Validação das proteínas identificadas por Western Blotting10	
	0
4.8. A via de modificação pós-transcricional do RNA10	0
4.8. A via de modificação pós-transcricional do RNA104.9. FAK influencia o <i>splicing</i> do gene repórter E1A10	0 1 6
 4.8. A via de modificação pós-transcricional do RNA	0 1 6 8
 4.8. A via de modificação pós-transcricional do RNA	0 1 6 8 3

4.13. Avaliação da especificidade do sistema FLAG-Flp-In para os experimentos de
imunoprecipitação117
5.DISCUSSÃO
5.1. A superexpressão de FAK em células <i>Flp-In</i> leva à sua ativação
5.2. Ensaios de imunoprecipitação identificam proteínas da via de modificações do
RNA interagindo com FAK124
5.3. FAK e seu domínio FERM interagem com fatores de splicing 126
5.4. O papel de FAK na regulação do <i>splicing</i> do gene repórter E1A130
6.CONCLUSÃO
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
8.APÊNDICES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografias de diferentes tipos celulares (H9C2, C2C12, cardiomiócitos e
fibroblastos) com distribuição da proteína FAK
Figura 2. Os domínios da proteína FAK e seus sítios de fosforilação
Figura 3. A proteína FAK contém sequências de localização nuclear (NLS) e de exportação
nuclear (NES)
Figura 4. Representação do motivo LXXLL na porção C-terminal da FAK, entre os resíduos de aminoácidos 955 - 973
Figura 5. Representação esquemática das reações de transesterificação do <i>splicing</i> e também das sequências conservadas que definem o começo e fim do íntron45
Figura 6. Representação esquemática de proteínas envolvidas nas reações de transesterificação do <i>splicing</i>
Figura 7. Representação esquemática dos domínios RRM presentes nas proteínas SR 49
Figura 8. Representação esquemática dos domínios presentes nas proteínas hnRNPs50
Figura 9. Representação esquemática dos experimentos desenvolvidos no projeto com os principais tópicos destacados
Figura 10. Esquema ilustra a construção das células HEK Flp-In induzíveis com tetraciclina e a clonagem do gene de interesse
Figura 11. Esquema da indução da expressão de proteínas cujos genes estão clonados em plasmídeos do sistema T-Rex
Figura 11. Representação esquemática da sequência de aminoácidos do peptídeo Flag72
Figura 12. Diagrama do gene repórter E1A nos quais os eventos de <i>splicing</i> geram as isoformas 13S, 12S, 10S e 9S, com o tamanho dos seus respectivos produtos de PCR (em
pb)76

Figura 14. Microscopia confocal de células FLAG-FAK- <i>Flp-In</i>
Figura 15. <i>Western Blotting</i> e gráfico representativos dos extratos protéicos provenientes de tratamentos com diferentes concentrações de tetraciclina em células FLAG-FAK- <i>Flp-In</i> . 85
Figura 16. Análise por <i>Western Blotting</i> de extrato total (50 µg de proteína) das células FAK <i>Flp-in</i> que superexpressam a proteína FAK (+tet) e não induzidas (-tet) em três experimentos independentes
Figura 17. Extratos citosólicos e nucleares das células FAK-Flp-In para avaliar o enriquecimento dos extratos nucleares e citosólicos com o uso dos anticorpos anti-GAPDH e anti-Histona H3
 Figura 18. Western Blotting dos extratos citosólicos (A) e nucleares (B)
Figura 20. Géis de poliacrilamida 10% impregnados por nitrato de prata contendo as amostras imunoprecipitadas com anticorpo anti-FLAG
Figura 20. Localização subcelular das proteínas imunoprecipitadas com FLAG-FAK93 Figura 21. Representação gráfica das classes de proteínas identificadas no complexo imunoprecipitado com FLAG-FAK, utilizando-se a ferramenta de classificação PantherDB.
Figura 23. Distribuição das proteínas nas funções celulares e moleculares, segundo classificação obtida pelo <i>Ingenuity</i>
Figura 24. Representação esquemática das proteínas identificadas (somente as identificadas, sem interações indiretas) em suas respectivas localizações subcelulares e com conexões já descritas na literatura
Figura 25. Validação por <i>Western Blotting</i> de proteínas co-imunoprecipitadas com FAK.

Figura 26. Rede de interação das proteínas ligantes de FAK envolvidas na via de
modificação pós-transcricional do RNA
Figura 27. Eletroforese em gel de agarose e quantificação do padrão de splicing dos
transcritos de mRNA provenientes do gene repórter transfectado em células HEK FLAG-
FAK <i>Flp-In</i> 107
Figura 28. Células FERM <i>Flp-In</i> e interatoma109
Figura 29. O interatoma de FERM
Figura 30. Eletroforese em gel de agarose e representação gráfica do padrão de <i>splicing</i> dos
transcritos de mRNA provenientes do gene repórter transfectado em células HEK 293
FERM- <i>Flp-In</i>
Figura 31. Western Blotting representativos da interação entre SRSF1 e FAK113
Figura 32. Microscopia confocal das células FLAG-FAK-Flp-In
Figura 33. Validação por imunoprecipitação e <i>western blot</i> da interação entre FAK e a proteína Sc-35
1
Figura 34. Caracterização das células FLAG-CryAB- <i>Flp-In</i> e seu interatoma118
Figura 35. Eletroforese em gel de agarose e representação gráfica do padrão de splicing dos
transcritos de mRNA do gene repórter transfectado em células HEK 293 FLAG-CryAB-
<i>Flp-In</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. As sete principais vias (com score maior que 10) mapeadas pelo programa
Ingenuity [™] com as proteínas identificadas por espectrometria de massas dos ligantes de
FAK97
Tabela 2. Proteínas associadas ao processamento do RNA, identificadas nas frações
imunoprecipitadas com FAK101
Tabela 3. Principais vias identificadas com as proteínas imunoprecipitadas com
CryAB119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-MS	Affinity-purification coupled with Mass Spectrometry
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	Fita de DNA complementar
CELF	<u>C</u> UG-BP and <u>E</u> lav- <u>L</u> ike- <u>F</u> amily proteins
CID	Collision Induced Dissociation
CryAB	αβ-cristalina
Da	Dalton
DAPI	4´-6-Diamino-2-Phenylindole
DDA	Data Dependent Acquisition
DEPC	DiEthyl PyroCarbonate
DMEM	Dulbelcco´s Modified Eagle´s Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxy-Nucleo Triphosphate
DTT	1,4 Dithiothreitol
E1A	Encoding region 1 of Adenoviral
EDTA	EthyleneDiamine Tetraacetic Acid
ELAV	<u>E</u> mbryonic <u>L</u> ethal <u>A</u> bnormal <u>V</u> ision type RNA family proteins
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase

ESE	Exonic Splicing Element
FAK	Focal Adhesion Kinase
FAT	Focal-Adhesion Targeting
FERM	protein 4.1, ezrin, radixin and moesin homology
FP-1	Peptídeo ativador de FAK
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GO	Gene Ontology
Grb2	Growth Factor Receptor-Bound Protein
hnRNPS	Heterogenous RiboNucleoProteins
IAA	IodoAcetAmide
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
kDA	KiloDalton
MgCl2	Cloreto de Magnésio
miRNA	microRNA
mRNA	messenger RNA
MS	Mass Spectrometry
NES	Nuclear Export Signal
NLS	Nuclear Localization Signal
PantherDB	Panther Data Base Classification System

pb	pares de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction - Reação de Polimerização em Cadeia
ppm	partes por milhão
primer AS	primer AntiSense
primer S	primer Sense
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay - tampão para lise de proteínas
RNA	RiboNucleic Acid - Ácido Ribonucleico
RRM	RNA Recognition Motif
Sc-35	Splicing component 35 kDa
SF	Splicing Factor
SFB	Soro Fetal Bovino
SR	Serine and Arginine (R)
SRPK	Serine-Arginine (R) Protein Kinase
SRSF1	Serine-Arginine (R) Splicing Factor 1
Tyr	Tirosina
UA	Unidades Arbitrárias

1.INTRODUÇÃO

1.1. A proteína FAK (Focal Adhesion Kinase)

A proteína *Focal Adhesion Kinase* (FAK; PTK2) é uma tirosino-quinase do tipo não receptor, expressa na maioria dos tecidos e tipos celulares (Fig. 1) e identificada em 1992 (HANKS *et al.*, 1992). Os trabalhos iniciais identificaram a sua localização nos sítios de adesão focal, associadas com integrinas. As integrinas são proteínas importantes na transdução de sinais da matriz para o interior da célula, permitindo à célula regular processos complexos como migração, diferenciação, crescimento e morte celular, em função do meio que a circunda (SCHWARTZ, 2010). Apesar dos mecanismos relacionados à sinalização intracelular por integrinas não estarem totalmente elucidados, sabe-se que a proteína de adesão focal, FAK, apresenta um papel central nesta rede de sinalização (SCHWARTZ, 2010).

Além de sua localização nos sítios de adesão focal (Fig. 1A), a proteína FAK encontra-se expressa no compartimento citosólico da célula (Fig. 1B) e também apresenta uma distribuição sarcomérica (Fig. 1C) em cardiomiócitos.

A proteína FAK participa de vários processos celulares, como adesão, proliferação, sobrevivência, organização do citoesqueleto, além de exercer papel biológico no desenvolvimento vascular, formação de dendritos, induzir hipertrofia cardíaca, fibrose e câncer epitelial (LUO & GUAN, 2010; FRANCHINI, 2012; FRAME *et al.*, 2010).



Figura 1. Fotomicrografias de diferentes tipos celulares (H9C2, C_2C_{12} , cardiomiócitos e fibroblastos) com distribuição da proteína FAK. As setas indicam a localização da proteína FAK nos sítios de adesão focal. Marcação com anticorpo anti-FAK (em verde), faloidina (em vermelho). Os campos em amarelo são sobreposições das marcações de anti-FAK e faloidina. A escala indicada pela barra branca é de 10µm. As imagens foram obtidas no aumento de 63x, com um zoom óptico de 1,60. Imagens do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular (FCM).

Os processos biológicos do qual FAK participa estão relacionados aos seus domínios. A FAK possui três domínios: domínio FERM (*protein 4.1, Ezrin, Radixin and Moesin homology*), domínio quinase e domínio FAT (*Focal Adhesion Targeting*) (Fig. 1). O domínio FERM está localizado na porção N-terminal com funções na interação proteína-proteína, bem como na localização nuclear de FAK (JONES *et al.,* 2004; LIM *et al.,* 2008). Dentre os ligantes de FERM encontram-se a proteína *Neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein* (N-WASP; WASL) com funções de ativar o complexo Arp2/3. Esse complexo Arp2/3 é responsável por promover a ramificação da actina-F e também é uma proteína ligante de FERM. Além destes, a proteína *Vinculin* (VCL; VINC1) (WU *et al.,* 2004) e também regiões citoplasmáticas de receptores, como PDGFR (SIEG *et al.,* 2000),

EGFR (SIEG et al., 2000), e β-integinas (GUAN&SHALLOWAY, 1992; HYNES et al., 2002; SCHALLER et al., 1992) são ligantes. Estudos bioquímicos e cristalográficos demonstraram que o domínio FERM interage de forma autoinibitória com o domínio catalítico quinase (Fig. 2a) inibindo sua atividade enzimática e consequentemente, sua sinalização (LIETHA et al., 2007; DUNTY et al., 2004). Essa interação bloqueia o sítio ativo do domínio catalítico, impedindo o acesso do ATP e a exposição dos sítios de ligação. Não se sabe exatamente os mecanismos que promovem a autofosforilação de FAK, mas alguns já foram apontados, como os fatores neuro-humorais e o estresse biomecânico (PENG et al., 2006; EBLE et al., 2000; FRANCHINI et al., 2009). Esses estímulos promovem mudanças conformacionais entre o domínio FERM e quinase, levando à exposição do resíduo de tirosina 397 presente no *linker* entre esses domínios. Essa mudanca conformacional promove à autofosforilação de FAK no resíduo de tirosina 397 (CECCARELLI et al., 2006; LIETHA et al., 2007), recrutando e ativando a proteína Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (Src) (SCHALLER et al., 1994; WANG et al., 2011, FRANCHINI et al., 2009).

Com a ligação da proteína Src no resíduo de tirosina 397, ocorre uma cascata de fosforilações subsequentes nos múltiplos sítios de FAK (tirosinas 576, 577, 925) (Fig. 2b) e também, em outras proteínas como *Paxillin* (Pxn) e *Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1* (p130Cas; BCAR1) (TACHIBANA *et al.*, 1997; SCHALLER *et al.*, 1995). Src fosforila outros resíduos da FAK, inclusive os resíduos 576 e 577 promovendo sua ativação total. Src também fosforila a tirosina 925 da FAK, criando-se um sítio de ligação para o domínio SH2 da proteína *Growth factor Receptor-Bound protein* 2 (Grb2), que promove a ativação da proteína *Mitogen-activated protein kinase 1*(ERK 2; MAPK1) através do recrutamento e ativação da proteína Ras (SCHLAEPFER *et al.*, 1994). A

INTRODUÇÃO

tirosina 397 fosforilada também é um sítio de acoplamento para a fosfatidilinositídeo 3⁻OH-quinase (PI 3-quinase) (CHEN *et al.*, 1996) que ativa vias anti-apoptóticas mediadas pela AKT (SONODA *et al.*, 2000). Além destas, outras proteínas também podem ser ativadas pela ação da FAK como, por exemplo, a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK – *Mitogen-Activated Protein Kinase*) (ABBI&GUAN, 2002).

Em suma, quando FAK é autofosforilada, ela passa a interagir e regular a função de várias proteínas (CALALB *et al.*, 1995). Este evento é importante no recrutamento de proteínas para os sítios de adesão focal e também na reorganização do citoesqueleto.

Por fim, o domínio C-terminal está subdividido em duas regiões: o domínio FAT (constituído pelos 140 resíduos de aminoácidos finais de FAK) e uma região sem estrutura cristalográfica disponível, localizada entre os domínios catalítico e FAT (Fig 2b). A região FAT contém sítios de interação para várias proteínas como *Paxillin*, p130CAS, *Talin*, Grb2 (TURNER, 2000; SCHALLER, 2001; ABBI&GUAN, 2002). O domínio FAT é constituído por quatro α-hélices e é crítico para a localização de FAK nos pontos de adesão focal, por meio da ligação com paxilina. Além disso, este domínio é fundamental para a ancoragem de outras proteínas de sinalização, envolvida na migração, crescimento e proliferação celular (FRANCHINI, 2012). A Figura 2B ilustra os domínios da FAK e os principais resíduos de tirosina presentes sem sua estrutura. No banco de dados UNIPROT, a proteína FAK de *Mus musculus* possui 6 isoformas descritas, sendo a isoforma 3 o alvo desse estudo.


Figura 2. Os domínios da proteína FAK e seus sítios de fosforilação. (A) À esquerda, a estrutura cristalográfica dos domínios FERM e Quinase da FAK inativa. À direita, uma representação esquemática desses domínios, destacando os lobos F1, F2 e F3 do domínio FERM e a associação do lobo F2 com o domínio quinase. Modificado de FRANCHINI *et al.*, 2009. PDB entry: 2J0M (Lietha *et al.*, 2007). (B) Ilustração dos domínios e resíduos de tirosina da isoforma 3 da proteína FAK (1052 resíduos de aminoácidos). Os três domínios da FAK: FERM, quinase e FAT. O resíduo de autofosforilação, Y397 é inicialmente autofosforilado e promove a ligação de Src nesse sítio. Então, Src fosforila subsequentemente os resíduos presentes na alça de ativação, Y576 e Y577, e os resíduos Y861 e Y925 presentes na porção C-terminal. Modificado de Mitra *et al.*, 2005.

Trabalhos demonstram que a proteína FAK é ativada em miócitos cardíacos submetidos ao estresse mecânico (FRANCHINI *et al.*, 2000; DOMINGOS *et al.*, 2002; TORSONI *et al.*, 2003; FONSECA *et al.*, 2005; TORSONI *et al.*, 2005; NADRUZ *et al.* 2005). Esta proteína é rapidamente ativada e sabe-se que, em miócitos cardíacos adultos

provenientes de corações de ratos coarctados por 1 hora, há a migração da FAK dos sítios de adesão focal para os costâmeros e o núcleo (FONSECA *et al.*, 2005). Estudos têm demonstrado a importância desta proteína na sinalização em corações de ratos submetidos à sobrecarga pressórica (PENG *et al.*, 2006; FRANCHINI *et al.*, 2000; FONSECA *et al.*, 2005). Além disso, pesquisas vêm destacando um papel crucial da FAK no núcleo celular (SENYO *et al.*, 2007; OSSOVSKAYA *et al.* 2008; YI *et al.*, 2003) . Essas evidências indicam que a sinalização via estímulo mecânico é transmitida ao núcleo, onde alterações bioquímicas ou estruturais culminam em respostas funcionais (RICHARD *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2009). O complexo do poro nuclear presente na membrana externa do envoltório nuclear medeia o transporte de fatores de transcrição, proteínas do ciclo celular e de sinalização para o núcleo. Alterações nesse complexo após estímulos mecânicos podem regular a diferenciação, proliferação, dentre outros processos celulares (ALLEN *et al.*, 2000; BAGLEY *et al.*, 2000; RADU *et al.*, 1995).

1.2. Funções da FAK no núcleo

As primeiras evidências de FAK no núcleo datam de 2000 (LOBO & ZACHARY, 2000; JONES *et al.*, 2001). Neste último trabalho, os autores estudaram a influência de FAK na sinalização do EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) em glioblastomas e relataram que em células apoptóticas, havia a presença de FAK no núcleo, especificamente do seu domínio N-terminal. No trabalho de Lobo e Zachary, esse estudo se direcionou para o domínio N-terminal presente no núcleo de células endoteliais em apoptose. Os autores observaram que o domínio N-terminal estava presente no núcleo, enquanto que o domínio C-terminal, no citoplasma. Essa segregação em diferentes compartimentos levou os autores

sugerirem novas funções para o domíno N-terminal de FAK em células endoteliais (LOBO & ZACHARY, 2000).

Outros trabalhos ainda demonstraram a presença de FAK no núcleo, a citar em cardiomiócitos extraídos de ventrículos esquerdos de corações de ratos espontaneamente hipertensos (YI *et al.*, 2003) e também da sua proteína relacionada PYK2 em fibroblastos (AOTO *et al.*, 2002). Ainda, foi relatado que em cardiomiócitos de ratos neonatos em cultura submetidos a 30 minutos de estiramento havia grande quantidade de FAK no núcleo (SENYO *et al.*, 2007).

Estudos recentes demonstraram que FAK migra para o núcleo e se associa a proteínas presentes neste compartimento (CANCE & GOLUBOVSKAYA, 2008; LUO et al., 2009; LIM et al., 2012). Cance e Golubovskaya demonstraram que FAK e p53 interagem diretamente no núcleo (CANCE & GOLUBOVSKAYA, 2008). Por meio dessa interação FAK se associa à proteína MDM2 que promove à ubiquitinação e degradação de p53 (LIM et al., 2008; CANCE & GOLUBOVSKAYA, 2008; GOLUBOVSKAYA & CANCE, 2011). Dessa forma, foi proposto que a presença de FAK no núcleo está relacionada à regulação da proliferação e sobrevivência celulares. Estudos de LIM e colaboradores (2008) também observaram a presença de uma sequência de localização nuclear no lobo F2 do domínio FERM (NLS - Nuclear Localization Signal). Essa sequência é fundamental para a importação da proteína para o núcleo (LANGE et al., 2007). Trabalhos prévios também identificaram o recrutamento do domínio FERM da FAK para o núcleo de células leucêmicas (RBL-2H3) em resposta à ativação do receptor de membrana FceRI (JONES et al., 2004). Nesse trabalho, o tratamento com leptomicina B, um inibidor da exportação de proteínas do núcleo, levou a um acúmulo de FAK no núcleo.

Ainda outros estudos destacaram a existência de sequências de exportação nuclear na proteína FAK (NES - *Nuclear Export Signal*). As sequências NES geralmente são ricas em resíduos de leucina e medeiam a exportação de proteínas do núcleo para o citoplasma. A primeira sequência (NES1) encontra-se no lobo F1 do domínio FERM e a segunda (NES2), no domínio quinase (Fig. 3).



Figura 3. A proteína FAK contém sequências de localização nuclear (NLS) e de exportação nuclear (NES). Em (A) demonstra-se a uma representação esquemática dos 3 domínios principais de FAK (FERM, quinase e FAT) e a distribuição das sequências NLS, NES1 e NES2. FONTE: SCHALLER, 2010. Em (B) ilustram-se as sequências NLS, NES1 e NES2 na estrutura cristalográfica dos domínios FERM e Quinase. A região em vermelho representa o domínio FERM; a região em ciano representa o domínio Quinase. A sequência

NLS está destacada em azul marinho e as sequências NES1 e NES 2 estão destacadas em verde. PDB entry: 2JM0 (Lietha *et al.*, 2007).

FAK é expressa como uma proteína separada, denominada FRNK (*FAK Related Non-Kinase*), sendo produto de *splicing* alternativo. No trabalho de Yi e colaboradores (2006), foi observado que tanto FAK como FRNK encontravam-se no núcleo de cardiomiócitos. FAK se associou e teve co-localização com a proteína Sam68, uma proteína presente na subestrutura nuclear denominada Sam68/SML *Nuclear Bodies* e que co-localiza com fatores de *splicing*. Já a proteína FRNK se ligou à fibrilarina, uma proteína do nucléolo. Propô-se assim que essa associação com diferentes proteínas nucleares pode auxiliar na migração de FAK para o núcleo, tendo FAK e FRNK papéis nucleares distintos neste compartimento (YI *et al.*, 2006).

Como descrito em trabalhos prévios, cardiomiócitos isolados de ratos submetidos à coarctação da aorta (estreitamento da aorta com uso de um anel ajustável) por um período de uma hora foram marcados com anticorpo anti-FAK e analisados por imunofluorescência (FONSECA *et al.*, 2005). Essas células apresentavam uma distribuição de FAK no núcleo e região perinuclear pós-coarctação. Ainda, em extratos nucleares isolados dessas células, observou-se que as frações nucleares antes da sobrecarga pressórica não continham FAK, enquanto que as frações nucleares pós-coarctação continham essa proteína, indicando assim, uma migração de FAK para o núcleo após o estímulo (FONSECA *et al.*, 2005).

Também foi descrito que FAK migra para o núcleo de cardiomiócitos após tratamento com o peptídeo ativador de FAK (FP-1). Esse peptídeo reduz a interação inibitória entre FAK e a miosina sarcomérica e consequentemente aumenta sua ativação.

Análises de microscopia confocal demonstraram que ocorre uma redistribuição de FAK dos sarcômeros para o núcleo após o tratamento com FP-1 (SANTOS, 2011).

Nadruz e colaboradores demonstraram que FAK interage com o fator de transcrição MEF2, o qual atua na regulação da expressão de genes do programa hipertrófico em cardiomiócitos submetidos a estímulos mecânicos (NADRUZ-JR *et al.*, 2005). A interação entre FAK e MEF2 também foi descrita no núcleo de miócitos cardíacos de ratos submetidos à coarctação da aorta por 60 minutos (CARDOSO, 2008).

FAK também foi identificada no núcleo de células C_2C_{12} interagindo com a proteína MBD2 (*methyl CpG-binding protein 2*) (LUO *et al.*, 2009). Nesse trabalho foi observado que os complexos de FAK-MBD2 no núcleo levavam a uma reorganização da heterocromatina e diminuíam a associação de MBD2 com o complexo de proteínas histonas deacetilases (HDAC1) na região promotora do gene miogenina. Como consequência dessa associação ocorria um aumento da expressão da miogenina e consequentemente, diferenciação muscular.

Análises da sequencia de aminoácidos da FAK demonstraram a existência de um domínio LXXLL em sua porção C-terminal (Fig. 4) (CARDOSO, 2008). Esse é um domínio presente em α -hélices, no qual L representa leucina e X qualquer aminoácido. O domínio LXXLL tem função importante no reconhecimento dos receptores nucleares, e são conservados entre diferentes espécies (HEERY *et al.*, 1997; SAVKUR e BURRIS, 2004). Essa sequência também é encontrada em co-ativadores, que são proteínas responsáveis por aumentar a taxa de transcrição de genes alvos, por meio da ligação aos fatores de transcrição (NÄÄR *et al.*,2001). O número de sequências LXXLL varia consideravelmente entre os co-ativadores e é provável que isto contribua para a

42

especificidade dos co-ativadores na ligação a receptores nucleares (MCLNERNEY *et al.*, 1998). A descrição de sequencias LXXLL no domínio C-terminal da FAK indica que esta quinase pode interagir com receptores nucleares e dessa forma, participar do controle da atividade transcricional no núcleo de miócitos cardíacos e também em outros tipos celulares.



Figura 4. Representação do motivo LXXLL na porção C-terminal da FAK, entre os resíduos de aminoácidos 955 - 973. Em (A) apresenta-se os alinhamentos da sequencia contendo o motivo LXXLL presente no C-terminal de FAK com o LXXLL de receptores nucleares. Em (B), alinhamento das sequências de FAK demonstra a conservação do domínio LXXLL em diferentes espécies. O alinhamento foi realizado com o uso do programa ClustalW. * Indica resíduos de aminoácidos conservados entra as diferentes espécies.

Esses dados suportam a ideia de que a translocação nuclear de FAK pode exercer uma importante função na transdução do estímulo mecânico para esse compartimento celular, no entanto os mecanismos moleculares e bioquímicos pelos quais FAK atua ainda não foram elucidados. Dessa forma, estudos devem ser realizados na tentativa de compreender como FAK regula ou participa da expressão gênica, seja por ligação ao DNA, por associação com outras proteínas, ou regulando eventos pós-transcricionais, como o *splicing* alternativo.

1.3. O Splicing alternativo

O splicing do RNA mensageiro é catalisado por uma maquinaria rica em proteínas e partículas ribonucleoprotéicas, denominado spliceossomo. Essa maquinaria é constituída por uma vasta quantidade de pequenas ribonucleoproteínas U1, U2, U4/U6 e U5 e também por proteínas não ribonucleoprotéicas (WILL& LÜHRMANN, 2011; CHEN & MANLEY, 2009). Esse processo consiste na remoção dos íntrons do mRNA precursor. Os transcritos nascentes de RNA (chamados de pré-mRNA) que ainda não sofreram o processamento pelo splicing, se encontram no núcleo, associados a uma grande quantidade de proteínas nucleares. Essas proteínas pertencem à família das partículas heterogêneas ribonucleoprotéicas (do inglês hnRNPs - heterogeneous ribonucleoprotein particles) que contêm RNAs heterogêneos nucleares, um termo utilizado para se referir ao pré-mRNA e outros RNAs de tamanhos variados (LODISH et al., 2004). Após processamento, esse mRNA é direcionado para o citoplasma e é denominado de mRNA maduro.

O *splicing* consiste em duas reações de transesterificações, no qual há o ataque nucleofílico nas ligações fosfodiéster terminais dos íntrons (VILLA *et al.*, 2002; CHEN&MANLEY, 2009). A primeira reação é catalisada pela 2´-OH da adenina do ponto

de ramificação (BP - *Branch Point*) do íntron com o fosfato da porção 5'SS (*Splice Site*) do éxon 1 (E1). A extremidade 5' cortada do íntron torna-se covalentemente ligada ao nucleotídeo de adenina, formando uma estrutura em grampo (*lariat*). Na segunda reação, a porção 3'SS (do íntron) sofre um ataque nucleofílico pelo grupamento 3'-OH do éxon 1, ligando éxon 1 com o éxon 2 (formando o mRNA) e liberando o íntron (Fig. 5A).

Alguns estudos já mapearam regiões representativas de íntrons e éxons (PADGETT *et al.*, 1986). Os íntrons geralmente contém em sua região 5' uma sequência GU (guanina e uracila), um sítio de ramificação com a base A (adenina), uma região rica em pirimidinas (*Polypirimidine Tract*) e as bases AG (adenina e guanina) na região 3'. Com isso, as regiões GU e AG definem o início e o fim do íntron, respectivamente (Fig. 5B).



Figura 5. Representação esquemática das reações de transesterificação do *splicing* e também das sequências conservadas que definem o começo e fim do íntron. (A) As reações de transesterificações promovem a retirada dos íntrons do mRNA precursor. (B) Sequências

conservadas são encontradas em diferentes organismos (mamíferos, leveduras e plantas). As sequências 5´-GU e 3´-AG definem, respectivamente, início e fim do íntron. Modificado de WILL&LÜHRMANN, 2011.

Entretanto, para que o *splicing* ocorra, é necessária a ação do spliceossomo (WAHL *et al.*, 2009). Sabe-se que a formação desse complexo inicia com o pareamento do snRNA U1 nos sítios de *splicing* 5'SS e a ligação do fator de *splicing* SF1 (*Splicing Factor 1*) no ponto de ramificação (BP) sem gasto de ATP, formando o complexo E'. O complexo E' é convertido em complexo E quando há o recrutamento dos heterodímeros U2AF (U2 *Auxiliary Factor*), que engloba U2AF65 e U2AF35, para a região polipirimidina (também conhecida em inglês como *Polypirimidine Tract*) e a região terminal 3'AG. O próximo passo ocorre quando o complexo E é convertido em complexo E é convertido em complexo E é convertido em complexo A quando a U2 snRNP toma o lugar do SF1. Então, com o recrutamento do complexo U4/U6-U5 - tri-snRNP há a formação do complexo B, com todas as proteínas necessárias para que ocorra o *splicing*. Finalmente, por meio de remodelagens e mudanças conformacionais, o complexo se torna ativo, passando a ser o complexo C. Nesse complexo, os éxons são unidos e ocorre a maturação do mRNA (Fig. 6).



Figura 6. Representação esquemática de proteínas envolvidas nas reações de transesterificação do *splicing*. As etapas de formação do spliceossomo abrangem diferentes proteínas. Tri-snRNPs englobam as proteínas U4/U6-U5 representadas no complexo C. Adaptado de WILL&LÜHRMANN, 2011 e CHEN&MANLEY, 2009.

Por mecanismos ainda não bem elucidados, o spliceossomo é direcionado para os sítios de *splicing* e as proteínas que o compõe (RBPs - *RNA Binding Proteins*) se ligam ao RNA com diferentes graus de especificidade. Alterações nos níveis de expressão e atividades das RBPs ditam a regulação do *splicing* alternativo.

Dentre as famílias de proteínas que contêm fatores de *splicing* e proteínas que regulam o *splicing*, têm-se a família das proteínas SR [Serina (S) e Arginina (R)] e as

hnRNPs (*Heterogenous RibonucleoProteins*) (DAVID & MANLEY, 2010; BLACK, 2003).

As proteínas da família SR pertencem a uma classe essencial de fatores de *splicing*, com um ou dois domínios N-terminais ligantes de RNA. São conhecidas de forma geral como ativadoras do *splicing* porque se ligam às sequências exônicas conhecidas como ESEs (*Exonic Splicing Enhancers*) e promovem a inclusão de éxons (LIN & FU, 2007). Também podem atuar como repressoras do *splicing*, dependendo da localização onde interagem com o pré-mRNA (PETERSEN-MAHRT, 1999). Nesse processo, as proteínas da família SR podem interagir com outras da mesma família, recrutando proteínas SR não pclássicas para o spliceossomo por meio de seus domínios RS (arginina e serina).

Estruturalmente, as proteínas SR possuem domínios de ligação ao RNA (RRM -*RNA Recognition Motifs*) em sua porção N-terminal, seguido dos domínios SR na porção C-terminal (Fig. 7). Enquanto os domínios RRM definem a especificidade de ligação ao RNA, os domínios SR funcionam como sítios de interação proteína-proteína, recrutando outras proteínas participantes do *splicing*. Também funcionam como sinais de localização nuclear, mediando seu deslocamento do citoplasma para o núcleo (WU&MANIATIS, 1993; CACERES *et al.*, 1997). Na figura 7, apresentam-se os principais domínios das proteínas SR. São encontrados geralmente dois domínios RRM nas proteínas SR, mas algumas contêm similaridade no segundo domínio RRM e são denominadas de pseudo RRM (pRRM) pois apresentam similaridade com os domínios RRM, mas alguns resíduos de aminoácidos distintos.



Figura 7. Representação esquemática dos domínios RRM presentes nas proteínas SR. Os domínios das principais proteínas SR estão acima ilustrados. RRM (*RNA Recognition Motifs*), pRRM (*pseudo RNA Recognition Motifs*), RS (*Arginine-Serine domains*), Zn (*Zinc finger domains*) e regiões de ligação (*Linker*). FONTE: MUELLER&HERTEL, 2011.

Um evento importante para que o *splicing* ocorra é a fosforilação em resíduos de serina e treonina das proteínas SR. Estudos indicam que a fosforilação leva à inibição dessas proteínas *in vitro* (PRASAD *et al.*, 1999). As principais quinases responsáveis são as as proteínas *Serine/Arginine Protein Kinase 1* (SRPK1) e *Serine/Arginine Protein Kinase 2* (SRPK2) (YUN & FU, 2000).

Outro grupo de proteínas relacionadas ao *splicing* são as da família hnRNPs. As proteínas hnRNPs contêm múltiplos sítios conectados por regiões denominadas *linkers* e com tamanhos variados e possuem vários membros em sua família, como pode ser

observado na figura 8. As proteínas hnRNPs possuem domínios diferentes dos presentes nas proteínas SR. Um caso a citar são os domínios KH, responsáveis pela ligação da proteína ao DNA e RNA e também os domínios ricos em glicina (Fig. 8).



Figura 8. Representação esquemática dos domínios presentes nas proteínas hnRNPs. Os domínios das proteínas hnRNPs estão acima ilustrados: RRM (*RNA Recognition Motifs*), pRRM (*pseudo RNA Recognition Motifs*), KH (*K homology*), Gly-Rich (*Glycine Rich domains*) e demais regiões de ligação. FONTE: HAN *et al.*, 2010.

Alguns trabalhos demonstram que as proteínas hnRNPs possuem, em sua maioria, função repressora na regulação do *splicing* pois se ligam a regiões denominadas ISE ou ESE (*Intronic Silencer Elements* ou *Exonic Silencer Element*, respectivamente). Além de inibirem o *splicing*, as hnRNPs podem competir com outros fatores pelo sítio de ligação e mudar o sítio de *splicing* (BAI *et al.*, 1999).

Estudos demonstram que as modificações pós-traducionais nas proteínas SR e hnRNPs afetam os padrões de *splicing* de seus genes alvos (CHEN & MANLEY, 2009). A modificação mais estudada é a fosforilação, capaz de modular interações proteína-proteína (XIAO & MANLEY, 1997), proteína-RNA (HUANG *et al.*, 2007), alterar a atividade dos fatores de *splicing* (ativadora ou repressora) e até mesmo modificar a localização intracelular dos fatores de *splicing* (HUANG *et al.*, 2004; HABELHAH *et al.*, 2001).

Nesse contexto, as mais descritas são as proteínas SR quinases, também conhecidas como SRPK (GIANNAKOUROS *et al.*, 2011). A família de proteínas SRPK constitui uma subfamília das serino-treonino quinases responsável por fosforilar seus substratos nos resíduos de serina. Dessa forma, diversos estudos demonstraram que as proteínas SR e hnRNPs são substratos para as quinases SRPKs, *in vivo* e *in vitro* (GUI *et al.*, 1994; COLWILL *et al.*, 1996; STOJDL & BELL, 1999; XU *et al.*, 2011).

Além das proteínas SRPKS, diversos trabalhos têm demonstrado a participação de outras quinases na regulação do *splicing*, como a tirosino quinase Src (GONDRAN & DAUTRY, 1999; NEEL *et al.*, 1995), as proteínas MAP quinases p38 (PYPE *et al.*, 1994), ERK2 e JNK (AL-AYOUBI *et al.*, 2012), a proteína PI3K (BLAUSTEIN *et al.*, 2005);

Como previamente apresentado, a proteína FAK possui um papel chave na sinalização celular, pois é capaz de migrar dos sítios de adesão focal para o núcleo. É plausível supor, portanto, que sua presença no núcleo possa regular processos locais envolvidos na transcrição gênica, nos eventos pós-transcricionais, como o *splicing*, e as respostas celulares frente a diversos estímulos. Sendo assim, a identificação de novos parceiros nucleares de FAK permitirá a descrição de novos processos e vias biológicas por ela regulados neste compartimento celular.

51

Dessa forma, a possibilidade de expressão da proteína recombinante induzível por tetraciclina, uma maior eficiência de transfecção e um enriquecimento de proteínas nucleares, tornaram o sistema de linhagem permanente de células HEK (sistema FAK-*Flp-In*) viável para desenvolver o estudo da função celular da FAK no núcleo. Com o intuito de compreender o papel de FAK no núcleo, as respostas desencadeadas após sua ativação e migração para este compartimento e relacioná-la aos processos celulares em células HEK *Flp-In*, este trabalho foi desenvolvido, conforme objetivos específicos descritos a seguir.

2.OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é identificar proteínas nucleares ligantes de FAK, com o intuito de inferir o papel desta quinase de adesão focal no núcleo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Obter extratos enriquecidos com proteínas nucleares.
- 2. Imunoprecipitar proteínas ligantes de FAK.
- Avaliar os parceiros identificados em células HEK *FLP-In* que superexpressam FAK.
- 4. Validar as interações obtidas em ensaios de imunoprecipitação.
- Demonstrar o papel da FAK na regulação do *splicing* com o uso de um gene repórter.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Substância	Empresa
Ácido clorídrico	MERCK
Ácido fórmico	MERCK
Acrilamida	MERCK
Albumina bovina sérica (BSA)	Invitrogen
Carbonato de Sódio (Na ₂ CO ₃)	MERCK
Cloreto de potássio (KCl)	MERCK
Cloreto de Sódio (NaCl)	MERCK
Coquetel de inibidores de protease	SIGMA
Deoxicolato de Sódio	BAKER
Dimethylsufoxide (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	Calbiochem
EDTA	MERCK
Formaldeído 37%	MERCK
Glicina	Promega
Iodoacetamida	Sigma
Nitrato de prata	Sigma

3.1.1. Reagentes químicos e soluções

Nonidet P-40	Sigma
Paraformaldeído	MERCK
Persulfato de amônio (APS)	Biorad
TEMED	Biorad
Tiossulfato de Sódio	Sigma
Tris Base	MERCK
Tween-20	Sigma

3.1.2. Reagentes gerais

Substância	Empresa
3x Anti-Flag Peptide	Sigma
dNTPs	Invitrogen
Gene Ruler 1 kb Plus	Pierce
Lipofectamina 2000	Invitrogen
M2 Affinity Gel	Sigma
OligoDT	Ambion
Page Ruler Prestained	Pierce
Sequencing Grade Modified Trypsin	Promega
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen

Taq DNA Platinum High Fidelity	Invitrogen
Taq DNA polimerase	Fermentas

3.1.3. Anticorpos

Anticorpos	Empresa	Diluição
FAK (C-20)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Flag	Sigma Aldrich	1:5000
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Histona H1	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Sc-35	Abcam	1:5000
SRSF1 (ASF/SF2)	Abcam	1:5000

3.1.4. Kits

Kit	Empresa
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Protein Extraction Kit	Pierce
Pierce BCA Protein Assay Kit	Pierce
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce

3.1.5. Reagentes de Cultura de Células

Reagentes	Empresa
Blasticidina	Invitrogen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium with high glucose (DMEM)	Nutricell
Soro fetal bovino	Gibco
Penicilina/Streptomicina	Nutricell
Tetraciclina	Sigma
Bicarbonato de sódio	Baker

3.2. MÉTODOS

O esquema representado na Figura 9 resume as principais etapas da metodologia utilizada na co-imunoprecipitação de FLAG-FAK e posterior identificação por espectrometria de massas.

Preparo e cultivo das células FAK-Flp-In

Obtenção das proteínas citosólicas e nucleares

Imunoprecipitação com anticorpo anti-FLAG conjugado à resina

- Eluição da proteína FAK e ligantes com uso do peptídeo 3x FLAG
 - Análise por espectrometria de massas dos extratos citosólicos e nucleares eluídos
 - Identificação de proteínas ligantes de FAK em extratos protéicos citosólicos e nucleares

Figura 9. Representação esquemática dos experimentos desenvolvidos no projeto com os principais tópicos destacados.

3.2.1. Geração das linhagens HEK Flp-In e indução da superexpressão da proteína FAK.

Uma alternativa encontrada para avaliar as proteínas parceiras de FAK, sem o uso de sistemas de expressão dependentes de transfecção (por exemplo, lipofectamina), foi a indução da superexpressão de FAK em células HEK *Flp-In*. Esse sistema permite a integração e expressão do gene de interesse em células de mamífero em uma localização genômica específica.

O sistema Flp-In permite a geração de linhagens celulares de mamífero estáveis por meio de um sistema de recombinação proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*. Esse sistema de recombinação de DNA utiliza uma recombinase (Flp) e um sítio específico de recombinação para facilitar a integração do gene de interesse no genoma das células de mamífero.

Nesse sistema são utilizados vetores diferentes para gerar as linhagens estáveis: o primeiro vetor é o pFRT/lacZeo utilizado para gerar a linhagem Flp-In. O vetor contém um gene de lacZ-zeocina cuja expressão é controlada pelo promotor SV40. Um sítio FRT é inserido após o códon de início ATG do gene lacZ-Zeocina. O sítio FRT serve como sítio de ligação e clivagem para a Flp recombinase. O plasmídeo pFRT/lacZeo é transfectado nas células de mamífero e as células são selecionadas com Zeocina. Em seguida, essas células são transfectadas com o plasmídeo pCDNA6/TR para gerar as linhagens induzíveis com tetraciclina. As colônias resistentes são avaliadas para identificar às que contêm um único sítio de integração FRT. A linhagem resultante Flp-In contém um sítio integrado de FRT e expressa o gene lacZ-Zeocin.

O terceiro componente desse sistema é o vetor pCDNA5/FRT/TO, no qual o gene de interesse será clonado (em nosso estudo, o gene da FAK), fusionado à sequência de FLAG na porção N-terminal. Nesse plasmídeo, o gene de interesse é controlado pelo promotor CMV, contendo um sítio de higromicina. O gene que confere resistência à higromicina neste plasmídeo não contém o promotor e nem o códon de início da tradução, o ATG.

O quarto plasmídeo pOG44 é responsável pela expressão da recombinase Flp sob controle do promotor CMV. Tanto o plasmídeo pOG44 como o pCDNA5/FRT/TO são cotransfectados na célula Flp-In e devido à expressão da Flp recombinase, o plasmídeo pCDNA5/FRT/TO sofre recombinação homóloga com o genoma da célula Flp-In entre os sítios FRT. Dessa forma, células que não sofrerem recombinação homóloga com o plasmídeo pOG44, não terão o sítio de higromicina com o ATG e não serão resistentes ao respectivo antibiótico (Fig. 10).



Figura 10. Esquema ilustra a construção das células HEK Flp-In induzíveis com tetraciclina e a clonagem do gene de interesse. (A) A transfecção do plasmídeo pFRT/lacZeo na célula de mamífero irá gerar a linhagem Flp-In. As células resistentes à zeocina são selecionadas. As colônias que apresentam um sítio FRT são transfectadas com o plasmídeo pCDN6/TR, gerando a linhagem celular resistente à tetraciclina. (B) Após estabilizar as células Flp-In resistentes à tetraciclina, elas são co-transfectadas com os plasmídeos pCDNA5/FRT/TO que contem o gene de interesse (Flag-FAK) e o plasmídeo pOG44. A recombinação homóloga dos plasmídeos pCDNA5/FRT/TO com o plasmídeo pFRT/lacZeo permite a reconstrução do gene da higromicina e as células resistentes ao antibiótico são selecionadas. A recombinação homóloga ocorre nos sítios FRT pela ação da Flp recombinase. FONTE: *Flp-In System User Guide*, Invitrogen.

O sistema T-Rex é um sistema de expressão de células de mamífero que utiliza elementos regulatórios de um operon de *E.coli* resistente à tetraciclina (HILLEN & BERENS, 1994; HILLEN *et al.*, 1983). A regulação por tetraciclina é baseada na ligação da tetraciclina ao repressor *Tet*, ativando o promotor que controla a expressão de um gene de interesse.

Nesse sistema, a expressão do gene de interesse é reprimida na ausência de tetraciclina e induzida em sua presença (YAO *et al.*, 1998). Diferente de outros sistemas regulados pela tetraciclina (que utilizam moléculas regulatórias híbridas e domínios virais de transativação), esse sistema utiliza apenas os elementos regulatórios do operon *Tet* nativo.

O mecanismo de repressão funciona da seguinte maneira: na ausência de tetraciclina, o repressor *Tet* forma um homodímero que se liga com alta afinidade a cada sequência de TetO₂ no promotor do vetor de expressão (Fig. 11). Os dois sítios de TetO₂ no promotor atuam como sítios de ligação para 4 moléculas (ou 2 homodímeros) do repressor Tet. A ligação dos homodímeros do repressor Tet às sequências TetO₂ reprimem a transcrição do gene de interesse. Assim, a tetraciclina se liga com alta afinidade ao homodímero do repressor *Tet* em uma proporção 1:1 e ocasiona uma mudança conformacional no repressor que leva à incapacidade dos homodímeros se ligarem ao sítio operador *Tet* (Fig. 11, etapas 3 e 4). Logo, o complexo de tetraciclina e repressor não se liga ao operador *Tet*, permitindo a indução da transcrição do gene de interesse, em nosso caso, a FAK.



Figura 11. Esquema da indução da expressão de proteínas cujos genes estão clonados em plasmídeos do sistema T-Rex. Quando não há tetraciclina presente, o repressor Tet se mantém ligado ao promotor, inibindo a transcrição do gene da FAK (etapas 1 e 2). Quando a tetraciclina está presente, as moléculas do antibiótico competem pelo sítio de ligação do repressor Tet, desligando-o do promotor e ativando a transcrição do gene da FAK (etapas 3 e 4). FONTE: *T-REX System User Guide, Invitrogen*.

Após a seleção, as células FAK-FLAG- *Flp-In* foram plaqueadas e mantidas a 37°C em meio DMEM, com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina,

blasticidina e higromicina. Para indução da expressão da proteína FAK, as células foram tratadas com tetraciclina em uma concentração final de 500 ng/µL. As células permaneceram em tetraciclina por 48 horas para indução da expressão máxima da proteína e em seguida, foi realizada a extração total do RNA e/ou extração de proteínas.

3.2.2. Extração de proteínas

Para as análises por espectrometria de massas, foi realizado o fracionamento das amostras visando o enriquecimento de proteínas. Para isso, foi utilizado o *kit NE-PER Cytoplasmic and Nuclear Extraction Kit* (Pierce), seguindo especificações do fabricante.

Para análise da superexpressão da proteína FAK, foi utilizado o protocolo de extração total com o uso do tampão de lise RIPA (50mM Tris-HCl pH7.4, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0,25% deoxicolato de sódio, 50mM Ortovanadato de sódio, 1mM coquetel de inibidores de proteases). As células transfectadas por 48 horas eram coletadas em 5 mL de PBS e cerca de 2,5 mL eram centrifugados a 3000 rpm, 4°C por 10 minutos para as análises por *Western Blotting*. O restante foi utilizado para a extração de RNA total. Após centrifugação, as células foram lisadas em 200 µL de tampão RIPA e centrifugadas por 20 minutos a 13.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e utilizado para quantificação pelo método do ácido bicinconínico (BCA - *Pierce BCA Protein Assay Kit*), ensaios de co-imunoprecipitação ou fervidas em tampão de amostra para análises por *Western Blotting*.

3.2.3. Western Blotting

As amostras das proteínas normalizadas foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida -SDS PAGE em aparelho de eletroforese no sistema *Semi-Dry (Trans-Blot Semi Dry Transfer Cell* - BIORAD). A eletrotransferência das proteínas do gel foram feitas para a membrana de PVDF previamente ativada com metanol 100%, a uma voltagem fixa de 25V por 1 hora, utilizando tampão de transferência (25 mM Tris-HCl; 20% metanol; 0,02% SDS; 192 mM glicina).

As membranas de PVDF foram incubadas à temperatura ambiente por 40 minutos em solução de bloqueio (5% leite desnatado; 25 mM Tris-HCl; 125 mM NaCl; 0,02% Tween 20, pH 8.0) para minimizar a ligação inespecífica dos anticorpos. Após a incubação, as membranas foram lavadas três vezes por 5 minutos cada, sob agitação e à temperatura ambiente em solução TBS-T (25 mM Tris-HCl; 125 mM NaCl; 0,02% Tween 20, pH 8.0).

Para imunomarcação, as membranas foram incubadas com os anticorpos descritos no item 3.1.3 durante 16 horas, a 4°C, sob agitação. Novamente, as membranas foram lavadas três vezes por 5 minutos cada em solução TBS-T e incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (na proporção de 1:5000) por 2 horas à temperatura ambiente e sob agitação. Após esse período, as membranas foram novamente lavadas com solução TBS-T e expostas aos reagentes quimioluminescentes provenientes do *kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (PIERCE). A reação produziu fluorescência proporcional à quantidade de proteínas expressas e as imagens foram capturadas com o fotodocumentador ImageQuant TM 300 (GE Healthcare). As bandas das imagens foram quantificadas por densitometria óptica utilizando o programa *ImageJ*.

3.2.4. Coloração pelo nitrato de prata

Para coloração pela prata, os géis de poliacrilamida foram fixados por 16 horas com solução fixadora (50% metanol, 12% ácido acético, 0,075% formaldeído). Em seguida, foram lavados três vezes de 20 minutos em etanol 50% e oxidados por 1 minuto em solução de oxidação (0,02% tiossulfato de sódio). Após a oxidação, foram feitas três lavagens de 20 segundos em 100 mL de água e os géis foram incubados por 20 minutos em solução de prata (0,2% AgNO₃; 0,075% formaldeído). Antes da revelação, foram realizadas três lavagens de 20 segundos com 100mL de água. Por fim, o gel era revelado com solução reveladora (6% Na₂CO₃, 0,04V solução de oxidação, 0,05% formaldeído) e a reação foi interrompida com ácido acético (5%).

3.2.5. Imunoprecipitação dos extratos citosólicos e nucleares provenientes de células *Flp-in* com superexpressão de FAK fusionada à sequência FLAG.

Para imunoprecipitação das amostras fracionadas, foi utilizado o sistema *ANTI-FLAG M2 affinity gel*, composto por um anticorpo monoclonal altamente específico ligado covalentemente a uma resina de agarose. O uso dessa resina de afinidade permite que proteínas fusionadas ao FLAG se liguem eficientemente à resina, o que diminui a ligação inespecífica de outras proteínas. Esse sistema é altamente adequado para análises por espectrometria de massas, uma vez que a eluição da proteína de interesse e seus ligantes, após a imunoprecipitação, é feita com excesso de peptídeo FLAG (Fig. 12). Esse peptídeo contém oito resíduos de aminoácidos, com carga conhecida. Sua massa é inserida em uma

MATERIAL E MÉTODOS

lista de exclusão de peptídeos a serem fragmentados no espectrômetro de massas, o que impede a sua detecção e promove uma melhor identificação dos parceiros imunoprecipitados. No caso de imunoprecipitações eluídas com excesso de anticorpo, ocorre um prejuízo na detecção dos peptídeos provenientes das proteínas imunoprecipitadas. Isso porque a variedade de peptídeos gerados pelo próprio anticorpo influencia negativamente na identificação e detecção de outros peptídeos menos abundantes das proteínas eluídas.



Figura 12. Representação esquemática da sequência de aminoácidos do peptídeo *Flag*. O peptídeo contém três sequências repetidas *in tandem*, fazendo com que a competição pelo sítio de ligação à resina anti-*Flag* seja favorecida, promovendo o desligamento da proteína FLAG-FAK e seus ligantes da resina.
Após a superexpressão de FLAG-FAK e dosagem dos extratos de proteínas, cerca de 1 μg de proteína foi incubado com a resina *M2 Affinity gel* por 16 horas. Após esse período, o sobrenadante foi coletado e armazenado, a resina foi lavada 3 vezes com TBS (0,05 M Tris-HCl pH 7,5; 0,1M NaCl) gelado e centrifugada a 6000 rpm por 1 minuto. Após a terceira lavagem, procedeu-se à eluição dos ligantes com o peptídeo anti-FLAG, na concentração de 150ng/µL de peptídeo em um volume final de 300 µL.

3.2.6. Digestão e análise por espectrometria de massas

Cerca de 100 μ L da amostra eluída foi submetida ao protocolo de digestão de proteínas para análise subsequente por espectrometria de massas. As amostras foram submetidas à redução com DTT à uma concentração final de 5 mM e incubadas por 25 minutos a 56°C. Em seguida procedeu-se à alquilação com solução de iodoacetamida (IAA) a uma concentração final de 14 mM por 30 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Para finalizar a reação da IAA, adicionou-se DTT (concentração final de 5 mM) e incubou-se por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Adicionou-se então tripsina (PROMEGA) e incubou-se durante 16 horas a 37°C. No dia seguinte, a as amostras foram liofilizadas e reconstituídas em 20 μ L de ácido fórmico 0,1%.

As análises por espectrometria de massas foram realizadas no laboratório de Espectrometria de Massas do LNBIO/CNPEM, sob a coordenação da Dra. Adriana Paes Leme.

73

3.2.7. Análise por espectrometria de massas e processamento dos dados obtidos

Os imunoprecipitados foram analisados no espectrômetro de massas LTQ Velos Orbitrap (Thermo Fisher Scientific), acoplado a um cromatógrafo líquido (LC-MS/MS) pelo sistema EASY-nLC (Proxeon Biosystem) com uma fonte de íons nanoelectrospray Proxeon. O volume de 4,5 μ L dos peptídeos foi injetado no espectrômetro de massas. Os peptídeos foram eluídos com um gradiente de 2-90% de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico, utilizando uma pré-coluna (*EASY-Column* -2cm x id 100 μ m, 5 μ m) e uma coluna analítica *PicoFrit Column* (20 cm x ID75 μ m, 5 μ m, New Objective) com um fluxo de 300 nl/min durante 45 minutos. A voltagem do *nanoeletrospray* foi definida em 1,7 kV e a temperatura da fonte foi estabelecida em 275°C.

Todos os métodos do instrumento foram definidos no modo DDA (*Data Dependent Acquisition*). A varredura total dos espectros de MS (m/z 300-2000) foram adquiridos no analisador Orbitrap. A resolução do Orbitrap foi definida em r= 60,000 e os 20 peptídeos mais intensos com carga ≥ 2 foram isolados sequencialmente para um valor de 5,000 e fragmentados na câmara (*linear ion trap*) com baixa energia CID (energia de colisão normalizadas em 35%). O sinal de captura dos eventos de MS/MS foram definidos em 500 contagens. A exclusão dinâmica foi ativada com uma lista de exclusão de 500, exclusão de 60s e uma contagem repetida de 1. Uma ativação de q=0,25 e um tempo de ativação de 10 ms foi utilizado (ARAGÃO *et al.*, 2011).

As listas geradas pelo espectrômetro de massas a partir dos arquivos RAW (*peak list* - msf) utilizaram a plataforma *Proteome Discoverer* versão 1.3 (*Thermo Fisher Scientific*) com uma ferramenta de busca *Sequest*. Para as amostras da imunoprecipitação com anti-Flag, o banco de dados utilizado foi *Human International Protein Database* (IPI) v. 3.86 (91.522 sequências; 36.630.302 resíduos). Foram estabelecidas como modificações fixas a carbamidometilação e como modificação variável, a oxidação da metionina. Também foram considerados um sítio de clivagem perdido para tripsina, uma tolerância de 10 ppm para o íon precursor e 1 Da para os íons fragmentos.

A plataforma de biologia de sistemas utilizada para auxílio nas análises por espectrometria de massas foi o Ingenuity Pathways Analysis (IPA)TM. Essa plataforma contém um banco de dados atualizado, capaz de relacionar direta e indiretamente proteínas que foram identificadas em um conjunto de dados. Com a lista de proteínas identificadas, é possível montar redes baseada nos dados publicados e relacioná-las aos processos biológicos. A identificação dessas proteínas em um conjunto de processos retorna ao programa um valor de score. Esse valor de score abrange o número de proteínas identificadas naquela via e o total de proteínas descritas na via, assim como o total de moléculas identificadas e o número total de moléculas presentes nos bancos de dados do IPA que podem ser incluídas nas vias. Esse valor de score é baseado em uma distribuição hipergeométrica e é calculado pelo teste estatístico de Fisher. Um exemplo, supondo que uma via tenha 35 moléculas e um resultado estatístico Fisher (Fisher Exact Test) igual a 1x10⁻⁶. O valor do score será dado por -log (*Fisher Exact Test Result*)=6. Isso pode ser interpretado da seguinte maneira: existe 1 chance em 1 milhão de adquirir a via contendo no mínimo o mesmo número de moléculas elegíveis para aquela via, quando se pega randomicamente 35 moléculas que podem estar em qualquer via da base de dados do IPA. Esse score não é uma indicação da qualidade ou relevância biológica da via. Ele apenas calcula as vias mais enriquecidas para o conjunto de moléculas identificadas nos experimentos (CALVANO et al., 2005).

3.2.8. Transfecção do gene repórter em células FAK Flp-in induzíveis

Para avaliar o perfil de *splicing* gerado pelas células que superexpressam FAK, foi realizada uma transfecção com 4µg de plasmídeo E1A (*Early region 1 of Adenoviral*) mini gene com o uso de 5 µL de Lipofectamina2000®, em placas de 6 *wells*. As células foram incubadas por 4 a 6 horas com o complexo lipofectamina mais o plasmídeo E1A e após esse período, o meio de cultura foi trocado e adicionado tetraciclina para induzir a superexpressão de FAK. Após 48 horas, as células foram coletadas e submetidas às extrações de RNA e proteína (BRESSAN *et al.*, 2009).

O gene repórter E1A contém cinco éxons e dependendo do tipo celular, ocorre o favorecimento de algumas isoformas (Fig. 13). Dependendo de como ocorre o *splicing* no tipo celular, o gene gera as isoformas 13S, 10S e 9S. Outras isoformas também são observadas, mas em uma menor intensidade.



Figura 13. Diagrama do gene repórter E1A nos quais os eventos de *splicing* geram as isoformas 13S, 12S, 10S e 9S, com o tamanho dos seus respectivos produtos de PCR (em pb). As setas indicam regiões de anelamento dos iniciadores específicos. Modificado de BRESSAN *et al.*, 2009.

3.2.9. Extração total do RNA e síntese do cDNA

Para permitir a análise do padrão de isoformas gerados pelo *splicing* do gene repórter, foi realizada uma extração total do RNA seguida da síntese do cDNA e PCR com os iniciadores específicos para o gene repórter E1A.

Para extração total de RNA, as células foram coletadas com 1 mL de Trizol (aproximadamente 1×10^6 células). Em seguida, adicionou-se 200 µL de clorofórmio e os tubos foram misturados por inversão. Os mesmos foram incubados à temperatura ambiente por 3 minutos e em seguida, centrifugados a 12.000 rpm, a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado (correspondente à fase transparente) e precipitado com 500 µL de isopropanol. A solução foi então incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugado em seguida, a 12.000 rpm, a 4°C por 15 minutos.

O RNA precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75%, agitado no vortex e novamente centrifugado a 12.000 rpm, a 4°C por 15 minutos. Após procedimento, deixouse o restante do etanol evaporar e a amostra foi ressuspendida em 15 µL de água DEPC.

Para a síntese do cDNA, cerca de 1 μ g de RNA foi utilizado com 5 μ M de oligoDT e 10mM de dNTPs. Esses reagentes foram incubados a 65°C por 5 minutos, rapidamente transferidos para gelo (para que as fitas do RNA não formem estruturas secundárias) e submetidos à ação da enzima transcriptase reversa. Para isso, as amostras foram incubadas com 4 μ L do tampão 5X da transcriptase reversa, 2 μ L de DTT 0,1M, 0,5 μ L de inibidor de RNAse, 1 μ L da enzima transcriptase reversa (*SuperScript Reverse Transcription -*INVITROGEN), em um volume final de 20 μ L. As amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora. Após a síntese, as amostras de cDNA foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop - Thermo).

3.2.10. Análise dos fragmentos por PCR

A reação de PCR para analisar os fragmentos gerados pelo *splicing* do minigene E1A obedeceu às seguintes concentrações (por amostra): 1000 ng de cDNA, 2,5 μ L de tampão da Taq DNA polimerase 10X, 0,5 μ L de dNTPs 10mM, 0,75 μ L MgCl₂ 50 mM, 0,62 μ L primer S (5mM), 0,62 μ L primer AS (5mM), 0,25 μ L de Taq DNA polimerase, em um volume final de 25 μ L. A reação realizada seguiu o seguinte protocolo: 95°C por 2 min, 25 ciclos de 94°C por 1,5 min, 50°C por 2min, 72°C por 2 min, e um ciclo final de extensão a 72° C por 5 min. Após a PCR, as amostras foram analisadas em eletroforese de gel de agarose 3%. Os primers utilizados foram 5'-ATTATCTGCCACGGAAGGTGT-3' (*sense*) e 5'-GGATAGCAGGCGCCATTTTA-3'(*antisense*).

Após a amplificação pela PCR, os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 3% e a intensidade das bandas foi calculada usando o programa ImageJ (http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html; National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). A intensidade de todas as isoformas foram somadas, definidas como 100% e utilizadas para normalizar a intensidade de cada banda.

3.2.11. Marcação por imunofluorescência das células HEK Flp-In que superexpressam FAK

Para a imunofluorescência, as células foram fixadas com uma solução fixadora (4% de paraformaldeído, 4% sacarose, 0,6% Triton X-100) por 5 minutos à temperatura ambiente, acrescidos por mais 25 minutos no gelo. As células foram então lavadas três vezes com PBS e incubadas com solução contendo PBS + 0,3% Triton por 3 minutos. Após

isso, foram incubadas com solução bloqueadora (1% de BSA, 0,1% Triton X-100, 50 mM glicina) por 30 minutos e em seguida passaram por três lavagens de 5 minutos, em gelo, com solução de lavagem (1:5 da solução bloqueadora). Após fixação, permeabilização e bloqueio, as células foram incubadas com anticorpo primário (1:100 na solução de lavagem) por 16h a 4°C em câmara úmida. A seguir, as células foram lavadas três vezes por 5 minutos com solução de lavagem e incubadas com anticorpo secundário (Alexa 488 ou 568, INVITROGEN) na diluição de 1:250 (na solução de lavagem) por 2 horas à temperatura ambiente. Após incubação, os passos de lavagem foram feitos em PBS e as células incubadas com faloidina (2,5μL para cada 100μL de PBS, INVITROGEN) por 1 hora à temperatura ambiente. Após a lavagem, as lamínulas foram montadas em lâmina com uso de meio de montagem apropriado (VectaShield com DAPI). Em seguida, as imagens foram adquiridas por microscopia confocal de varredura à laser no Laboratório Nacional de Biociências (LNBIO), com o uso do microscópio confocal de varredura modelo Leica TCS SP8, sob supervisão do MSc. Sílvio Roberto Consonni.

3.2.12. Análises Estatísticas

As leituras densitométricas das intensidades das isoformas geradas pelo processamento do minigene E1A foram normalizadas pela soma total das isoformas obtidas em cada ensaio. O teste estatístico aplicado foi o teste-T, para a comparação entre os extratos tratados com tetraciclina (+tet) e os não tratados (- tet). Valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significantes. O programa utilizado para os testes estatísticos foi o Prism 5 (GraphPad Software).

4. RESULTADOS

4.1. As células FLAG-FAK-Flp-In.

Para a identificação de novos parceiros proteicos de interação com a proteína FAK, foram desenvolvidas células *Flp-In* com a superexpressão de FAK induzível por tetraciclina (FLAG-FAK-*Flp-In*).

Após a obtenção das linhagens celulares, o padrão de expressão de FAK foi avaliado por análises de imunofluorescência nas células controle (-tet) ou com indução da expressão de FAK por tratamento com tetraciclina (+tet). Células marcadas com anticorpo anti-FLAG apresentaram fluorescência somente quando induzidas com tetraciclina (Fig. 14A). Células não induzidas (-tet) apresentaram uma expressão basal de FAK, enquanto que nas células induzidas (+tet) observou-se um aumento na expressão dessa quinase (Fig. 14B). Neste tipo celular, a FAK se localiza predominantemente no citoplasma, sendo observada maior concentração na periferia deste compartimento, onde ocorre a formação das adesões focais. Observou-se também uma marcação nuclear discreta de FAK.



Figura 14. Microscopia confocal de células FLAG-FAK-*Flp-In*. (A) Marcação com anti-FLAG, faloidina (actina) e DAPI nas células sem expressão de FLAG-FAK (-tet) e com expressão de FLAG-FAK (+tet); (B) Marcação com anti-FAK, faloidina (actina) e DAPI nas células sem expressão de FLAG-FAK (-tet) e com expressão de FLAG-FAK (+tet). A escala indicada pela barra branca é de 10µm.As imagens foram obtidas no aumento de 63x, com um zoom óptico de 1,60.

4.2. Padronização da superexpressão de FAK em células Flp-In.

Para avaliar a concentração ótima de tetraciclina para a indução da proteína FAK no sistema *Flp-In*, testes foram realizados com diferentes concentrações de tetraciclina. Análises por *Western Blotting* demonstraram que doses crescentes de tetraciclina promoveram uma indução da expressão de FAK até 500 ng/mL (Fig. 15).

As concentrações mais favoráveis para a superexpressão situam-se entre 100 - 500 ng/mL de tetraciclina (Fig. 15).



Figura 15. *Western Blotting* e gráfico representativos dos extratos protéicos provenientes de tratamentos com diferentes concentrações de tetraciclina em células FLAG-FAK-*Flp-In*. Em (A), os *blots* demonstram a superexpressão de FLAG-FAK avaliada com anticorpos

anti-FAK, anti-FLAG e o normalizador GAPDH. Em (B), as medidas densitométricas da expressão de FAK e FLAG normalizados pela expressão do GAPDH.

Após a realização dos experimentos de dose resposta, a concentração de 500 ng/mL foi escolhida para a indução da expressão de FLAG-FAK. Em seguida, três culturas independentes foram preparadas e avaliadas quanto à superexpressão de FLAG-FAK e também de seus níveis de fosforilação em tirosina 397. *Western blottings* realizados com anti-FLAG e anti-FAK demonstraram um aumento considerável da expressão de FAK (Fig. 16). Este aumento de expressão também foi acompanhado por um aumento em sua fosforilação no resíduo de tirosina 397, indicando que além de ocorrer um aumento em seus níveis de expressão, FAK também se apresenta em sua forma ativa (Fig. 16).



Figura 16. Análise por *Western Blotting* de extrato total (50 µg de proteína) das células FAK *Flp-in* que superexpressam a proteína FAK (+tet) e não induzidas (-tet) em três experimentos independentes. A figura indica que nos extratos não induzidos (-tet), não há marcação com anticorpos anti-FLAG e anti-pFAK.

O aumento da expressão e ativação de FAK são fundamentais para que os experimentos de imunoprecipitação tragam proteínas que interajam com FAK também em seu estado ativo, mimetizando as interações que ocorrem com a FAK endógena.

4.3. Extração de proteínas por fracionamento celular

O uso do subproteoma é importante na busca de alvos, pois permite que o nível exploratório seja maior nesse sistema. Para isso, foi utilizado um protocolo de fracionamento celular a fim de se obter um enriquecimento de proteínas encontradas no compartimento nuclear. Os extratos fracionados em citosólicos e nucleares foram analisados quanto à presença de proteínas citosólicas e nucleares por meio de *Western blottings* com os anticorpos anti-GAPDH e anti-Histona H3. Tais anticorpos foram utilizados por serem marcadores citoplasmático e nuclear, respectivamente. Como evidenciado na Figura 17, tanto o extrato nuclear quanto o citosólico foram enriquecidos. A banda correspondente à proteína GAPDH encontra-se mais intensa no extrato nuclear.



Figura 17. Extratos citosólicos e nucleares das células FAK-Flp-In para avaliar o enriquecimento dos extratos nucleares e citosólicos com o uso dos anticorpos anti-GAPDH e anti-Histona H3.

4.4. Obtenção dos extratos citosólicos e nucleares das células com superexpressão de FLAG-FAK

Após a padronização do fracionamento celular, extratos citosólicos e nucleares provenientes de três culturas independentes foram preparados e avaliados quanto à expressão de FAK. Análises por *Western blotting* realizadas com os anticorpos anti-FLAG e anti-FAK demonstraram o aumento da expressão de FAK em ambos os extratos provenientes das células induzidas por tetraciclina. Observa-se uma expressão basal de FAK nos extratos citosólicos das células não induzidas, ao passo que a expressão da proteína recombinante FLAG-FAK aumenta consideravelmente nos extratos provenientes das células tratadas com tetraciclina. Não foi observada a mesma expressão basal de FAK endógena nos extratos nucleares das células não induzidas, no entanto, sua localização neste compartimento celular aumenta consideravelmente após a indução com tetraciclina (Fig. 18).



Figura 18. *Western Blotting* dos extratos citosólicos (A) e nucleares (B). Em ambos extratos foram analisadas cerca de 50 µg de proteína das células FAK *Flp-in* obtidos com o uso do anticorpo anti-FLAG, anti-FAK e anti-pFAK.

4.5. Imunoprecipitação dos extratos citosólicos e nucleares com o uso do anticorpo anti-*Flag* acoplado à resina de agarose.

Após a obtenção dos extratos com superexpressão de FLAG-FAK, foi realizada a imunoprecipitação com o uso do anticorpo *anti-Flag* acoplado à resina de agarose. A eficiência da imunoprecipitação de FLAG-FAK e também da eluição com o uso do peptídeo 3x *Flag* foi avaliada por *Western Blotting* e pode ser observada na figura 19.



Figura 19. Análise por *Western Blotting* dos imunoprecipitados citosólicos e nucleares não induzidos (-tet) e induzidos (+tet). A resina utilizada e os extratos obtidos após eluição com peptídeo (Eluído) foram avaliados com os anticorpos anti-Flag (A) e anti-FAK (B).

Em seguida, os complexos protéicos citosólicos e nucleares eluídos com o peptídeo *3xFLAG* foram avaliados por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% seguido por impregnação por nitrato de prata. A figura 20 demonstra o perfil de bandas obtido das amostras eluídas. Observa-se um enriquecimento de proteínas nos eluatos provenientes dos extratos citosólicos e nucleares das células com superexpressão de FAK.



Figura 20. Géis de poliacrilamida 10% impregnados por nitrato de prata contendo as amostras imunoprecipitadas com anticorpo anti-FLAG. Em ambas as amostras induzidas citosólicas (à esquerda) e amostras nucleares (à direita) se observa a expressão de FAK em torno de 130 kDa. Observa-se também um enriquecimento de proteínas nas frações induzidas com tetraciclina (+tet).

Demonstra-se assim, que tanto nos extratos induzidos (+tet) citosólicos quanto nos nucleares imunoprecipitados, há mais proteínas ligantes do que os que não foram induzidos (-tet).

4.6. Identificação das proteínas por espectrometria de massas

Os imunoprecipitados dos extratos citosólicos e nucleares provenientes de três experimentos independentes foram digeridos e analisados por espectrometria de massas. Os Apêndices 1 e 2 apresentam as proteínas que foram identificadas nos extratos citosólicos e nucleares. Para critério de análise, proteínas que tiveram contagem de espectros (PSMs) em pelo menos dois experimentos independentes induzidos e em até um experimento não induzido foram considerados como ligantes de FAK.

No total após o critério de análise e considerando juntamente os extratos citosólicos e nucleares, 153 proteínas foram identificadas. Três dessas proteínas foram comuns entre os extratos, excluindo a proteína FAK: IPI00396321 (*Leucine rich repeat containing protein* 59-LRRC59), IPI00414676 (*Heat shock protein* Hsp90 beta) e IPI00657721 (U4/U6 *small nuclear ribonucleoprotein* Prp31). Analisando separadamente as frações, observamos um total de 127 proteínas citosólicas e 32 nucleares.

4.6.1. Análises da localização subcelular e classes das proteínas identificadas

Para avaliar os ligantes imunoprecipitados com FAK, utilizou-se a ferramenta de Biologia de Sistemas, o *Ingenuity Pathway Analysis*™ (IPA). O IPA é um banco de dados constantemente revisado, capaz de conferir uma visualização global das proteínas identificadas quanto às suas funções celulares, moleculares e suas redes de interação. Em todas as análises seguintes, os parceiros de interação citosólicos e nucleares foram agrupados.

RESULTADOS

A figura 21 demonstra a distribuição celular dos ligantes de FAK (citosólicos e nucleares) obtida pelo *IPA*. Nessa análise, 73 proteínas (~48%) encontram-se no compartimento nuclear, 55 (~36%) citosólico, 6 (~4%) mitocondriais, 5 (~3%) de retículo endoplasmático, 4 (~3%) de membrana plasmática, 3 (~2%) do complexo de Golgi e 7 (~4%) estão distribuídas em outros compartimentos (Outros).



Figura 21. Localização subcelular das proteínas imunoprecipitadas com FLAG-FAK.

A distribuição dos parceiros de interação da FAK em classes de proteínas também foi realizada com o uso do programa PantherDB (disponível em http://www.pantherdb.org).

Na Figura 22 estão ilustradas as principais classes de proteínas identificadas. O número de proteínas listadas é maior do que o total de proteínas identificadas (153) porque algumas são contabilizadas em mais de uma classe.

Como ilustrado, 79 (48%) proteínas são ligantes de ácidos nucleicos, 14 (9%) são moduladores enzimáticos, 9 (6%)são hidrolases, 9 (6%)são proteínas de citoesqueleto, 6 (4%) são de sinalização, 5 (3%)são receptores, 4 (3%) chaperonas, 4 (2%) transferases, 4 (2%) fatores de transcrição, 3 (2%) proteínas transportadoras, 3 (2%) quinases, 2 (1%) oxiredutases, 2 (1%) ligases, 2 (1%) proteínas de adesão, 1 (1%) proteínas de matriz extracelular, 1 (1%) liase, 1 (1%) proteína envolvida com defesa e imunidade e 1 (1%) proteína carreadora. Doze proteínas (7%) não foram inclusas em nenhuma dessas classes e foram agrupadas na classe "Outras".



Figura 22. Representação gráfica das classes de proteínas identificadas no complexo imunoprecipitado com FLAG-FAK, utilizando-se a ferramenta de classificação PantherDB.

A classificação apresenta uma distribuição bastante abrangente em relação às classes de proteínas. Nesta classificação, algumas proteínas foram inclusas na classe de moduladores enzimáticos. São considerados moduladores enzimáticos, proteínas capazes de modular a atividade de um grupo de enzimas como quinases, fosfatases, proteases e proteínas G. Dentre as proteínas inclusas nessa classe, têm-se as proteínas *Rho Guanine*

Nucleotide Exchange Factor 2 (ARHGEF2), Nucleolar GTP-binding protein 2 (GNL2), Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1 (IGF2BP1). Dentre a classe das quinases, identificou-se duas envolvidas com o splicing do RNA mensageiro, a Serine Arginine Protein Kinase 1 (SRPK1) e Serine Arginine Protein Kinase 2 (SRPK2). Os dados analisados com o programa PantherDB[™] destacam também um grande número de proteínas ligantes de ácidos nucleicos.

4.6.2. Análise das funções celulares e moleculares com o uso do programa Ingenuity

O *IPA* é capaz de enumerar vias enriquecidas, inferindo valores de significância para cada via (*score*). Para a classificação dessas vias, o programa utiliza três parâmetros: Doenças e Desordens, Função Molecular e Celular e Desenvolvimento Fisiológico de Sistemas e Função. Ao submetermos as proteínas ligantes de FAK ao programa *IPA*TM, observamos que essas proteínas em sua maioria, participam da via de modificações póstranscricionais do RNA, que envolve processamento, transporte e *splicing* do RNA.

A Figura 23 demonstra as proteínas ligantes de FAK com suas respectivas funções moleculares e celulares.



RESULTADOS

Figura 23. Distribuição das proteínas nas funções celulares e moleculares, segundo classificação obti Representam-se nesta imagem oito processos celulares e moleculares com suas respectivas proteínas. O proteínas associadas foi o de modificações pós-transcricionais do RNA.

96

RESULTADOS

Na tabela 1 há a descrição de todas as vias identificadas, os processos relacionados, a respectiva contagem (*score*), identificação e o número de moléculas. Todas as proteínas com suas respectivas siglas se encontram no Apêndice 3.

Tabela 1. Principais vias (com *score* maior que 10) mapeadas pelo programa *Ingenuity*[™] nas quais os ligantes de FAK estão inseridos.

	Vias associadas	Score	Número de	Moléculas
			moléculas	
1	Modificações pós-	48	27	ALYREF,C14orf166,DDX1,DDX
	transcricionais do RNA.			5,DDX17,DDX3X,DHX9,HNRN
	Doenças infecciosas e			PUL1,MAP4,NCAPH,PARP1,PT
				K2,PXN,RAD50,RPL10A,RPS6,
	Sinalização Celular			RTCB,SFPQ,SMC4,SND1,SNRN
				P70,SRPK1,SRPK2,STAU1,THR
				AP3,TRIM28,XRCC5
2	Síntese de proteínas,	27	18	ARHGEF2, ATP5J, DHX30, EEF2,
	Modificações pós-			GNL2,GNL3,HNRNPR,LARP1,N
	transcricionais do RNA.			ACA,PABPC4,PRPF8,PRPF31,R
	Desordens Hereditárias			CC2,RPL18,RPL27,RPL36,SSB,
	Desordens mercultarias			TCP1
3	Modificações pós-	23	16	DDX17,EDC3,EEF1A1,EIF2S2,H
	transcricionais do RNA,			NRNPDL,
	Desordens de			LTV1,MRTO4,NOB1,NUDT21,P
	desenvolvimento			CBP1,PCBP2,PTBP1,RPL38,RPS
	Anormalidadas a iniúria da			14,SNRNP200, U2AF1
	Anormandades e injuria do			
	Organismo			
4	Câncer, Anormalidades de	21	15	BCLAF1,CDC5L,CKAP5,EIF2S1
	Injúria do Organismo, Doenças			,G3BP1,
	do sistema reprodutivo			HIST1H1C,IGF2BP1,RANBP2,R
				PL3,RPL4,RPL9,RPL10,RPL13,R
				PL23, ZC3HAV1
5	Morte e sobrevivência celular,	16	12	CD3EAP,CFL1,DDX6,DNAJA1,

	Comprometimento celular,			GLTSCR2,
	Desenvolvimento e função do			KPNB1,KRT1,MOV10,RAB7A,S
	sistema nervoso			RP9,SRP68, TCEB1.
6	Desenvolvimento celular,	16	12	EEF1A1,EEF1E1,PGRMC1,PRD
	Crescimento e Proliferação			X1,
	Calular Desenvolvimente a			RPS13,RPS16,SRRM1,SRSF1,ST
	Celular, Desenvolvimento e			RAP,TGFB111,TRIM25
	função do Tecido Conjuntivo			
7	Doenças Gastrointestinais,	16	12	AP3D1,DYNC1H1,EIF5B,HIST2
	Doencas do sistema hepático.			H2BE (includes others),
				HSP90AB1,HSPA9, PCBP1,
	Esteatose nepatica			PHGDH,RFC1,RPS24,SLIRP,SW
				AP70

Os parceiros de interação da FAK, com as interconexões das redes nas quais estão inseridos e também sua localização subcelular estão ilustrados na Figura 24. Para essa análise foram consideradas somente as interações diretas entre as proteínas.

_



Figura 24. Representação esquemática das proteínas identificadas (somente as identificadas, sem interações indiretas) em suas respectivas localizações subcelulares e com conexões já descritas na literatura. Em destaque, FAK (PTK2).

4.7. Validação das proteínas identificadas por Western Blotting

Após a identificação pelo espectrômetro de massas, algumas interações foram validadas por imunoprecipitação seguida de *Western Blotting*. A associação entre FAK e HSP90 e entre FAK e *Paxillin* (PXN) foram validadas por meio da imunoprecipitação de FLAG em extratos de FAK-FLAG-*Flp-In* tratadas ou não com tetraciclina (Fig. 25).



Figura 25. Validação por *Western Blotting* de proteínas co-imunoprecipitadas com FAK. Os complexos eluídos foram avaliados com os anticorpos anti-Hsp90 α B e anti-paxilin. As interações foram observadas nos extratos induzidos (+tet), ou seja, com superexpressão de FLAG-FAK.

Estudos anteriores já demonstraram que FAK interage com PXN (SCHESWOHL *et al.*, 2008) e também com HSP90 (TAIPALE *et al.*,2012). Esses resultados demonstram a eficiência do sistema *Flp-In* juntamente com a imunoprecipitação de FLAG em recuperar essas interações clássicas.

4.8. A via de modificação pós-transcricional do RNA

A via de modificação pós transcricional do RNA engloba vários mecanismos de controle gênico pós-transcricional, como o capeamento do mRNA, a poliadenilação da extremidade 3' do mRNA, o *splicing* e a maturação do mRNA. Todos esses fatores são regulados por diferentes proteínas e levam à maturação do RNA mensageiro e sua exportação para o citoplasma. Nesse contexto, a via de modificação transcricional foi a que apresentou o maior *score* de enriquecimento dentre as proteínas imunoprecipitadas com FAK. Logo, as proteínas identificadas que participam do processamento do RNA e suas etapas foram identificadas e classificadas quanto ao processo biológico que estão envolvidas.

Tabela 2. Proteínas associadas ao processamento do RNA, identificadas nas frações imunoprecipitadas com FAK.

Símbolo	Nome da proteína	Número IPI		Tipo	Processo
			Localização		biológico
			subcelular		(proveniente
					do IPA)
ALYREF	Aly/REF export	IPI01010794.		Regulado	Ligação ao
	factor	1	Núcleo	r da	RNA
			INUCIEO	transcriçã	
				0	
CDC5L	CDC5 cell division	IPI00465294.	Núalao	Outro	Splicing do
	cycle 5-like	2	Inucleo		RNA
DDX5	DEAD (Asp-Glu-	IPI00017617.		Enzima	Processamento
	Ala-Asp) box	1	Núcleo		e Maturação
	helicase 5				do RNA

DDX17	DEAD (Asp-Glu-	IPI00889541.		Enzima	Processamento
	Ala-Asp) box	2	Núcleo		do RNA
	helicase 17				
HNRNPA0	Heterogeneous	IPI00011913.		Outro	Processamento
	nuclear	1			do RNA
	ribonucleoprotein		Nucleo		
	A0				
HNRPDL	Heterogeneous	IPI00045498.		Outro	Processamento
	nuclear	4	Neislas		do RNA
	ribonucleoprotein		Nucleo		
	D-like				
HNRNPR	Heterogeneous	IPI00910614.		Outro	Processamento
	nuclear	1			do RNA
	ribonucleoprotein		Nucleo		
	R				
HNRNPUL	Heterogeneous	IPI00402391.		Outro	Processamento
1	nuclear	3	Núcleo		do RNA
	ribonucleoprotein		Nucleo		
	U-like protein 1				
NUDT21	Nudix (nucleoside	IPI00552186.		Outro	Processamento
	diphosphate linked	3	Núalaa		do RNA
	moiety X)-type		Nucleo		
	motif 21				
PABPC4	Poly(A) binding	IPI00642944.		Outro	Processamento
	protein,	1	Citoplasma		do RNA
	cytoplasmic 4				
	(inducible form)				
PCBP1	Poly(rC) binding	IPI00016610.		Regulado	Processamento
	protein 1	2	Núalaa	r da	do RNA
			INUCIEU	transcriçã	
				0	

PPAN	peter pan homolog	IPI00219793.		Outro	Processamento
	(Drosophila)	1	Núcleo		e <i>splicing</i> do RNA
PRPF8	PRP8 pre-mRNA	IPI00007928.		Outro	Splicing do
	processing factor 8	4			RNA
	homolog (S.		Nucleo		
	cerevisiae)				
PRPF31	PRP31 pre-mRNA	IPI00657721.		Outro	Splicing do
	processing factor	1	Núcleo		RNA
	31 homolog (S.		INUCIEO		
	cerevisiae)				
PTBP1	polypyrimidine	IPI00179964.		Enzima	Processamento
	tract binding	5	Núcleo		e splicing do
	protein 1				RNA
RPS6	Ribosomal protein	IPI00021840.	Citoplasma	Outro	Processamento
	S 6	1	enephilonia		do RNA
RBM25	RNA binding motif	IPI00004273.		Outro	Processamento
	protein 25	6	Núcleo		e <i>splicing</i> do
RDI 35A	Ribosomal protein	IPI00703102		Outro	KNA
KI LJJK	L35a	1	Citoplasma	Ouro	do RNA
RPS15	ribosomal protein	IPI00479058.		Outro	Processamento
	S15	2	Citoplasma		do RNA
RPS16	Ribosomal protein	IPI00221092.		Outro	Processamento
	S16	8	Citoplasma		do RNA
RPS24	Ribosomal protein	IPI00847986.	Citoplasma	Outro	Processamento
	S24	1			do RNA
RPS28	Ribosomal protein	IPI00719622.	Citoplasma	Outro	Processamento
	S28	1			do RNA
SFPQ	Splicing factor	IPI00216613.	Núcleo	Outro	Splicing do
	proline/glutamine-	1			RNA

	rich				
SNRNP200	small nuclear	IPI00420014.		Enzima	Processamento
	ribonucleoprotein	2	Núcleo		e splicing do
	200kDa (U5)				RNA
SNRNP70	Small nuclear	IPI00219483.		Outro	Splicing do
	ribonucleoprotein	1	Núcleo		RNA
	70kDa (U1)				
SRPK1	SRSF protein	IPI00966190.	Nicolaa	Quinase	Splicing do
	kinase 1	2	Nucleo		RNA
SRPK2	SRSF protein	IPI00333420.	Néoloo	Quinase	Splicing do
	kinase 2	6	Nucleo		RNA
SRRM1	serine/arginine	IPI00647720.	Nicolaa	Outro	Processamento
	repetitive matrix 1	1	Nucleo		do RNA
SRSF1	Serine/arginine-	IPI00218592.		Outro	Splicing do
	rich splicing factor	5	Núcleo		RNA
	1				
SSB	Sjogren syndrome	IPI00916802.		Enzima	Processamento
	antigen B	1	Núcleo		e Maturação
	(autoantigen La)				do RNA
U2AF1	U2 small nuclear	IPI00619942.		Outro	Processamento
	RNA auxiliary	1	Núcleo		do RNA
	factor 1				

Dentre essas proteínas, algumas estão envolvidas na regulação do *splicing*, sendo estas englobadas em três classes: proteínas SR e relacionadas, proteínas hnRNPs e outras proteínas ligantes de RNA. Na classe de proteínas SR e relacionadas, há dois fatores de *splicing* (SFPQ e SRSF1) e duas quinases (SRPK1 e SRPK2). Quatro pertencem à família das proteínas hnRNPs (hnRNPA0, hnRNPDL, hnRNPR, hnRNPUL1), duas são da família

DEAD-BOX (DDX5 e DDX17) e seis são proteínas ribossomais (RPL35A, RPS6, RPS15, RPS16, RPS24 e RPS28).

A Figura 26 ilustra algumas das interações obtidas entre os fatores de *splicing* identificados e as outras proteínas ligantes de RNA pelo programa *Ingenuity*[™], com as respectivas sublocalizações celulares. O conjunto de proteínas que compõe o spliceossomo está destacado na Figura 26 no quadro pontilhado. Dentre as proteínas imunoprecipitadas com FLAG-FAK e que constituem o spliceossomo citamos ALYREF, DDX5, DDX3X, NUDT21, SNRNP70, SPRK1, SRPK2, SRSF1 e U2AF1. Também em azul, na legenda da Figura, apontam-se as principais classes de proteínas: enzimas, quinases, reguladores da transcrição e tradução, transportadores e outras.



Figura 26. Rede de interação das proteínas ligantes de FAK envolvidas na via de modificação pós-transcricional do RNA. Em destaque com o quadro pontilhado, as proteínas que compõem o spliceossomo. Programa utilizado para gerar essa imagem: *Ingenuity Pathway Analysis*.

4.9. FAK influencia o splicing do gene repórter E1A

A identificação de uma quantidade elevada de proteínas relacionadas ao *splicing* nos levou a investigar o papel da proteína FAK nesse processo. Para isso, avaliamos se FAK seria capaz de modular o processo de *splicing* de transcritos de mRNA provenientes de um gene repórter.

Para testar essa hipótese, células FLAG-FAK-*Flp-In* foram transfectadas com o minigene E1A (vide Material e Métodos, seção 3.2.8) e em seguida, tratadas com tetraciclina para a indução da superexpressão de FAK.

A Figura 27 demonstra que a superexpressão de FAK culmina com a alteração no padrão de clivagem das isoformas do gene repórter E1A. As isoformas 9S, 10S e 13S apresentaram um aumento em relação às amostras não induzidas (-tet), enquanto que a forma não processada do RNA (*unspliced*) se apresentou diminuída. Tais resultados indicam um favorecimento do *splicing* com a superexpressão da FAK, apontando para um novo papel desta quinase na modulação do *splicing* do RNA mensageiro.

RESULTADOS



Figura 27. Eletroforese em gel de agarose e quantificação do padrão de *splicing* dos transcritos de mRNA provenientes do gene repórter transfectado em células HEK FLAG-FAK *Flp-In.* (A) Análise por eletroforese em gel de agarose 3% da amplificação por PCR do gene repórter E1A; Na primeira canaleta, padrão de massa molecular; 1, 2 e 3: isoformas geradas nos extratos não induzidos (-tet); 4, 5 e 6: isoformas geradas nos extratos induzidos (+tet) ou seja, com superexpressão de FAK. A última canaleta representa o controle negativo da PCR. No gráfico abaixo, consta a quantificação das isoformas geradas normalizadas pela soma total das isoformas obtidas em cada ensaio utilizando o programa *ImageJ.* * *p* < 0.05 9S +tet versus 9S -Tet. # *p* < 0.05 10S +tet versus 10S -Tet. † p < 0.05 13S +tet versus 13S -Tet. Teste estatístico aplicado: Teste-T.

RESULTADOS

A demonstração de que a FAK altera o *splicing* dos transcritos de mRNA provenientes do gene repórter, juntamente com a descrição dos parceiros de FAK que estão envolvidos na via de modificação pós-transcricional do RNA, corroboram a hipótese que FAK pode modular o processo de *splicing* do RNA mensageiro.

4.10. O domínio FERM interage com fatores de splicing

Experimentos adicionais foram realizados utilizando somente o domínio FERM da FAK, também clonado no sistema *Flp-In*. O domínio FERM foi utilizado devido a sua importância para a localização nuclear de FAK já que possui sítios de localização nuclear em sua estrutura (LIM *et al.*, 2008; LANGE *et al.*, 2007). Os experimentos foram conduzidos com células FERM-*Flp-In*, sem e com indução por tetraciclina (Fig. 28A). Após verificação da expressão foram realizados três experimentos independentes e em seguida realizado a imunoprecipitação com anti-Flag. A Figura 28B apresenta o gel dos complexos protéicos eluídos, analisados por SDS-PAGE e impregnados por nitrato de prata. Os extratos eluídos foram submetidos às análises por espectrometria de massas e os parceiros de FERM identificados segundo o mesmo critério utilizado para FAK.

108


Figura 28. Células FERM *Flp-In* e interatoma. (A) Análise dos extratos totais não tratados e tratados com tetraciclina demonstram a expressão do domínio FERM somente nos extratos induzidos (+tet), na altura esperada (47 kDa). (B) A imunoprecipitação dos extratos induzidos (+tet) se apresenta enriquecida frente à do extrato não induzido (-tet).

Dentre os vários parceiros de interação de FERM, foram identificados 37 proteínas em comum com os extratos fracionados de FAK. As proteínas comuns entre o interatoma de FAK e FERM são três proteínas da família hNRNPs (hnRNPDL, hnRNPR, hnRNPUL1), quatro proteínas da família DDX (DDX17, DDX5, DDX6, DHX9) e o fator de *splicing* SRSF1 (SF2/ASF), dentre outras. O interatoma de FERM também teve a via de Modificações pós-transcricionais do RNA em destaque, como ilustrado na Figura 29B.



Figura 29. O interatoma de FERM. (A) Diagrama de Venn ilustrando a quantidade de proteínas em comum entre os interatomas de FERM (rosa) e FAK (azul). (B) As principais proteínas envolvidas com a via de modificação pós-transcricional do RNA e sua localização subcelular. O domínio FERM interagiu com vários fatores de *splicing* e proteínas que o regulam. A ilustração foi feita com uso do programa *Ingenuity Pathway Analysis*.

Entre os parceiros de interação de FERM, sete pertencem à família SR, quatro à família hnRNP e outras sete proteínas são participantes do *splicing* (incluindo fatores de *splicing*). Das proteínas que participam do *splicing*, foram identificados como parceiros de

FERM a proteína Sc35 (SRSF2) e o fator de *splicing* SF3b155 (SF3B1). De acordo com a literatura, estas proteínas são marcadores de *speckles* nucleares e spliceossomo ativo, respectivamente (GIRARD *et al.*, 2012).

Para demonstrar se o domínio FERM por si só é capaz de regular o *splicing*, realizamos os experimentos com o gene repórter E1A em células FERM-*Flp-In*. Apesar de interagir com fatores de *splicing* e proteínas que participam desse processo, bem como com proteínas que constituem o spliceossomo, observou-se que somente o domínio FERM não é suficiente para conduzir a alteração do *splicing* dos transcritos de mRNA provenientes do gene repórter E1A (Fig. 30).



Figura 30. Eletroforese em gel de agarose e representação gráfica do padrão de *splicing* dos transcritos de mRNA provenientes do gene repórter transfectado em células HEK 293 FERM- *Flp-In*. Análise por eletroforese em gel de agarose 3% da amplificação por PCR do gene repórter E1A; 1, 2 e 3: isoformas geradas pelos extratos não induzidos (-tet); 4, 5 e 6: isoformas geradas pelos extratos induzidos com tetraciclina (+tet) e superexpressão de

FERM-FAK. Ao lado, o gráfico com as respectivas intensidades de cada isoforma analisada.

4.11. A proteína SRSF1 é parceira de FAK em ensaios de imunoprecipitação.

Após a demonstração de que FAK regula o *splicing* do gene repórter E1A, experimentos de imunoprecipitação foram realizados para validar a associação entre FAK e o fator de *splicing* SRSF1 identificada como uma das suas parceiras no núcleo. A figura 31 demonstra a presença de SRSF1 no imunocomplexo de FAK obtido com anti-FLAG. Além disto, foi realizada uma imunoprecipitação com anticorpo anti–SRSF1 e avaliada a presença de FAK nesse imunoprecipitado.



Figura 31. *Western Blotting* representativos da interação entre SRSF1 e FAK. (A) Validação da proteína SRSF1 em extratos imunoprecipitados com anti- FLAG; (B) Imunoprecipitação com anticorpo anti-SRSF1 confirmam também a presença de FAK nesse imunocomplexo.

A imunoprecipitação utilizando o anticorpo anti-SRSF1 e anti-FLAG validaram a existência de uma interação, que pode ser direta ou indireta, entre essas duas proteínas. Esse resultado corrobora a hipótese de que FAK está envolvida na regulação do *splicing* do RNA mensageiro.

4.12. Imunofluorescência de FLAG-FAK e sua localização em speckles nucleares

Dado o papel de FAK no *splicing* e sua localização no núcleo, foi avaliado por imunofluorescência se FAK está localizada nas regiões nucleares denominadas *Nuclear Speckles*. Essas regiões são descritas como ricas em proteínas participantes do *splicing* e, apesar de ainda não estar bem definido, acredita-se que nessas regiões ocorrem o *splicing* do próprio RNA. Para isso, foi realizada uma dupla marcação com anticorpo anti-Sc35, descrito como um marcador de *nuclear speckles*, e anti-FAK. Imagens de células FLAG-FAK- *Flp-In* não induzidas (-tet) e induzidas (+tet) marcadas com anti-FAK e anti-SC35 demonstram a existência de colocalização entre FAK e Sc35 no núcleo (Fig. 32).



Figura 32. Microscopia confocal das células FLAG-FAK-*Flp-In*. Marcação com anticorpo anti-FLAG (em verde), anti-Sc35 (em vermelho), DAPI (em azul); as células foram induzidas (+tet) ou não (-tet) e avaliadas quanto à expressão das proteínas marcadas. A escala indicada pela barra branca é de 10µm.

Para avaliarmos se FAK, além de se colocalizar, também interage com Sc35 foram realizados experimentos de co-imunoprecipitação. A proteína Sc35 foi recuperada no imunoprecipitado de FLAG-FAK, realizado com anticorpo anti-FLAG, assim como FAK está presente no imunoprecipitado de Sc35. Estes dados indicam que FAK e Sc35 se colocalizam e interagem direta ou indiretamente nos *speckles* nucleares. O mesmo foi observado em imunoprecipitados utilizando extratos de células FLAG-FERM. Além dos resultados obtidos por espectrometria de massas, análises por *Western Blotting*

demonstraram que a proteína Sc35 foi também recuperada nos imunoprecipitados de FLAG-FERM (Fig.33).



Figura 33. Validação por imunoprecipitação e *western blot* da interação entre FAK e a proteína Sc-35. A imunoprecipitação reversa, com o anticorpo anti-SC35 e *blot* para FAK demonstra que FAK é imunoprecipitada com Sc-35.

4.13. Avaliação da especificidade do sistema FLAG-*Flp-In* para os experimentos de imunoprecipitação

Para averiguar se o conjunto de proteínas que interagiram com FAK foi imunoprecipitado de forma específica, realizamos uma análise comparativa entre as interações de FAK e uma proteína não relacionada, a αB-cristalina (CryAB). Para esta análise, foram desenvolvidas células FLAG-CryAB-*Flp-In*. Estas células passaram pelos mesmos procedimentos que as células FLAG-FAK-*Flp-In*.

A superexpressão de αB-cristalina após a indução com tetraciclina foi avaliada com anticorpos anti-FLAG, anti-CryAB e normalizados com anti-GAPDH (Fig. 34A). Esses extratos foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpo anti-FLAG e os extratos eluídos foram analisados por espectrometria de massas. No total, 46 proteínas foram identificadas e avaliadas quanto às suas funções celulares e moleculares com o programa *IPA*. Na Figura 34B, 7 proteínas estão envolvidas com sobrevivência e morte celular (17%), 2 em enovelamento de proteínas (4%), 2 em organização celular (4%), 6 em modificações pós-transcricionais do RNA (14%), 3 em ciclo celular (7%), 8 em crescimento e proliferação celular (19%), estando as demais distribuídas em outras classes.

RESULTADOS



Figura 34. Caracterização das células FLAG-CryAB-*Flp-In* e seu interatoma. (A) Análise por *western blot* das células que superexpressam CryAB em sistema *Flp-In*. (B) Análise das proteínas identificadas com o uso do programa Ingenuity e suas principais vias associadas.

A Tabela 03 apresenta as proteínas identificadas nos extratos imunoprecipitados das células FLAG-CryAB-*Flp-In* e as vias a que estão associadas. Para cada via, apresenta-se o *score* de significância, o número e identificação das moléculas associadas.

	Vias associadas	Score	Número de moléculas	Moléculas
1	Crescimento e proliferação celular, Morfologia Celular, Ciclo Celular	24	13	BAG2, CCAR1, CDKN2A, CNBP, EIF2A, GNL3, LMNB1, PRDX3, RPS21, SET, SF3A1, SNRPD1, SRSF9
2	Desenvolvimento Celular, Crescimento e Proliferação Celular, Desenvolvimento do Sistema e Função Hepático	22	12	A2M, ATPJ, HPR, MOV10, MYH10, MYL6,PSMA4, RANBP1, RPS16, RPS25,TCEB2, TMOD2
3	Sobrevivência e Morte Celular, Morfologia Celular, Comprometimento Celular	20	11	CASP12, CRYAB, DHX36, ERLIN2, EZR, PCNP, PTPN11, RPL22, RPS19, ST13, USP15

Tabela 03. Principais vias identificadas com as proteínas imunoprecipitadas com CryAB.

Para testarmos se a superexpressão de αB-cristalina induzida por tetraciclina poderia interferir no padrão de *splicing* dos transcritos de mRNA do minigene E1A, as células FLAG-CryAB-*Flp-In* foram transfectadas com o plasmídeo E1A e induzidas ou não com tetraciclina por 48 horas. A Figura 35 demonstra que a superexpressão de CryAB não altera o padrão de clivagem das isoformas dos transcritos do gene repórter E1A. As isoformas 9S, 10S, 11S, 12S e 13S das amostras induzidas (+tet) apresentaram-se semelhantes às

RESULTADOS

isoformas das amostras não induzidas (-tet). Tais resultados indicam que a proteína αBcristalina não modula o *splicing* dos transcritos de mRNA provenientes do minigene E1A.



Figura 35. Eletroforese em gel de agarose e representação gráfica do padrão de *splicing* dos transcritos de mRNA do gene repórter transfectado em células HEK 293 FLAG-CryAB- *Flp-In*. Análise em gel de agarose 3% do padrão de isoformas gerados pelo gene repórter E1A em células que superexpressam CryAB. Abaixo, a quantificação das isoformas geradas, sem diferença estatística válida.

5. DISCUSSÃO

5.1. A superexpressão de FAK em células *Flp-In* leva à sua ativação.

A escolha de um sistema capaz de expressar uma proteína recombinante permanentemente, sob indução de um promotor controlado por tetraciclina apresenta vantagens. Há garantia que 100 % das células expressam a proteína de interesse, já que em experimentos com transfecção transiente nem todas as células expressam a proteína recombinante. Além disso, há um controle da taxa de expressão da proteína recombinante. Como demonstrado em nossos resultados, o uso do sistema de indução por tetraciclina possibilitou a realização de uma dose resposta na quantidade de FAK expressa em função do tratamento com tetraciclina.

Fixando uma quantidade padrão de tetraciclina (500 ng/mL) na qual houve uma produção máxima de FAK, os experimentos seguintes realizados permitiram avaliar a célula quanto ao seu fenótipo e distribuição da proteína. Esses não foram alterados, tornando o sistema de células *Flp-In* um bom sistema para estudo dos parceiros de interação da FAK.

Além da avaliação do fenótipo, as células foram avaliadas quanto à expressão de FAK recombinante e da sua forma ativa. Como apresentado nos resultados, foi possível detectar FAK em frações nucleares (Fig. 17), assim como sua forma ativa nos extratos com superexpressão (Fig.15). Esses resultados indicaram que o sistema de superexpressão induziu a ativação da FAK mimetizando o que acontece em outros sistemas estudados (LIM *et al.*, 2013; GOLUBOVSKAYA & CANCE, 2011).

123

Trabalhos recentes abordam os mecanismos que levam FAK ao núcleo e o papel que ela desempenha neste compartimento celular (YI *et al.*, 2003; AOTO *et al.*, 2002; AROLD, 2011; SCHALLER, 2010). Apesar desses esforços, ainda não se sabe ao certo o papel que FAK desempenha no núcleo. Sendo assim, o estudo dos parceiros de interação de FAK é uma das possíveis abordagens para se compreender o papel funcional dessa proteína nas vias biológicas das quais ela participa.

5.2. Ensaios de imunoprecipitação identificam proteínas da via de modificações póstranscricionais do RNA interagindo com FAK

Foram realizados ensaios de imunoprecipitação para avaliar os parceiros de interação da FAK e identificar as vias por eles representadas. Análises do interatoma da FAK demonstraram que proteínas já previamente descritas como parceiras de FAK, a citar PXN, HSP90 e TGFB111(SCHESWOHL *et al.*, 2008;TAIPALE *et al.*, 2012; CROKE *et al.*, 2007), foram encontradas neste imunoprecipitado. A identificação desses parceiros foi de fundamental importância para demonstrar que este sistema é capaz de imunoprecipitar interatores específicos de FAK já previamente descritos na literatura. Outras proteínas interatoras de FAK, já descritas na literatura, como talina, não foram co-imunoprecipitadas no IP de FAK. Alguns fatores podem estar envolvidos nesse resultado, como por exemplo, as células HEK 293 não são ricas em adesões focais, o que justifica o baixo número de proteínas de adesão no imunoprecipitado de FAK.

Como o objetivo foi avaliar parceiras nucleares de FAK, foram realizados fracionamentos dos extratos celulares. Esses fracionamentos levaram à obtenção de extratos nucleares enriquecidos e aumentaram a identificação nos experimentos de espectrometria de massas dos alvos nucleares. Neles, os ensaios de imunoprecipitação demonstram que FAK interage com uma quantidade significativa de proteínas envolvidas com a via de modificações pós-transcricionais do RNA, como as proteínas ribossomais e proteínas de *splicing* do mRNA.

Em síntese, a via de modificação pós-transcricional do RNA refere-se aos processos e proteínas envolvidas que coordenam o *splicing*, exportação, estabilidade, localização e tradução do RNA. Esses eventos são de fundamental importância para direcionar as respostas celulares frente a diversos estímulos como, metabolismo oxidativo, resposta imune, resposta ao estresse, doenças, dentre outros (KEENE, 2007).

A capacidade de determinadas proteínas se associarem aos transcritos nascentes e fornecerem proteção contra degradação representa um mecanismo importante na modificação pós-transcricional do RNA. Entre essas proteínas citam-se as hnRNPs e proteínas SR. Além de protegerem o transcrito primário, elas o preparam para o *splicing* e recrutam, junto com a maquinaria do spliceossomo, os fatores de *splicing* (NILSEN&GRAVELEY,2010).

A identificação de fatores de *splicing* nos imunoprecipitados de FAK nos indicou que FAK pode estar envolvida na modulação do *splicing* do mRNA.

125

5.3. FAK e seu domínio FERM interagem com fatores de splicing

Averiguamos que os ensaios de imunoprecipitação trouxeram como parceiros de FAK alguns fatores de *splicing* e proteínas associadas a esse processo, como CDC5L, U2AF65, PRPF8, PRPF31, SRSF1, SFPQ, dentre outros já citados na tabela 1.

O fator de *splicing Serine/Arginine-rich* (SRSF1) também conhecido como SF2/ASF, pertence à família das proteínas SR (Serina/Arginina) e tem papel central no *splicing*, tanto constitutivo como no alternativo. Além desse papel, SRSF1 regula outros aspectos do metabolismo do RNA, como a estabilidade do mRNA, exportação nuclear, tradução e processamento de microRNAs (miRNA) (DAS *et al.*, 2012). Trabalhos demonstram que o gene de SRSF1 é essencial, já que sua deleção impede o ciclo celular e provoca apoptose (LI *et al.*, 2005). Geralmente sua expressão está aumentada em diferentes tipos de câncer (THORSEN *et al.*, 2011). As proteínas hnRNPA1 e SRSF1 são capazes de controlar a escolha do sítio de *splicing*. Preferencialmente, SRSF1 promove o *splicing* em sítios proximais, em contrapartida com hnRNPA1, que favorece o *splicing* em sítios distais (BAI *et al.*, 1999).

Outro aspecto importante desse fator de *splicing* é que cardiomiócitos deficientes de SRSF1 (SF2/ASF) possuem um fenótipo inesperado de hipercontração, decorrente do *splicing* incorreto que ocorre no transcrito da CAMKII δ (*Ca*²⁺/*calmodulin-dependent kinase* II δ). Essa falha no *splicing* leva a defeitos na contratilidade dos cardiomiócitos por ausência dessa quinase nas membranas do sarcolema, além de defeitos no desenvolvimento do coração (XU *et al.*, 2005).

Nesse contexto, resolvemos validar a interação de FAK com o fator de *splicing* SRSF1 por ensaios de co-imunoprecipitação. Observamos que, tanto em extratos imunoprecipitados com anticorpo anti-FLAG, como naqueles imunoprecipitados com anti-FAK, a proteína SRSF1 (SF2/ASF) se encontrava no complexo imunoprecipitado. Em outros experimentos de imunoprecipitação, em que foi utilizado o anticorpo anti-SRSF1, a proteína FAK também foi imunoprecipitada em extratos tratados com tetraciclina (+tet), reforçando que essas proteínas interagem nesse sistema.

Estudos de Ladd *et al.* (2005) demonstraram que proteínas ligantes de RNA pertencentes à família CELF (*CUG-BP and Elav-Like-Family proteins*) estão envolvidas no *splicing* alternativo durante o desenvolvimento do coração. Camundongos transgênicos que expressam um dominante negativo nuclear de CELF, específico para o coração, desenvolveram hipertrofia cardíaca e cardiomiopatia dilatada, com defeitos no início do *splicing* alternativo. Esses estudos apontam que o processo de *splicing* pode modular tanto o desenvolvimento embrionário do coração, como também a atividade do músculo cardíaco, tornando promissor o papel da proteína FAK na participação desses eventos.

Nos experimentos realizados com o domínio FERM da FAK, SRSF1 também foi imunoprecipitada. Este dado indica que o domínio FERM da FAK pode intermediar a interação entre FAK e SRSF1. O domínio FERM está envolvido em diversas interações intermoleculares, funcionando como um sítio de *docking* para a interação com proteínas nucleares, citoplasmáticas ou proteínas transmembranas. No núcleo, FERM se liga à p53 e à E3-ligase MDM2 e promove a ubiquitinação e degradação de p53 (LIM *et al.*, 2008). Além dessa evidência, foi demonstrado que FAK inibida se acumula no núcleo e que seu domínio FERM se liga ao fator de transcrição GATA4, aumentando a ubiquitinação e degradação de VCAM-1 induzida por TNFα em células endoteliais. Esse evento sugere um novo papel de FAK na expressão de VCAM-

1, proteína crítica nas respostas anti-inflamatórias (LIM *et al.*, 2012). Como nas interações descritas acima, FERM também pode atuar como um domínio de *docking* na associação com os fatores de *splicing*, já que a superexpressão desse domínio não modula o *splicing* do gene repórter E1A.

Como a principal via identificada foi a de modificação pós-transcricional do RNA, houve a necessidade de se avaliar a sublocalização de FAK no núcleo. Sabe-se que o núcleo contém várias subregiões e dentre elas, os denominados *speckles* nucleares. Essas regiões foram escolhidas, porque possuem grande quantidade de partículas ribonucleoproteicas e também, por ser descrita como centro onde ocorre as regiões de *splicing* (WAHL *et al.*, 2009; FOX&LAMOND, 2010).

Dessa forma, utilizando a proteína Sc-35, um marcador de *speckles* nucleares, foi demonstrado que FAK se colocaliza com essa proteína tanto em células não tratadas quanto nas tratadas com tetraciclina. Entretanto, nas células com superexpressão de FLAG-FAK, o perfil de distribuição da proteína Sc-35 se mostrou diferente, com um acúmulo pontual de Sc-35. Porém, essa diferença de distribuição pode ser decorrente de outros fatores, como o estado funcional da célula e seu estado de diferenciação (SAHLAS *et al.*, 1993). Outros estudos de localização subnuclear precisam ser realizados para um melhor detalhamento do perfil de distribuição de Sc-35 sob diferentes estímulos.

Outra evidência demonstra que, a proteína RANBP2 identificada em nossos extratos também está relacionada à proteína Sc-35. Trabalhos demonstram que essa proteína é importante na formação dos *speckles* nucleares. Experimentos utilizando siRNA e células com *knockdown* para a RanBP2 demonstraram que a perda dessa proteína culmina na

ausência dos *speckles* nucleares e promove a formação dos grânulos citoplasmáticos, estruturas presentes nas células em intérfase (SAITOH *et al.*, 2012).

Ainda reforçando a ideia de que esses fatores interagem com FAK, direta ou indiretamente, ensaios realizados com o domínio FERM confirmaram sua interação com Sc-35. Essa associação também foi validada nos extratos com superexpressão de FAK, tornando promissor o papel de FAK na regulação do *splicing*. Além de interagir com Sc-35, como demonstrado em nossos resultados, o domínio FERM foi capaz de imunoprecipitar 34 proteínas da via de modificações pós-transcricionais do RNA.

O interatoma de FLAG-FERM identificou dois fatores de *splicing* (SF3B1 e SF3B2) e mais quatro proteínas da família SR (SRSF2, SRSF3, SRSF7 e SRSF9), além de SRSF1, proteína também identificada nos imunoprecipitados com FLAG-FAK. Trabalhos prévios demonstraram que o fator de *splicing* SF3B1 (SF3b155) fosforilado é essencial na ativação do splicessomo (GIRARD *et al.*, 2012) e que a sua defosforilação é crucial nos rearranjos estruturais do spliceossomo para ocorrer a transição do primeiro para o segundo passo do *splicing* (SHI *et al.*, 2006). As proteínas SRSF7 (9G8) e SRSF9 (SRp30c) possuem uma ação cooperativa no *splicing* alternativo do hormônio gonadotrófico (GnRH), ligando-se em regiões diferentes desse transcrito, mas não interagem entre si (PARK *et al.*, 2006).

Portanto, nossos dados demonstram que fatores de *splicing* estão interagindo com FAK e que algumas dessas interações se dá por meio do seu domínio FERM.

5.4. O papel de FAK na regulação do *splicing* dos transcritos de mRNA provenientes do gene repórter E1A

Os resultados das imunoprecipitações com FAK ou FERM indicaram que FAK pode atuar como um regulador do *splicing*. Experimentos com o gene repórter E1A e a superexpressão de FAK levou a uma mudança no perfil de isoformas gerados. Observou-se que FAK promoveu o *splicing* no sítio 5′ distal (isoforma 9S), diminuindo o favorecimento do *splicing* no sítio 5′ proximal (13S). Isso resultou no aumento das isoformas 9S e 10S nos experimentos com superexpressão de FAK. Esse papel é similar ao que ocorre em trabalhos de ZHOU *et al.*, 2013, no qual o *splicing* do gene repórter E1A responde ao tratamento com EGF e superexpressão da proteína SRPK1, mudando o *splicing* dos sítios 5′ proximais (13S) para o 5′distal (9S).

Como demonstrado, neste trabalho FAK é capaz de interagir com Sc35 e SRSF1. Nos ensaios de imunoprecipitação, FAK também foi capaz de co-imunoprecipitar a proteína SRPK1, uma quinase que regula o *splicing*. Essas evidências sugerem que FAK pode modular o *splicing* alternativo, direta ou indiretamente por meio da interação e/ou fosforilação com esses fatores de *splicing*. Estudos adicionais devem ser realizados para compreender os mecanismos pelos quais FAK regula o *splicing* e detalhar o seu papel no processamento do mRNA.

Estudos prévios demonstraram que FAK é alvo de ligação da proteína Src. Ao se autofosforilar no resíduo de tirosina 397 ocorre um favorecimento da ligação de Src em FAK através do domínio SH2 (SCHALLER *et al.*, 1994). A associação entre FAK/Src promove fosforilações subsequentes nos resíduos de tirosina 576, 577, 861 e 925. As

fosforilações nos resíduos 567 e 577 presentes no *loop* de ativação da FAK levam à atividade máxima dessa proteína (CALALB *et al.*, 1995). Também há evidências que Src se liga à tirosina 397 de FAK para estimular a migração celular por meio da fosforilação da proteína p130Cas (CARY *et al.*, 1998).

Gondran e Dautry (1999) demonstraram que a proteína Src é capaz de regular o *splicing* e transporte dos transcritos de *Lymphotoxin* α (LT α). Os autores inferem uma possível regulação do processamento do mRNA por meio da fosforilação de proteínas nucleares, a citar da proteína hnRNPA1. Em trabalhos anteriores foi observado que a proteína hnRNPA1 pode ser fosforilada em tirosinas por membros da família Src e essa fosforilação leva a uma modificação da especificidade de ligação ao RNA (PYPE *et al.,* 1994). Outros estudos também apontam a Src regulando eventos pós-transcricionais como o *splicing* e exportação do mRNA, usando como gene repórter o TNF β (fator de necrose tumoral). Esses autores realizaram a transfecção de plasmídeos contendo os genes Ras e Src em células NIH 3T3 e observaram que ambas transfecções levaram ao acúmulo de RNA nos compartimentos citosólicos e nucleares, porém somente Src induziu modificações no processamento do RNA, especificamente no *splicing* dos transcritos de TNF β e β -globina (NEEL *et al.,* 1995). Esses dados, somados aos achados de Gondran e Dautry (1999) sugerem que FAK pode regular ou ativar fatores de *splicing* cooperativamente com Src.

Além de tirosino-quinases, têm-se demonstrado que algumas MAP quinases são responsáveis pela fosforilação de fatores de *splicing*, como demonstrado no trabalho de AL-AYOUBI e colaboradores (2012). As proteínas ERK2, p38 e JNK MAP quinases são capazes de fosforilar o fator de *splicing* SPF45, o que modula a exclusão do éxon 6 dos transcritos do gene repórter *fas*. Esses dados demonstraram que o fator de splicing SFP45 é

regulado por MAP quinases que direcionam sua expressão e fosforilação (AL-AYOUBI *et al.*, 2012). Somado a isso, sabe-se por estudos anteriores que a fosforilação de FAK no resíduo 925 pela Src promove um sítio de ligação para o domínio SH2 da proteína Grb2, responsável por mediar a ativação de ERK, membro da família das MAP quinases (SCHLAEPFER *et al.*, 1994; SCHLAEPFER *et al.*, 1998;CHEN *et al.*, 1998).

Também importante no contexto da sinalização celular é a interação entre FAK e a proteína PI3K (*Phosphoinositide-3-kinase*). PI3K é importante na transdução de sinais de sobrevivência e migração celular via integrinas (KAPELLER&CANTLEY, 1994). Trabalhos anteriores já demonstraram a interação de FAK e PI3K em plaquetas (GUINEBAULT *et al.*, 1995) e fibroblastos (CHEN&GUAN, 1994). A ligação de PI3K à FAK se dá pelo resíduo de tirosina 397 fosforilado via seu domínio SH2, enquanto que o domínio SH3 de PI3K interage no sítio rico em prolina presente no *linker* entre FERM e quinase (CHEN *et al.*, 1996). Sabe-se também que após sua ativação, PI3K produz PIP3 que promove a ligação à membrana e consequente ativação da serina-treonina quinase, AKT. AKT por sua vez, ativa vias anti-apoptóticas e promove o crescimento celular. Sendo assim, após a ativação de FAK e consequente associação com a subunidade regulatória p85 da PI3K, ocorre a ativação da AKT (DEL RE *et al.*, 2008).

Estudos realizados por Blaustein e colaboradores demonstraram que PI3K altera o *splicing* dos transcritos de mRNA provenientes do gene da fibronectina e que esta modulação ocorre via AKT (BLAUSTEIN *et al.*, 2005). Ainda nesse trabalho, os autores demonstraram que AKT fosforila proteínas da família SR, como a SF2/ASF e também a 9G8 (SRSF7), ambas detectadas no interatoma do FLAG-FERM. Nesse trabalho, formas inativas de AKT não foram capazes de fosforilar a proteína SF2/ASF, demonstrando a

132

necessidade da sua ativação para a fosforilação de proteínas SR. Outro trabalho também demonstrou que AKT fosforila a proteína SRp40 (SRSF5) e modifica o *splicing* dos transcritos de mRNA que geram a proteína PKCβII (PATEL *et al.*, 2005). Apesar dos estudos apontando AKT como possível modulador do *splicing*, os mecanismos pelos quais ela modula o *splicing* ainda não foram esclarecidos. Como FAK possui um papel fundamental na ativação da via PI3K/AKT, e nossos dados demonstram que a superexpressão de FAK é capaz de modular o *splicing*, pode-se inferir que os efeitos da via PI3K/AKT possam ser modulados pela FAK no *splicing*.

Recentemente pesquisas têm sido desenvolvidas integrando modificações na cromatina com o *splicing* alternativo (ZHOU *et al.*, 2013). Esses achados apontam que a estrutura da cromatina e as modificações nas histonas podem influenciar os eventos de *splicing* (LUCO *et al.*, 2011). Em estudos realizados com células C_2C_{12} foi demonstrado que FAK atua na regulação do remodelamento da cromatina. Essa regulação ocorre por meio da interação de FAK com a proteína MBD2 (*methyl CpG-binding protein 2*) em miotubos e fibras musculares isoladas (LUO *et al.*, 2009). Nesse trabalho foi observado que os complexos de FAK-MBD2 no núcleo levaram a uma reorganização da heterocromatina, diminuição da associação de MBD2 com o complexo de proteínas histonas deacetilases (HDAC1) e também com a região promotora do gene miogenina. Dessa forma, observou-se o aumento da expressão da miogenina e consequentemente, da diferenciação muscular. Dessa maneira, surge uma nova possibilidade na qual FAK poderia regular de forma indireta o *splicing* do RNA por meio de sua atuação no remodelamento da cromatina.

Apesar da variedade de estudos que visam um melhor entendimento processo de *splicing*, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos no recrutamento de proteínas para

133

a maquinaria de *splicing* e quais eventos são necessários para a ativação de seus fatores. Sabe-se que muitas proteínas serino-quinases participam desse processo, no entanto, como discutido acima, também existem evidências da participação de outras classes proteicas, como tirosino-quinases e MAP quinases, na regulação do *splicing*. A possibilidade da regulação do *splicing* por tirosino-quinases como a Src juntamente com dados obtidos nesse estudo sugerem que o complexo FAK/Src possa atuar fosforilando e regulando direta ou indiretamente fatores de *splicing* por uma via comum.

Além da regulação por meio dessas vias de sinalização, alguns modelos de regulação do *splicing* pela FAK são propostos para futuros estudos. FAK poderia regular diretamente o *splicing* causando um aumento ou redução da expressão dos fatores de *splicing*. Outra possibilidade seria a atuação de FAK aumentando a taxa de elongação da RNA polimerase II, mudança essa que influencia o *splicing* alternativo (IP *et al.*, 2011). Ainda, FAK poderia recrutar um ativador com função central no controle do *splicing*, como por exemplo, os co-ativadores PGC1 (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1*) e CoAA (*Nuclear Receptor Coactivator Protein*).

A participação de FAK no *splicing* alternativo pode refletir um controle biológico maior do que até o momento proposto para esta quinase. Os mecanismos pelos quais FAK atua na regulação do *splicing* ainda precisa ser explorado, mas os resultados apresentados nesse estudo nos leva a propor um novo papel desta quinase no controle do *splicing* de mRNAs. Neste contexto, FAK poderia modular o processamento do mRNA frente a situações de estresse ou injúria nas quais FAK é responsiva. Essas evidências lançam uma nova frente de estudo, que seria explorar o papel da FAK na regulação do *splicing* frente a diferentes respostas celulares.

6.CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi identificada uma nova função da quinase de adesão focal, FAK, na regulação do *splicing* do mRNA. Os dados apresentados demonstraram que FAK interage com proteínas cruciais na regulação do *splicing*, como os fatores Sc35 e SRSF1, além de se co-localizar com os *speckles* nucleares e ser capaz de modular o *splicing* alternativo *in vivo*. Desta forma, a associação entre FAK e fatores de *splicing* pode ser um mecanismo importante na modulação do processamento do mRNA e, consequentemente, na adaptação celular frente a diferentes estímulos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBI, S. GUAN, J.L. Focal adhesion kinase: Protein interactions and cellular functions. Histology and Histopathology, 17:1163-1171, 2002.

AL-AYOUBI, A.M.; ZHENG, H.; LIU, Y.;BAI, T.; EBLEN, S.T. Mitogen-activated protein kinase phosphorylation of *splicing* factor 45 (SPF45) regulates SPF45 alternative *splicing* site utilization, proliferation and cell adhesion. Molecular and Cellular Biology, 32 (14): 2880-2893, 2012.

ALLEN, T.D.; CRONSHAW, J.M.; BAGLEY, S.; KISELEVA, E.; GOLDBERG, M.W. **The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm.** Journal of Cell Science, 113: 1651-1659, 2000.

AOTO, H.; SASAKI, H.; ISHINO, M.; SASAKI, T. Nuclear translocation of cell adhesion kinase beta/proline-rich tyrosine kinase 2. Cell Structures and Functions, 27:47-61, 2002.

ARAGÃO, A.Z.B.; NOGUEIRA, M.L.C.; GRANATO, D.C.; SIMABUCO, F.M.; HONORATO, R.V.; HOFFMAN, Z.; YOKOO, S.; LAURINDO, F.R.M.; SQUINA, F.M.; ZERI, A.C.M.; OLIVEIRA, P.S.L.; SHERMAN, N.E.; PAES-LEME, A.F. Identification of novel interaction between a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM 17) and Thioredoxin-1. The Journal of Biological Chemistry, 287 (51): 43071 - 43082, 2012. AROLD, S.T. How focal adhesion kinase achieves regulation by linking ligand binding, localization and action. Current Opinion in Structural Biology, 21: 808-813, 2011.

BAI, Y.; LEE, D.; YU, T.; CHASIN, L.A. Control of 3'splice site choice *in vivo* by ASF/SF2 and hnRNPA1. Nucleic Acid Research, 27(4): 1126-1134, 1999.

BAGLEY, S.; GOLDBERG, M.W.; CRONSHAW, J.M.; RUTHERFORD, S.A.; ALLEN, T.D. **The nuclear pore complex.** Journal of Cell Science, 113:3885-3886, 2000.

BLACK, D.L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA *splicing*. Annual Reviews of Biochemistry, 72: 291-336, 2003.

BLAUSTEIN, M.; PELISCH, F.; TANOS, T.; MUÑOZ, M.J.; WENGIER, D.; QUADRANA, L.; SANFORD, J.R.; MUSCHIETTI, J.P.; KORNBLIHTT, A.R.; CÁCERES, J.F.; COSO, O.A.; SREBOW, A. **Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT.** Nature Structural & Molecular Biology, 12 (12): 1037 - 1044, 2005.

BRESSAN, G.C.; QUARESMA, A.J.C.; MOARES, E.C.; MANFIOLLI, A. O.; PASSOS, D. O.; GOMES, M. D.; KOBARG, J. Functional association of human Ki-1/57 with premRNA splicing events. The FEBS Journal, 276: 3770 - 3783, 2009. CACERES, J.F.; MISTELI, T.; SCREATON, G.R.; SPECTOR, D.L.; KRAINER, A.R. Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative *splicing* specificity. Journal of Cell Biology, 138:225-238, 1997.

CALALB, M.B.; POLTE, T.R.; HANKS, S.K. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. Molecular and Cellular Biology, 15:954-963, 1995.

CALVANO, S.E.; XIAO, W.; RICHARDS, D.R.; FELCIANO, R.M.; BAKER, H.V.; CHO, R.J.; CHEN, R.O; BROWNSTEIN, B.H.; COBB, J.P.; TSCHOEKE, S.K.; MILLER-GRAZIANO, C.; MOLDAWER, L.L.; MINDRINOS, M.N.; DAVIS, R.W.; TOMPKINS, R.G.; LOWRY, S.F. Inflamm and Host Response to Injury Large Scale Collab. Res. Program. "A network-based analysis of systemic inflammation in humans". Nature, 7061:1032-7, 2005.

CANCE, W.G.; GOLUBOVSKAYA, V.M. Focal adhesion kinase versus p53: apoptosis or survival? Science Signaling, 1(20): pe22. [DOI: 10.1126/stke.120pe22], 2008.

CARDOSO, A.C. FAK interage com MEF2 e ativa região intrônica regulatória do *fosfolamban* em resposta ao estímulo mecânico. Dissertação de Mestrado, Campinas-SP,UNICAMP, 2008.

CARVALHO, H.F.; RECCO-PIMENTEL, S. A célula. Editora Manole – SP, 2007.

143

CARY, L.A.; HAN, D.C.; POLTE, T.R.; HANKS, S.K.; GUAN, J.L. Identification of **p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration.** Journal of Cell Biology, 140: 211-221, 1998.

CECCARELLI, D.F.J.; SONG, H.K.; POY, F.; SCHALLER, M.D.; ECK, M.J. Crystal structure of the FERM domain of Focal Adhesion Kinase. The Journal of Biological Chemistry, 281: 252 - 259, 2006.

CHEN, H.C.; APPEDDU, P.A.; ISODA, H.; GUAN, J.L. Phosphorylation of tyrosine **397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol-3-kinase.** Journal of Biological Chemistry, 271: 26329-26334, 1996.

CHEN, H.C.; CHAN, P.C.; TANG, M.J.; CHENG, C.H.; CHANG, T.J. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase stimulated by hepatocyte growth factor leads to mitogen-activated protein kinase activation. Journal of Biological Chemistry, 273: 25777-25782, 1998.

CHEN, H.C.; GUAN, J.L. Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. PNAS, 91: 10148-10152, 1994.
CHEN, M.; MANLEY, J.L. Mechanisms of alternative *splicing* regulation: insights from molecular and genomics approaches. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 10: 741-754, 2009.

COLWILL, K.; PAWSON, T.; ANDREWS, B.; PRASAD, J.; MANLEY, J.L.; BELL, J.C.; DUNCAN, P.I. The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. The EMBO Journal, 15 (2): 265-275, 1996.

CROKE, J.M.; PIKE, L.R.G.; MACPHEE, D.J. The focal adhesion kinase protein Hic-5 is highly expressed in the rat myometrium during late pregnancy and labour and colocalizes with FAK. Reproductive Biology and Endocrinology, 5 (22): 1-12, 2007.

DAS, S.; ANCZUKÓW, O.; AKERMAN, M.; KRAINER, A.R. Oncogenic *Splicing* Factor SRSF1 is a critical transcriptional target of Myc. Cell Reports, 1: 110-117, 2012.

DAVID, C.J.; MANLEY, J.L. Alternative pre-mRNA *splicing* regulation in cancer: pathways and programs unhinged. Genes & Development, 24:2343-2364, 2010.

DEL RE, D.P.; MIYAMOTO, S.; BROWN, J.H. Focal adhesion kinase as a RhoAactivable signaling scaffold mediating AKT activation and cardiomyocyte protection. Journal of Biological Chemistry, 283: 35622-35629, 2008. DOMINGOS P.P.; FONSECA, P. M.; NADRUZ, W.; FRANCHINI, K. G. Load-induced focal adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity. AJP – Heart and Circulatory Physiology, 282: H556 – 564, 2002.

DUNTY, J.M.; GABARRA-NIECKO, V.; KING, M.L.; CECCARELLI, D.F.J.; ECK, M.J.; SCHALLER, M.D. **FERM domain interaction promotes FAK signaling.** Molecular Cell Biology, 24: 5353-5368, 2004.

EBLE, D.M.; STRAIT, J.B; GOVINDARAJAN, G.; LOU, J.; BYRON, K.L.; SAMAREL, A.M. Endothelininduced cardiac myocyte hypertrophy: role for focal adhesion kinase. American Journal of Physiology - Heart Circulation Physiology,278:H1695–707, 2000.

FONSECA P.M.; INOUE, R. Y.; KOBARG, C. B.; CROSARA-ALBERTO, D. P.; KOBARG, J.; FRANCHINI, K. G. **Targeting to C-terminal Myosin Heavy Chain may explain mechanotransduction involving focal adhesion kinase in cardiac myocites.** Circulation Research, 96:73 – 81, 2005.

FORCE, T.; MICHAEL, A.; KILTER, H.; HAQ, S. Stretch-activated pathways and left ventricular remodeling. Journal of Cardiac Failure, 8: 351 – 358, 2002.

FOX, A.H.; LAMOND, A.I. **Paraspeckles.** Cold Spring Harbor Laboratory Perspectives in Biology, 2:a000687, 2010.

FRAME, M.C.; PATEL, H.; SERRELS, B.; LIETHA, D.; ECK, M.J. **The FERM domain:** organizing the structure and function of FAK. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 11 (11): 802-814, 2010.

FRANCHINI, K.G. Focal Adhesion Kinase - the basis of local hypertrophic signaling domains. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 52:485-492, 2012.

FRANCHINI, K.G.; CLEMENTE, C.F.M.Z.; MARIN, T.M. Focal Adhesion Kinase signaling in cardiac hypertrophy and failure. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 42:44-52, 2009.

FRANCHINI, K.G.; TORSONI, A. S.; SOARES, P. H. A.; SAAD, M. J. A. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. Circulation Research. 87: 558 – 565, 2000.

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

GIRARD, C.; WILL, C.L.; PENG, J.; MAKAROV, E.M.; KASTNER, B.; LEMM, I.; URLAUB, H.; HARTMUTH, K.; LÜHRMANN, R. Post-transcriptional spliceosomes are retained in nuclear speckles until splicing completion. Nature Communications, 3 (994):1-12, 2012.

GOLUBOVSKAYA, V.M.; CANCE, W.G. **FAK and p53 protein interactions.** Anticancer Agents in Medicinal Chemistry,11(7): 617-619, 2011.

GONDRAN, P.; DAUTRY, F. Regulation of mRNA splicing and transport by the tyrosine kinase activity of src. Oncogene, 18: 2547-2555, 1999.

GUAN, J.L.; SHALLOWAY, D. Regulation of focal adhesion-associated protein tyrosine kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation. Nature, 358: 690-692, 1992.

GUI, J.F.; LANE, W.S.; FU, X.D. A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. Nature, 369: 678 - 682, 1994.

GUINEBAULT, C. PAYRASTRE, B.; RACAUD-SULTAN, C.; MAZARGUIL, H.; BRETON, M.; MAUCO, G.; PLANTAVID, M.; CHAP, H. Integrin-dependent translocation of phosphoinositide 3-kinase to the cytoskeleton of thrombin-activated platelets involves specific interactions of p85 alpha with actin filaments and focal adhesion kinase. Journal of Cell Biology, 129: 831-842, 1995.

HABELHAH, H.; SHAH, K.; HUANG, L.; OSTARECK-LEDERER, A.; BURLINGAME, A.L.; SHOKAT, K.M.; HENTZE, M.W.; RONAI, Z. **ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation.** Nature Cell Biology, 3: 325 - 330, 2001.

HAN, S.P.; TANG, Y.H.; SMITH, R. Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. Biochemical Journal, 430: 379-392, 2010.

HANKS, S.K.; CALALB, M.B.; HARPER, M.C.; PATEL, S.K. Focal adhesion proteintyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America -PNAS, 89: 8487-8491, 1992.

HEERY, D.M.; KALKHOVEN, E.; HOARE, S.; PARKER, M.G. A signature motif in transcriptional coactivators mediates binding to nuclear receptors. Nature, 387: 733–736, 1997.

HILLEN, W.; GATZ, C.; ALTSCHMIED, L.; SCHOLLMEIER, K.; MEIR, I. Control of expression of the Tn10-encoded tetracycline resistance genes. Equilibrium and kinetic investigation of the regulatory reactions. Journal of Molecular Biology, 169 (3):707-721, 1983.

HILLEN, W.; BERENS, C. Mechanisms underlying expression of TN10 encoded tetracycline resistance. Annual Review of Microbiology, 48: 345-369, 1994.

HUANG, C.J.; TANG, Z.; LIN, R.J.; TUCKER, P.W. Phosphorylation by SR kinases regulates the binding of PTB-associated splicing factor (PSF) to the pre-mRNA polypyrimidine tract. FEBS Letters, 581: 223-232, 2007.

HUANG, C.J.; YARIO, T.A.; STEITZ, J.A. A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America -PNAS, 101 (26):9666 - 9670, 2004.

HYNES, R.O. Integrins: bi-directional, allosteric, signaling machines. Cell, 110: 673-687, 2002.

IP, J.Y.; SCHMIDT, D.; PAN, Q.; RAMANI, A.K.; FRASER, A.G.; ODOM, D.T.; BLENCOWE, B.J. Global impact of RNA polymerase II elongation inhibition on alternative *splicing* regulation. Genome Research, 21:390-401, 2011.

JONES, G.; MACHADO, J.; MERLO, A. Loss of Focal Adhesion kinase (FAK) inhibits epidermal growth factor receptor-dependent migration and induces aggregation of NH2-terminal FAK in the nuclei of apoptotic glioblastoma cells. Cancer Research, 61: 4978-4981, 2001.

JONES, G.; STEWART, G. Nuclear import of N-terminal FAK by activation of the FCERI receptor in RBL-2H3 cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 314: 39-45, 2004.

KAPELLER, R.; CANTLEY, L.C. Phosphatidylinositol 3-kinase. Bioessays, 16: 565-576, 1994. KEENE, J.D. **RNA regulons: coordination of post-transcriptional events.** Nature Review Genetics, 8: 533- 543, 2007.

LADD, A.N.; TAFFET, G.; HARTLEY, C.; KEARNEY, D.L.; COOPER, T.A. Cardiac tissue-specific repression of CELF activity disrupts alternative *splicing* and causes cardiomyopathy. Molecular and Cellular Biology, 25 (14): 6267-6278, 2005.

LANGE, A.; MILLS, R.E.; LANGE, C.J.; STEWART, M.; DEVINE, S.E.; CORBETT, A.H. Classical Nuclear localization signals: definition, function and interaction with Importin a. The Journal of Biological Chemistry, 282: 5101 - 5105, 2007.

LI, X.; WANG, J.; MANLEY, J.L. Loss of splicing factor ASF/SF2 induces G2 cell cycle arrest and apoptosis, but inhibits internucleosomal DNA fragmentation. Genes Development, 19: 2705–2714, 2005.

LIETHA, D.; CAI, X.; CECCARELLI, D.F.L.; LI, Y.; SCHALLER, M.D.; ECK, M.J. Structural Basis for the Autoinhibition of Focal Adhesion Kinase. Cell, 129: 1177-1187, 2007.

LIM, S.S. Nuclear FAK: a new mode of gene regulation from cellular adhesions. Molecules and Cells, 36: 1-6, 2013.

LIM, S.; CHEN, X.L.; LIM, Y.; HANSON, D.A.; VO, T.; HOWERTON, K.; LAROCQUE, N.; FISHER, S.J.; SCHLAEPFER, D.D.; ILIC, D. Nuclear FAK promotes **cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation.** Molecular Cell, 29: 9-22, 2008.

LIM, S.T.; MILLER, N.L.G.; CHEN, X.L.; TANCIONI, I.; WALSH, C.T.; LAWSON, C.; URYU, S.; WEIS, S.M.; CHERESH, D.A.; SCHLAEPFER, D.D. Nuclear-localized focal adhesion kinase regulates inflammatory VCAM-1 expression. The Journal of Cell Biology, 197 (7): 907-919, 2012.

LIN, S.; FU, X.D. **SR proteins and related factors in alternative** *splicing*. Advanced Expert Medical Biology, 623: 107-122, 2007.

LOBO, M.; ZACHARY, I. Nuclear localization and apoptotic regulation of an aminoterminal domain focal adhesion kinase fragment in endothelial cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 276:1068-1074, 2000.

LODISH, BERK, ZIPURSKY, MATSUDAIRA, BALTIMORE, DARNELL. **Biologia Celular e Molecular**, 5ª Edição, Editora Revinter.

LUCO, R.F.; ALLO, M.; SCHOR, I.E.; KORNBLIHTT, A.R.; MISTELI, T. Epigenetics in Alternative Pre-mRNA Splicing. Cell, 144: 16-26, 2011.

LUO, M.; GUAN, J.L. L. Focal adhesion kinase: a prominent determinant in breast cancer initiation, progression and metastasis. Cancer Letters, 289:127–139, 2010.

LUO, S.W.; ZHANG, C.; ZHANG, B.; KIM, C.H.; QIU, Y.Z.; DU, Q.S.; MEI, L.; XIONG, W.C. Regulation of heterochromatin remodelling and myogenin expression during muscle differentiation by FAK interaction with MBD2. The EMBO Journal, 28: 2568-2582, 2009.

MCLNERNEY, E.M.; ROSE, D.W.; FLYNN, S.E.; WESTIN, S.; MULLEN, T.M.; KRONES, A.; INOSTROZA, J.; TORCHIA, J.; NOLTE, R.T.; ASSA-MUNT, N.; MILBURN, M.V.; GLASS, C.K.; ROSENFELD, M.G. Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. Genes Development, 12: 3357–3368, 1998.

MITRA, S.K.; HANSON, D.A.; SCHLAEPFER, D.D. Focal Adhesion Kinase: in command and control of cell motility. Nature Reviews, 6: 56 – 68, 2005.

MUELLER, W.F.; HERTEL, K.J. The role of SR and SR-related proteins in pre-mRNA splicing. RNA binding proteins chapter, Landes Bioscience and Springer Science, 2011.

NÄÄR, A.M.; LEMON, B.D.; TJIAN, R. **Transcriptional Coactivator Complexes.** Annual Reviews of Biochemistry, 70:475-501, 2001.

NADRUZ, W.; CORAT, M. A.F.; MARIN, T. M.; PEREIRA, G. A. G.; FRANCHINI, K. G. Focal adhesion kinase mediates MEF2 and c-Jun activation by stretch: role in activation of the cardiac hypertrophic genetic program. Cardiovascular Research, 68:87 – 97, 2005.

NEEL, H.N.; GONDRAN, P.; WEIL, D.; DAUTRY, F. Regulation of pre-mRNA processing by src. Current Biology, 5(4): 413- 422, 1995.

NILSEN, T.W.; GRAVELEY, B.R. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative *splicing*. Nature, 463:457-463, 2010.

OSSOVSKAYA, V.; LIM, S.T.; OTA, N.; SCHLAEPFER, D.D.; ILIC, D. FAK nuclear export signal sequences. FEBS Letters, 582: 2402-2406, 2008.

PADGETT, R.A.; GRABOWSKI, P.J.; KORNARSKA, M.M.; SEILER, S.; SHARP, P.A. *Splicing* of messenger RNA precursors. Annual Reviews of Biochemistry, 55:1119-1150, 1986.

PARK, E.; HAN, J.; SON, G.H.; LEE, M.S.; CHUNG, S.; PARK, S.H.; PARK, K.; LEE, K.H.; CHOI, S.; SEONG, J.Y.; KIM, K. Cooperative actions of Tra2α with 9G8 and SRp30c in the RNA splicing of the Gonadotropin-releasing hormone gene transcript. The Journal of Biological Chemistry, 281: 401 - 409, 2006.

PATEL, N.A.; KANEKO, S.; APOSTOLATOS, H.S.; BAE, S.S.; WATSON, J.E.; DADIVOWITZ, K.; CHAPPELL, D.S.; BIRNBAUM, M.J.; CHENG, J.Q.; COOPER, D.R. Molecular and genetic studies imply AKT-mediated signaling promotes PKCβII alternative splicing via phosphorylation of Srp40. The Journal of Biological Chemistry, 280: 14302 - 14309, 2005. PENG, X.; KRAUS, M. S.; WEI, H.; SHEN. T. L.; PARIAUT, R.; ALCARAZ, A.; JI, G.; CHENG, L.; YANG, Q.; KOTLIKOFF, M. I.; CHEN, J.; CHIEN, K.; GU, H.; GUAN, J.L. **Inactivation of focal adhesion kinase in cardiomyocytes promotes eccentric cardiac hypertrophy and fibrosis in mice**. Journal of Clinical Investigation, 116:217 – 227, 2006.

PETERSEN-MAHRT, S.K.; ESTMER, C.; ÖHRMALM, C.; MATTHEWS, D.A.; RUSSELL, W.C.; AKUSJÄRVI, G. The *splicing* factor-associated protein, p32, regulates RNA *splicing* by inhibiting ASF/SF2 RNA binding and phosphorylation. The EMBO Journal, 18(4): 1014-1024, 1999.

PFEFFER, M.A.; BRAUNWALD, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. Circulation, 81: 1161 – 1172, 1990.

PRASAD, J.; COLWILL, K.; PAWSON, T.; MANLEY, J.L. The Protein Kinase Clk/Sty Directly Modulates SR Protein Activity: Both Hyper- and Hypophosphorylation Inhibit Splicing. Molecular and Celular Biology, 19: 6991-7000, 1999.

PYPE, S.; SLEGERS, H.; MOENS, L.; MERLEVEDE, W.; GORIS, J. Tyrosine Phosphorylation of a Mr 38,000 A/B type hnRNP Protein Selectively Modulates Its RNA Binding*. The Journal of Biological Chemistry, 269 (50): 31457-31465, 1994. RADU, A.; BLOBEL, G.; MOORE, M.S. Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92: 1769-1773, 1995.

RICHARD, M.N.; DENISET, J.F.; KNEESH, A.L.; BLACKWOOD, D.; PIERCE, G.N. **Mechanical Stretching stimulates smooth muscle cell growth, nuclear protein import and nuclear pore expression through Mitogen-activated protein kinase activation**. The Journal of Biological Chemistry, 282:23081 – 23088, 2007.

SAHLAS, D.J.; MILANKOV, K.; PARK, P.C.; BONI, U. Distribution of snRNPs, splicing factor SC-35 and actin in interphase nuclei: immunocytochemical evidence for differential distribution during changes in functional states. Journal of Cell Science, 105: 347-357, 1993.

SAITOH, N.; SAKAMOTO, C.; HAGIWARA, M.; AGREDANO-MORENO, L.T.; JIMÉNEZ-GÁRCIA, L.F.; NAKAO, M. The distribution of phosphorylated SR proteins and alternative splicing are regulated by RANBP2. Molecular Biology of the Cell, 23: 115-1128, 2012.

SANTOS, A. M.; SCHETCHTMAN, D.; CARDOSO, A. C.; CLEMENTE, C.F.M.Z.; SILVA, J.C.; FIORAMONTE, M.; PEREIRA, M.B.M.; MARIN, T.M.; OLIVEIRA, P.S.L.; FIGUEIRA, A.C.M.; OLIVEIRA, S. H.P.; TORRIANI, I.L.; GOZZO, F.C.; NETO,

J.X.; FRANCHINI, K.G. **FERM domain interaction with miosin negatively regulates FAK in cardiomyocyte hypertrophy.** Nature Chemical Biology, 8(1): 102-110, 2011.

SAVKUR, R.S.; BURRIS, T.P. The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. Journal of Peptide Research, 63: 207-212, 2004.

SCHALLER, M.D. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. Journal of Cell Science, 123 (7): 1007 - 1013, 2010.
SCHALLER, M.D. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. Oncogene, 20:6459-6472, 2001.

SCHALLER, M. D.; BORGMAN, C. A.; COBB, B. C.; REYNOLDS, A. B.; PARSONS, J. T. **pp125^{FAK}, a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - PNAS, 89:5192-5196, 1992.

SCHALLER, M.D.; HILDEBRAND, J.D.; SHANNON, J.D.; FOX, J.W.; VINES, R.R.; PARSONS, T. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125^{FAK}, directs SH2-dependent binding of pp60^{src}. Molecular and Cellular Biology, 14(3): 1680-1688, 1994.

SCHALLER, M. D.; OTEY, C.A.; HILDEBRAND, J.D.; PARSONS, J.T. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cyto-plasmic domains. Journal of Cell Biology, 130:1181–1187, 1995.

SCHLAEPFER, D.D.; HANKS, S.K.; HUNTER, T.; and van der GEER, P. Integrinmediated signal transduction linked to RAS pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. Nature, 372:786-791, 1994.

SCHLAEPFER, D.D.; JONES, K.C.; HUNTER, T. Multiple Grb2-mediated integrinstimulated signaling pathways to ERK2/Mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and Focal Adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. Molecular and Cellular Biology, 18(5): 2571-2585, 1998.

SCHESWOHL, D.M.; HARREL, J.R.; RAJFUR, Z.; GAO, G.; CAMPBELL, S.L.; SCHALLER, M.D. Multiple paxillin binding sites regulate FAK function. Journal of Molecular Signaling, 3(1): 1-11, 2008.

SCHWARTZ, M.A. Integrins and Extracellular matrix in mechanotransduction. Cold Spring Harbor Laboratory Perspectives Biology, 2:a005066, 2010.

SENYO, S.E.; KOSHMAN, Y.E.; RUSSEL, B. Stimulus interval, rate and direction differentially regulate phosphorylation for mechanotransduction in neonatal cardiac myocytes. FEBS Letters, 581: 4241-4247, 2007.

SHAH, A.M.; SOLOMON, S.D. A unified view of ventricular remodelling. European Journal of Heart Failure, 12, 779-781, 2010.

SHI, Y.; REDDY, B.; MANLEY, J.L. **PP1/PP2A** phosphatases are required for the second step of pre-mRNA splicing and target specific snRNP proteins. Molecular Cell, 23:819-829, 2006.

SIEG, D. J.; HAUCK, C.R.; ILIC, D.; KLINGBEIL, C.K.; SCHAEFER, E.; DAMSKY, C.H.; SCHLAEPFER, D.D. **FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration**. Nature Cell Biology, 2: 249–256, 2000.

STOJDL, D.F.; BELL, J.C. **SR Protein Kinases: the splice of life.** Biochemistry and Cell Biology, 77: 293 - 298, 1999.

TACHIBANA, K.; URANO, T.; FUJITA, H.; OHASHI, Y.; KAMIGUCHI, K.; IWATA, S.; HIRAI, H.; MORIMOTO, C. Tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates by focal adhesion kinase. A putative mechanism for the integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Crkassociated substrates. Journal of Biological Chemistry, 272: 29083-29090, 1997.

TAIPALE, M.; KRYKBAEVA, I.; KOEVA, M.; KAYATEKIN, C.; WESTOVER, K.D.; KARRAS, G.I.; LINDQUIST, S. Quantitative analysis of Hsp90-client interactions reveals principles of substrate recognition. Cell, 150:987-1001, 2012.

THORSEN, K.; MANSILLA, F.; SCHEPELER, T.; ØSTER, B.; RASMUSSEN, M.H.; DYRSKJØT, L.; KARNI, R.; AKERMAN, M.; KRAINER, A.R.; LAURBERG, S.; *et al.*

Alternative *splicing* of SLC39A14 in colorectal cancer is regulated by the Wnt pathway. Molecular Cell Proteomics, 10, M110.002998, 2011.

TORSONI, A.S.; CONSTANCIO, S.S.; NADRUZ JR, W.; HANKS, S.K.; FRANCHINI, K.G. Focal Adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. Circulation Research, 93:140-147, 2003.

TORSONI, A .S.; MARIN, T. M.; VELLOSO, L.A.; FRANCHINI, K.G. **RhoA/ROCK** signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocites. AJP – Heart and Circulatory Physiology, 289: H1488 – H1496, 2005.

TURNER, C.E. **Paxillin and focal adhesion signalling.** Nature Cell Biology, 2: E231-E236, 2000.

VILLA, T.; PLEISS, J.A.; GUTHRIE, C. Spliceosomal sRNAs: Mg2+ dependent chemistry at the catalytic core? Cell, 109: 149-152, 2002.

WAHL, M.C.; WILL, C.L.; LÜHRMANN, R. The Spliceossome: design principles of a dynamic RNP machine. Cell, 136: 701-718, 2009.

WANG, N.; TYTELL, J.D.; INGBER, D.E. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 10: 75-82, 2009. WANG, W.; LIU, Y.; LIAO, K. Tyrosine phosphorylation of coarctin by the FAK-Src complex at focal adhesions regulates cell motility. BMC Cell Biology, 12(49): 1-15, 2011.

WILL, C.L.; LÜHRMANN, R. **Spliceosome structure and function.** Cold Spring Harbor Perspective Laboratory, 3:a003707, 2011.

WU, J.Y; MANIATIS, T. Specific interactions between proteins implicated in *splicing* site selection and regulated alternative *splicing*. Cell, 75: 1061-1070, 1993.

WU, X.; SUETSUGU, S.; COOPER, L.A.; TAKENAWA, T.; GUAN, J.L. Focal adhesion kinase regulation of N-WASP subcellular localization and function. Journal of Biological Chemistry, 279: 9565-9576, 2004.

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

XU, X.; YAN G, D.; DING, J.H.; WANG, W.; CHU, P.H.; DALTON, N.D.; WANG, H.Y.; BER-MINGHA M. J.R.; YE, Z.; LIU, F., *et al.* **ASF/SF2-regulated CaMKII delta** alternative *splicing* temporally reprograms excitation-contraction coupling in cardiac muscle. Cell 120: 59–72, 2005.

XU, Y.; YU, W.; XIONG, Y.; XIE, H.; REN, Z.; XU, D.; LEI, M.; ZUO, B.; FENG, X. Molecular characterization and expression patterns of serine/arginine -rich specific kinase 3 (SRPK3) in porcine skeletal muscle. Molecular Biology Reports, 38: 2903 - 2909, 2011.

YAO, T.P.; OH, S.P.; FUCHS, M.; ZHOU, N.D.; CH'NG, L.E.; NEWSOME, D.; BRONSON, R.T.; LI, E.; LIVINGSTON, D.M.; ECKNER, R.Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator. Cell, **93**:361–372, 1998

YI, X.P.; WANG, X.; GERDES, A.M.; LI, F. Subcellular redistribution of Focal Adhesion Kinase and its related nonkinase in hypertrophic myocardium. Hypertension, 41:1317 – 1323, 2003.

YI, X.P.; ZHOU, J.;HUBER, L.; QU, J.; WANG, X.; GERDES, A.M.; LI, F. Nuclear compartimentalization of FAK and FRNK in cardiac myocytes. American Journal of Physiology - Heart Circulation Physiology, 290:H2509-2515, 2006.

YUN, C.Y.; FU, X.D. Conserved Sr Protein Kinase Functions in Nuclear Import and Its Action Is Counteracted by Arginine Methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Cell Biology, 150:707-718, 2000.

ZHOU, H.L.; LOU, G.; WISE, J.A.; LOU, H. Regulation of alternative splicing by local histone modifications: potential roles for RNA-guided mechanisms. Nucleic Acids Research, 1-13, 2013.

8.APÊNDICES

APÊNDICE 1. Proteínas identificadas (por espectrometria de massa) dos extratos imunoprecipitados com anticorpo anti-FLAG. Abaixo estão listadas as proteínas dos extratos citosólico. #PSM (Peptide Spectrum Matches) em cada experimento (não induzido e induzido). Nesta tabela, consideramos proteínas válidas as que apareceram em pelo menos 2 experimentos induzidos e até em 1 experimento não induzido, com exceção da proteína FAK, que teve contagem de espectros em todos os 3 experimentos não induzidos. Entretanto, a contagem nos experimentos induzidos é maior cerca de 10 vezes.

				Não induzido]	nduzido	
IPI	Nome da proteína	Sigla	Localização	#	#	#	# PSM 1	#	# PSM 3
			Subcelular	PSM	PSM	PSM		PSM	
				1	2	3		2	
FRAÇÃO CITO	SÓLICA								
IPI00793270.1	Focal Adhesion Kinase	PTK2	Citoplasma	6	3	7	63	59	86
IPI00465361.4	60S ribosomal protein L13	RPL13	Citoplasma	0	0	1	7	9	16
IPI01015055.1	Paxillin	PXN	Citoplasma	0	0	0	6	14	9
IPI00008557.6	Insulin-like growth factor 2 mRNA-	IGF2BP1	Citoplasma	1	0	0	4	6	9
	binding protein 1								
IPI00221093.7	40S ribosomal protein S17		-	0	0	2	2	4	9

IPI00396321.1	Leucine-rich repeat-containing protein 59	LRRC59	Citoplasma	0	0	0	3	6	8
IPI00977844.1	17 kDa protein	RPS13	Núcleo	0	3	0	3	2	7
IPI00550689.3	tRNA-splicing ligase RtcB homolog	C22orf28	Citoplasma	0	0	0	5	5	6
IP100396399.5	Isoform 2 of Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein	TGFB1I1	Núcleo	0	0	0	6	4	6
IPI00185919.3	Isoform 1 of La-related protein 1	LARP1	Citoplasma	0	0	1	1	4	6
IPI00012442.1	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	G3BP1	Núcleo	2	0	0	1	4	6
IPI00221092.8	40S ribosomal protein S16	RPS16	Citoplasma	0	0	0	0	4	6
IPI00554723.5	60S ribosomal protein L10		Citoplasma	0	1	0	6	3	6
IPI00414676.6	Heat shock protein HSP 90-beta		Citoplasma	0	0	0	2	3	5
IPI00219155.5	60S ribosomal protein L27		Citoplasma	0	2	0	3	2	5
IPI00449049.5	Poly [ADP-ribose] polymerase 1		Núcleo	0	1	0	3	6	4
IPI00017617.1	Probable ATP-dependent RNA helicase		Núcleo	0	1	0	6	5	4
IPI00021840.1	40S ribosomal protein S6		Citoplasma	0	2	0	2	5	4
IPI00889541.2	Isoform 4 of Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17		Núcleo	0	0	0	3	3	4

IPI01009249.1	Phenylalanine-tRNA ligase beta subunit	Citoplasma	0	0	0	1	3	4
IPI00903155.2	cDNA FLJ39540 fis, clone PUAEN2008314, highly similar to Switch- associated protein 70	Citoplasma	0	0	0	4	2	4
IPI00465044.2	Protein RCC2	Núcleo	0	0	0	1	2	4
IPI00719622.1	40S ribosomal protein S28	Citoplasma	0	0	0	2	1	4
IPI00790634.2	Isoform 2 of Partner of Y14 and mago	 Núcleo	0	0	0	1	1	4
IPI01010638.1	3-phosphoglycerate dehydrogenase	Citoplasma	0	0	0	0	1	4
IPI00293655.3	ATP-dependent RNA helicase DDX1	Núcleo	2	0	0	3	5	3
IPI00220834.8	X-ray repair cross-complementing protein 5	Núcleo	0	0	0	4	4	3
IPI00456969.1	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	Citoplasma	0	0	0	0	3	3
IPI00985384.1	ATP-dependent RNA helicase DDX3X isoform 3	Núcleo	0	0	0	5	2	3
IPI00657721.1	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp31	Núcleo	0	0	1	2	2	3
IPI01010979.1	Zinc-Finger CCCH-type containing 15	Núcleo	0	0	0	2	2	3
IP100056494.5	60S ribosomal protein L36a-like	Citoplasma	0	0	0	0	2	3
IPI00022373.2	RNA-binding protein NOB1		0	0	0	0	2	3

IPI00026271.5	40S ribosomal protein S14	Citoplasma	0	1	0	3	1	3
IPI00299254.4	Eukaryotic translation initiation factor 5B	Citoplasma	1	0	0	2	1	3
IPI00795751.1	60S ribosomal protein L23	Citoplasma	0	0	0	2	1	3
IPI00021728.3	Eukaryotic translation initiation factor 2		2	0	0	0	1	3
	subunit 2							
IPI00216237.5	60S ribosomal protein L36	Citoplasma	1	0	0	1	4	2
IPI00006980.1	UPF0568 protein C14orf166	Núcleo	0	0	0	3	3	2
IPI00909657.1	cDNA FLJ50378, highly similar to		0	0	0	2	3	2
	Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain							
IPI00917181.1	Ribosomal protein L36a	Citoplasma	0	0	0	0	3	2
IPI00219678.3	Eukaryotic translation initiation factor 2	Citoplasma	0	0	0	2	2	2
	subunit 1							
IPI00186290.6	Elongation factor 2	Citoplasma	0	0	1	1	2	2
IPI00968128.1	Ribosomal protein L9	Citoplasma	0	0	0	1	2	2
IPI00013296.3	40S ribosomal protein S18		0	0	1	0	2	2
IPI00182289.6	40S ribosomal protein S29	Citoplasma	0	0	0	0	2	2
IPI00966190.2	SRSF protein kinase 1	Núcleo	0	0	0	0	2	2
IPI00642944.1	Poly(A) binding protein, cytoplasmic 4	Citoplasma	0	0	0	3	1	2
IPI00413686.2	Isoform 3 of AP-3 complex subunit delta-1	Citoplasma	0	0	0	2	1	2

IDI00215700.6	60S ribosomal protein L 38	Citoplasma	0	0	0	0	1	2
11 100213790.0	oos noosoniai protein Eso	Chopiasina	0	0	0	0	1	2
IPI01021465.1	17 kDa protein		0	0	0	0	1	2
IPI00153032.1	Protein LTV1 homolog		0	0	0	0	1	2
IPI00219793.1	Isoform 2 of Suppressor of SWI4 1 homolog		0	0	0	2	0	2
IPI00925260.1	11 kDa protein		0	0	0	1	0	2
IPI00402391.3	Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1		0	0	0	1	0	2
IPI01018333.1	Isoform 1 of Hepatoma-derived growth factor-related protein 2		0	0	0	1	0	2
IPI00218609.2	Isoform Short of Double-stranded RNA- binding protein Staufen homolog 1	Citoplasma	0	0	1	4	4	1
IPI00170935.1	Leucine-rich repeat-containing protein 47	-	0	0	0	2	4	1
IPI00216613.1	Isoform Short of <i>Splicing</i> factor, proline- and glutamine-rich	Núcleo	0	0	0	4	3	1
IPI01009513.2	cDNA, FLJ92620, highly similar to Homo sapiens staphylococcal nuclease domain containing 1 (SND1), mRNA	Núcleo	0	0	0	3	3	1
IPI01010794.1	THO complex subunit 4	Núcleo	0	1	0	2	2	1

IPI00219160.3	60S ribosomal protein L34	Citoplasma	0	0	0	2	2	1
IPI00646886.1	Mov10, Moloney leukemia virus 10,	Núcleo	0	0	0	2	2	1
	homolog							
IPI01021585.1	15 kDa protein	Citoplasma	0	1	0	1	2	1
IPI00827687.1	MAP7D1 protein (Fragment)	-	0	0	0	1	2	1
IPI00179964.5	Isoform 1 of Polypyrimidine tract-binding		0	0	0		2	1
	protein 1							
IPI00011913.1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	Núcleo	0	0	0	3	1	1
	A0							
IPI00921584.1	FAM98A	-	0	0	0	3	1	1
IPI00793102.1	60S ribosomal protein L35a	-	0	1	0	2	1	1
IPI00980952.2	37 kDa protein	 Núcleo	1	0	0	2	1	1
IPI00645816.1	Isoform 1 of DNA-directed RNA		0	0	0	2	1	1
	polymerase I subunit RPA34							
IPI00465294.2	Cell division cycle 5-like protein	Núcleo	0	0	0	2	1	1
IPI00847986.1	Isoform 2 of 40S ribosomal protein S24	Citoplasma	0	0	1	1	1	1
IPI00081836.3	Histone H2A type 1-H	Núcleo	0	0	1	1	1	1
IPI00181728.1	Ribosome biogenesis protein BRX1	Núcleo	0	0	0	1	1	1
	homolog							

IPI00333420.6	Isoform 1 of Serine/threonine-protein	Núcleo	0	0	0	1	1	1
11 100555420.0	Isololini i ol Serine/unconine protein	Nucleo	0	0	0	1	1	1
	kinase SRPK2							
IPI00217686.4	Putative rRNA methyltransferase 3	Núcleo	0	0	0	1	1	1
IPI00658205.1	DNA repair protein RAD50	Núcleo	0	0	0	1	1	1
IPI00981976.2	ZC3HAV1 protein		0	0	1	0	1	1
IPI00973736.2	40S ribosomal protein S30	Citoplasma	0	1	0	0	1	1
IPI00420014.2	Isoform 1 of U5 small nuclear		1	0	0	0	1	1
	ribonucleoprotein 200 kDa helicase							
IPI00619942.1	splicing factor U2AF 35 kDa subunit		0	0	0	0	1	1
	isoform c							
IPI01015342.1	cDNA, FLJ79540, highly similar to Serine-		0	0	0	0	1	1
	threonine kinase receptor-associatedprotein							
IPI00178188.5	Dynein light chain roadblock-type 2		0	0	0	0	1	1
IPI00016610.2	Poly(rC)-binding protein 1	Núcleo	0	0	0	0	1	1
IPI01012991.1	Isoform 1 of Putative RNA-binding protein		0	0	0	0	1	1
	Luc7-like 2							
IPI00166873.3	Alba-like protein C9orf23	-	0	0	0	0	1	1
IPI00924630.1	Condensin complex subunit 2	-	0	0	0	0	1	1
IPI00018009.2	Enhancer of mRNA-decapping protein 3		0	0	0	0	1	1

IPI00719549.2	RBM14-RBM4 protein isoform 1		0	0	0	0	1	1
IPI00973259.1	Asparagine-linked glycosylation 11		0	0	0	0	1	1
	homolog							
IPI00647720.1	Isoform 1 of Serine/arginine repetitive		0	0	0	0	1	1
	matrix protein 1							
IPI00478734.3	Tetratricopeptide repeat protein 30A		0	0	0	0	1	1
IPI00216989.6	G protein-regulated inducer of neurite		0	0	0	0	1	1
	outgrowth 3							
IPI00021924.1	Histone H1x		0	0	0	4	0	1
IPI00029629.4	E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25	 _	0	0	0	2	0	1
IPI00642816.2	Isoform 1 of Signal recognition particle 9	Citoplasma	0	0	0	1	0	1
	kDa protein							
IPI00924813.1	Similar to Ribosomal protein L37a		0	0	0	1	0	1
IPI00963998.1	Protein		0	0	0	1	0	1
IPI00479058.2	40S ribosomal protein S15		0	0	0	1	0	1
IPI00982721.1	Transcription elongation factor B		0	0	0	1	0	1
	polypeptide 1							
IPI00011997.4	Isoform 1 of UPF0488 protein C8orf33		0	0	0	1	0	1
IPI00792186.4	ATP-binding cassette sub-family F		0	0	0	1	0	1

	(GCN20) member 1							
IPI00397024.1	Isoform 2 of YTH domain family protein 2		0	0	0	1	0	1
IPI01014211.1	T-complex protein 1 subunit alpha		0	0	0	1	0	1
IPI01015006.1	Signal recognition particle 68 kDa protein		0	0	0	1	0	1
IPI00947372.2	Structural maintenance of chromosomes protein 4		0	0	0	1	0	1
IPI01019083.1	cDNA FLJ52352, highly similar to DnaJ homolog subfamily A member 1		0	0	0	1	0	1
IP100867688.2	Similar to DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 40	-	0	0	0	1	0	1
IPI00015808.3	Nucleolar GTP-binding protein 2	Núcleo	0	0	0	1	0	1
IP100472887.3	Isoform 2 of Cytoskeleton-associated protein 5		0	0	0	1	0	1
IP100031836.3	Developmentally-regulated GTP-binding protein 1	Citoplasma	0	0	0	1	4	0
IP100297982.7	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3	Citoplasma	0	1	0	3	3	0
IPI00916802.1	SS-B/La protein	Núcleo	0	1	0	1	2	0
IPI00003886.3	Isoform 2 of Guanine nucleotide-binding	Núcleo	0	0	0	1	2	0

	protein-like 3							
IPI00001639.2	Importin subunit beta-1	Núcleo	0	0	0	1	2	0
IPI00375359.2	Isoform 2 of Replication factor C subunit 1	Núcleo	0	0	0	1	2	0
IPI00910614.1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	Núcleo	0	0	1	2	1	0
	isoform 4							
IPI00187140.1	Putative 40S ribosomal protein S26-like 1	-	0	1	0	2	1	0
IPI00003935.6	Histone H2B type 2-E	Núcleo	0	0	0	2	1	0
IPI00007928.4	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	Núcleo	0	0	0	2	1	0
IPI00924603.3	Microtubule-associated protein	Citoplasma	0	1	0	1	1	0
IPI00009922.3	SRA stem-loop-interacting RNA-binding	Citoplasma	0	0	0	1	1	0
	protein, mitochondrial							
IPI00335589.5	RNA methyltransferase-like protein 1	Citoplasma	0	0	0	1	1	0
IPI00909733.1	cDNA FLJ52137, moderately similar to	Citoplasma	0	0	0	1	1	0
	Glioma tumor suppressor candidate region							
	gene 2 protein							
IPI00106491.3	mRNA turnover protein 4 homolog		0	0	0	1	1	0
IPI00030320.4	Probable ATP-dependent RNA helicase	Núcleo	0	0	0	1	1	0
	DDX6							
IPI00927809.1	Isoform 3 of Putative ATP-dependent RNA	Núcleo	0	0	0	1	1	0

	helicase DHX30							
IPI00940816.2	Isoform 3 of Rho guanine nucleotide exchange factor 2	Citoplasma	0	0	0	1	1	0
IPI00187011.4	Zinc finger CCCH domain-containing protein 4	-	0	0	0	1	1	0

APÈNDICE 2. Proteínas identificadas (por espectrometria de massa) dos extratos imunoprecipitados com anticorpo anti-FLAG. Abaixo estão listadas as proteínas dos extratos nuclear. #PSM (Peptide Spectrum Matches) em cada experimento (não induzido e induzido).

		Localização		Não induzido	0	Ι	nduzido	
		subcelular						
IPI	Nome da proteína		# PSM 1	# PSM 2	# PSM 3	# PSM 1	# PSM 2	# PSM 3
FRAÇÃO NUC	LEAR							
IPI00793270.1	Focal adhesion kinase 1	Citoplasma	1			15	25	22
IPI00438229.2	Isoform 1 of Transcription intermediary factor 1-beta	Núcleo				1	4	6
IPI0000874.1	Peroxiredoxin-1	Citoplasma		3			2	6
IPI00795303.2	cDNA FLJ50996, highly similar to 60S ribosomal protein L4	Citoplasma				1	2	5
IPI00412579.6	60S ribosomal protein L10a	Núcleo		1			2	4
IPI00019359.4	Keratin, type I cytoskeletal 9	Citoplasma				1		4
IPI00940393.3	cDNA FLJ52573, highly similar to	Citoplasma			1	1	3	3

	Elongation factor 1-alpha 1						
IPI00220327.4	Keratin, type II cytoskeletal 1	Citoplasma		1	2	1	3
IPI00217465.5	Histone H1.2	Núcleo		1		1	3
IPI00104050.3	Thyroid hormone receptor- associated protein 3	Núcleo		2		4	2
IPI00221325.3	E3 SUMO-protein ligase RanBP2	Núcleo				2	2
IPI00977964.1	Ribosomal protein L27a	Núcleo		1		1	2
IPI00844578.1	ATP-dependent RNA helicase A	Núcleo		2		1	2
IP100045498.4	Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	Núcleo	1			1	2
IPI00025329.1	60S ribosomal protein L19	Citoplasma				1	2
IPI00657721.1	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp31	Núcleo				1	2
IP100966238.2	cDNA FLJ51907, highly similar to Stress-70 protein, mitochondrial	Citoplasma	1			4	1
IPI00980443.1	Bcl-2-associated transcription factor 1	Núcleo				2	1
IPI00797738.1	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	Citoplasma	1		1	1	1
IPI00219483.1	Isoform 2 of U1 small nuclear	Núcleo	1		1	1	1

	ribonucleoprotein 70 kDa						
IPI00552186.3	Putative Uncharacterized protein DKFZp313O211	Núcleo			1	1	1
IPI00946776.1	Ras-related protein Rab-7a	Citoplasma			1	1	1
IPI00002521.1	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	Citoplasma		1		1	1
IPI00004273.6	Isoform 1 of RNA-binding protein 25	Núcleo		1		1	1
IP100218592.5	Isoform ASF-3 of Serine/arginine- rich <i>splicing</i> factor 1	Núcleo		2		1	1
IPI01021673.1	15 kDa protein	Citoplasma				1	1
IPI00026302.3	60S ribosomal protein L31	Núcleo				1	1
IPI00877999.1	35 kDa protein	Citoplasma				1	1
IPI00414676.6	Heat shock protein HSP 90-beta	Citoplasma				1	1
IPI00786995.1	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit-like	-				1	1
IPI00978302.1	Cofilin-1	Núcleo	1		1		1
IPI00220739.3	Membrane-associated	Membrana			1		1
	progesterone receptor component	plasmática					

	1					
IPI00396321.1	Leucine-rich repeat-containing protein 59	Citoplasma		1		1
IPI01013489.1	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50	Citoplasma		1		1
IPI00888126.2	pyruvate kinase isozymes M1/M2- like isoform 1	-		1		1
IPI00658151.5	Isoform 1 of Striated muscle preferentially expressed protein kinase	Núcleo	1	1	1	

APÊNDICE 3. Proteínas identificadas nas imunoprecipitações com anticorpo anti-*Flag* nos extratos citosólicos e nucleares. Essa tabela apresenta as siglas apresentadas nos resultados da página 73. As proteínas com identificações de ID e sem nome da proteína não estão anotadas no banco de dados do Ingenuity® ou ainda não são conhecidas.

				Classificação	
IPI Number	Sigla	Nome da proteína	Localização	segundo o	
			subcelular	Ingenuity®	
		ATP-binding cassette, sub-family F			
IPI00792186.4	ABCF1	(GCN20), member 1	Cytoplasm	transporter	
		asparagine-linked glycosylation 11, alpha-			
IPI00973259.1	ALG11	1,2-mannosyltransferase homolog (yeast)	unknown	other	
				transcription	
IPI01010794.1	ALYREF	Aly/REF export factor	Nucleus	regulator	
		adaptor-related protein complex 3, delta 1			
IPI00413686.2	AP3D1	subunit	Cytoplasm	transporter	
		Rho/Rac guanine nucleotide exchange			
IPI00940816.2	ARHGEF2	factor (GEF) 2	Cytoplasm	other	
		ATP synthase, H+ transporting,			
IPI00002521.1	ATP5J	mitochondrial Fo complex, subunit F6	Cytoplasm	transporter	
				transcription	
IPI00980443.1	BCLAF1	BCL2-associated transcription factor 1	Nucleus	regulator	
BRX1, biogenesis of ribosomes, homolog					
--					
--					

IPI00181728.1	BRIX1	(S. cerevisiae)	Nucleus	other
IPI00006980.1	C14orf166	chromosome 14 open reading frame 166	Nucleus	other
IPI00550689.3	C22orf28	chromosome 22 open reading frame 28	Cytoplasm	enzyme
IPI00011997.4	C8orf33	chromosome 8 open reading frame 33	unknown	other
IPI00645816.1	CD3EAP	CD3e molecule, epsilon associated protein	Nucleus	other
IPI00465294.2	CDC5L	CDC5 cell division cycle 5-like (S. pombe)	Nucleus	other
IPI00978302.1	CFL1	cofilin 1 (non-muscle)	Nucleus	other
				transcription
IPI00472887.3	CKAP5	cytoskeleton associated protein 5	Nucleus	regulator
		cytochrome c oxidase subunit VIb		
IPI00797738.1	COX6B1	polypeptide 1 (ubiquitous)	Cytoplasm	enzyme
IPI00293655.3	DDX1	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 1	Nucleus	enzyme
IPI00889541.2	DDX17	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 17	Nucleus	enzyme
		DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide		
IPI00985384.1	DDX3X	3, X-linked	Nucleus	enzyme
IPI00017617.1	DDX5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 5	Nucleus	enzyme
IPI00925260.1	DDX56	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 56	Nucleus	enzyme
IPI00030320.4	DDX6	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 6	Nucleus	enzyme
		DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide		
IPI00927809.1	DHX30	30	Nucleus	enzyme
		DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide		
IPI00844578.1	DHX9	9	Nucleus	enzyme

		DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A,		
IPI01019083.1	DNAJA1	member 1	Nucleus	other
		developmentally regulated GTP binding		
IPI00031836.3	DRG1	protein 1	Cytoplasm	other
IPI00456969.1	DYNC1H1	dynein, cytoplasmic 1, heavy chain 1	Cytoplasm	peptidase
IPI00178188.5	DYNLRB2	dynein, light chain, roadblock-type 2	Cytoplasm	other
		enhancer of mRNA decapping 3 homolog		
IPI00018009.2	EDC3	(S. cerevisiae)	Cytoplasm	other
		eukaryotic translation elongation factor 1		translation
IPI00940393.3	EEF1A1	alpha 1	Cytoplasm	regulator
		eukaryotic translation elongation factor 1		translation
IPI00963998.1	EEF1E1	epsilon 1	Cytoplasm	regulator
				translation
IPI00186290.6	EEF2	eukaryotic translation elongation factor 2	Cytoplasm	regulator
		eukaryotic translation initiation factor 2,		translation
IPI00219678.3	EIF2S1	subunit 1 alpha, 35kDa	Cytoplasm	regulator
		eukaryotic translation initiation factor 2,		translation
IPI00021728.3	EIF2S2	subunit 2 beta, 38kDa	Cytoplasm	regulator
		eukaryotic translation initiation factor 2,		translation
IPI00297982.7	EIF2S3	subunit 3 gamma, 52kDa	Cytoplasm	regulator
				translation
IPI00299254.4	EIF5B	eukaryotic translation initiation factor 5B	Cytoplasm	regulator
IPI00921584.1	FAM98A	family with sequence similarity 98, member	unknown	other

		А		
		phenylalanyl-tRNA synthetase, alpha		
IPI00909657.1	FARSA	subunit	Cytoplasm	enzyme
IPI01009249.1	FARSB	phenylalanyl-tRNA synthetase, beta subunit	Cytoplasm	enzyme
		Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus		
IPI00973736.2	FAU	(FBR-MuSV) ubiquitously expressed	Cytoplasm	other
IPI00217686.4	FTSJ3	FtsJ homolog 3 (E. coli)	Nucleus	enzyme
		GTPase activating protein (SH3 domain)		
IPI00012442.1	G3BP1	binding protein 1	Nucleus	enzyme
		glioma tumor suppressor candidate region		
IPI00909733.1	GLTSCR2	gene 2	Cytoplasm	other
		guanine nucleotide binding protein-like 2		
IPI00015808.3	GNL2	(nucleolar)	Nucleus	enzyme
		guanine nucleotide binding protein-like 3		
IPI00003886.3	GNL3	(nucleolar)	Nucleus	other
IPI00216989.6	GPRIN3	GPRIN family member 3	unknown	other
IPI00021924.1	H1FX	H1 histone family, member X	Nucleus	other
		hepatoma-derived growth factor-related		
IPI01018333.1	HDGFRP2	protein 2	Nucleus	other
IPI00217465.5	HIST1H1C	histone cluster 1, H1c	Nucleus	other
	HIST2H2BE			
	(includes			
IPI00003935.6	others)	histone cluster 2, H2be	Nucleus	other

		heterogeneous nuclear ribonucleoprotein		
IPI00011913.1	HNRNPA0	A0	Nucleus	other
IPI00910614.1	HNRNPR	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	Nucleus	other
		heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-		
IPI00402391.3	HNRNPUL1	like 1	Nucleus	other
		heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-		
IPI00045498.4	HNRPDL	like	Nucleus	other
		heterochromatin protein 1, binding protein		
IPI00980952.2	HP1BP3	3	Nucleus	other
		heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic),		
IPI00414676.6	HSP90AB1	class B member 1	Cytoplasm	enzyme
		heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic),		
IPI00414676.6	HSP90AB1	class B member 1	Cytoplasm	enzyme
IPI00966238.2	HSPA9	heat shock 70kDa protein 9 (mortalin)	Cytoplasm	other
		insulin-like growth factor 2 mRNA binding		translation
IPI00008557.6	IGF2BP1	protein 1	Cytoplasm	regulator
IPI00001639.2	KPNB1	karyopherin (importin) beta 1	Nucleus	transporter
IPI00220327.4	KRT1	keratin 1	Cytoplasm	other
IPI00019359.4	KRT9	keratin 9	Cytoplasm	other
		La ribonucleoprotein domain family,		
IPI00185919.3	LARP1	member 1	Cytoplasm	other
IPI00170935.1	LRRC47	leucine rich repeat containing 47	unknown	Other
IPI00396321.1	LRRC59	leucine rich repeat containing 59	Cytoplasm	Other

IPI00396321.1	LRRC59	leucine rich repeat containing 59	Cytoplasm	Other
IPI00153032.1	LTV1	LTV1 homolog (S. cerevisiae)	unknown	Other
IPI01012991.1	LUC7L2	LUC7-like 2 (S. cerevisiae)	unknown	Other
IPI00924603.3	MAP4	microtubule-associated protein 4	Cytoplasm	Other
IPI00827687.1	MAP7D1	MAP7 domain containing 1	unknown	Other
		Mov10, Moloney leukemia virus 10,		
IPI00646886.1	MOV10	homolog (mouse)	Nucleus	Enzyme
IPI00106491.3	MRTO4	mRNA turnover 4 homolog (S. cerevisiae)	Cytoplasm	Other
		nascent polypeptide-associated complex		
IPI01021585.1	NACA	alpha subunit	Cytoplasm	Other
IPI00924630.1	NCAPH	non-SMC condensin I complex, subunit H	Nucleus	Other
		NIN1/RPN12 binding protein 1 homolog		
IPI00022373.2	NOB1	(S. cerevisiae)	Nucleus	Other
		nudix (nucleoside diphosphate linked		
IPI00552186.3	NUDT21	moiety X)-type motif 21	Nucleus	Other
		poly(A) binding protein, cytoplasmic 4		
IPI00642944.1	PABPC4	(inducible form)	Cytoplasm	Other
IPI00449049.5	PARP1	poly (ADP-ribose) polymerase 1	Nucleus	enzyme
				translation
IPI00016610.2	PCBP1	poly(rC) binding protein 1	Nucleus	regulator
IPI01021465.1	PCBP2	poly(rC) binding protein 2	Nucleus	other
		progesterone receptor membrane	Plasma	transmembrane
IPI00220739.3	PGRMC1	component 1	Membrane	receptor

IPI01010638.1	PHGDH	phosphoglycerate dehydrogenase	Cytoplasm	enzyme
IPI00219793.1	PPAN	peter pan homolog (Drosophila)	Nucleus	other
IPI0000874.1	PRDX1	peroxiredoxin 1	Cytoplasm	enzyme
		PRP31 pre-mRNA processing factor 31		
IPI00657721.1	PRPF31	homolog (S. cerevisiae)	Nucleus	other
		PRP31 pre-mRNA processing factor 31		
IPI00657721.1	PRPF31	homolog (S. cerevisiae)	Nucleus	other
		PRP8 pre-mRNA processing factor 8		
IPI00007928.4	PRPF8	homolog (S. cerevisiae)	Nucleus	other
IPI00179964.5	PTBP1	polypyrimidine tract binding protein 1	Nucleus	enzyme
IPI00793270.1	PTK2	PTK2 protein tyrosine kinase 2	Cytoplasm	kinase
IPI01015055.1	PXN	paxillin	Cytoplasm	other
IPI00220030.2	PXN	paxillin	Cytoplasm	other
IPI00946776.1	RAB7A	RAB7A, member RAS oncogene family	Cytoplasm	enzyme
IPI00658205.1	RAD50	RAD50 homolog (S. cerevisiae)	Nucleus	enzyme
IPI00221325.3	RANBP2	RAN binding protein 2	Nucleus	enzyme
IPI00004273.6	RBM25	RNA binding motif protein 25	Nucleus	other
IPI00465044.2	RCC2	regulator of chromosome condensation 2	Nucleus	other
				transcription
IPI00375359.2	RFC1	replication factor C (activator 1) 1, 145kDa	Nucleus	regulator
IPI00335589.5	RNMTL1	RNA methyltransferase like 1	Cytoplasm	enzyme
IPI00554723.5	RPL10	ribosomal protein L10	Cytoplasm	other
IPI00412579.6	RPL10A	ribosomal protein L10a	Nucleus	other

IPI00465361.4	RPL13	ribosomal protein L13	Cytoplasm	other
IPI01021673.1	RPL18	ribosomal protein L18	Cytoplasm	other
IPI00025329.1	RPL19	ribosomal protein L19	Cytoplasm	other
IPI00795751.1	RPL23	ribosomal protein L23	Cytoplasm	other
IPI00219155.5	RPL27	ribosomal protein L27	Cytoplasm	other
IPI00977964.1	RPL27A	ribosomal protein L27a	Nucleus	other
IPI00877999.1	RPL3	ribosomal protein L3	Cytoplasm	other
IPI00026302.3	RPL31	ribosomal protein L31	Nucleus	other
IPI00219160.3	RPL34	ribosomal protein L34	Cytoplasm	other
IPI00793102.1	RPL35A	ribosomal protein L35a	unknown	other
IPI00216237.5	RPL36	ribosomal protein L36	Cytoplasm	other
IPI00917181.1	RPL36A	ribosomal protein L36a	Cytoplasm	other
IPI00056494.5	RPL36AL	ribosomal protein L36a-like	Cytoplasm	other
IPI00924813.1	RPL37A	ribosomal protein L37a	Cytoplasm	other
IPI00215790.6	RPL38	ribosomal protein L38	Cytoplasm	other
IPI00795303.2	RPL4	ribosomal protein L4	Cytoplasm	enzyme
IPI00968128.1	RPL9	ribosomal protein L9	Cytoplasm	other
IPI00166873.3	RPP25L	ribonuclease P/MRP 25kDa subunit-like	unknown	other
IPI00977844.1	RPS13	ribosomal protein S13	Nucleus	other
				translation
IPI00026271.5	RPS14	ribosomal protein S14	Cytoplasm	regulator
IPI00479058.2	RPS15	ribosomal protein S15	Cytoplasm	other
IPI00221092.8	RPS16	ribosomal protein S16	Cytoplasm	other

IPI00847986.1	RPS24	ribosomal protein S24	Cytoplasm	other
110001790011			ojtopiasii	
IPI00187140.1	RPS26P11	ribosomal protein S26 pseudogene 11	unknown	other
IPI00719622.1	RPS28	ribosomal protein S28	Cytoplasm	other
IPI00182289.6	RPS29	ribosomal protein S29	Cytoplasm	other
IPI00021840.1	RPS6	ribosomal protein S6	Cytoplasm	other
IPI00216613.1	SFPQ	splicing factor proline/glutamine-rich	Nucleus	other
		SRA stem-loop interacting RNA binding		
IPI00009922.3	SLIRP	protein	Cytoplasm	other
IPI00947372.2	SMC4	structural maintenance of chromosomes 4	Nucleus	transporter
		staphylococcal nuclease and tudor domain		
IPI01009513.2	SND1	containing 1	Nucleus	enzyme
		small nuclear ribonucleoprotein 200kDa		
IPI00420014.2	SNRNP200	(U5)	Nucleus	enzyme
		small nuclear ribonucleoprotein 70kDa		
IPI00219483.1	SNRNP70	(U1)	Nucleus	other
IPI00658151.5	SPEG	SPEG complex locus	Nucleus	kinase
IPI01015006.1	SRP68	signal recognition particle 68kDa	Nucleus	other
IPI00642816.2	SRP9	signal recognition particle 9kDa	Cytoplasm	other
IPI00966190.2	SRPK1	SRSF protein kinase 1	Nucleus	kinase
IPI00333420.6	SRPK2	SRSF protein kinase 2	Nucleus	kinase
IPI00647720.1	SRRM1	serine/arginine repetitive matrix 1	Nucleus	other
IPI00218592.5	SRSF1	serine/arginine-rich splicing factor 1	Nucleus	other
IPI00916802.1	SSB	Sjogren syndrome antigen B (autoantigen	Nucleus	enzyme

		La)		
		staufen, RNA binding protein, homolog 1		
IPI00218609.2	STAU1	(Drosophila)	Cytoplasm	transporter
		serine/threonine kinase receptor associated	Plasma	
IPI01015342.1	STRAP	protein	Membrane	other
		SWAP switching B-cell complex 70kDa		
IPI00903155.2	SWAP70	subunit	Cytoplasm	other
		transcription elongation factor B (SIII),		transcription
IPI00982721.1	TCEB1	polypeptide 1 (15kDa, elongin C)	Nucleus	regulator
IPI01014211.1	TCP1	t-complex 1	Cytoplasm	other
		transforming growth factor beta 1 induced		transcription
IPI00396399.5	TGFB1I1	transcript 1	Nucleus	regulator
		thyroid hormone receptor associated protein		transcription
IPI00104050.3	THRAP3	3	Nucleus	regulator
		translocase of inner mitochondrial		
IPI01013489.1	TIMM50	membrane 50 homolog (S. cerevisiae)	Cytoplasm	phosphatase
				transcription
IPI00029629.4	TRIM25	tripartite motif containing 25	Cytoplasm	regulator
				transcription
IPI00438229.2	TRIM28	tripartite motif containing 28	Nucleus	regulator
IPI00619942.1	U2AF1	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1	Nucleus	other
IPI00478734.3	WDR64	WD repeat domain 64	unknown	other
IPI00790634.2	WIBG	within bgcn homolog (Drosophila)	Nucleus	other

		X-ray repair complementing defective		
		repair in Chinese hamster cells 5 (double-		
IPI00220834.8	XRCC5	strand-break rejoining)	Nucleus	enzyme
IPI00397024.1	YTHDF2	YTH domain family, member 2	unknown	other
IPI01010979.1	ZC3H15	zinc finger CCCH-type containing 15	Nucleus	other
IPI00187011.4	ZC3H4	zinc finger CCCH-type containing 4	unknown	other
			Plasma	
IPI00981976.2	ZC3HAV1	zinc finger CCCH-type, antiviral 1	Membrane	other
IPI00221093.7				
IPI00013296.3				
IPI00081836.3				
IPI00719549.2				
IPI00867688.2				
IPI00786995.1				
IPI00888126.2				

APÊNDICE 4. ARTIGO CIENTÍFICO

Profiling FAK interactome in HEK293 cells reveals its function as regulator of mRNA splicing.

Cordeiro IB¹, Santos A¹, Paes-Leme AF¹, Oliveira RR¹, Consonni S¹, Gonçalves D¹, Saito A¹, Kobarg J¹, Franchini KG^{1, 2}.

¹ Brazilian National Laboratory for Biosciences, Center for Research in Energy and Materials, Campinas, SP, 13084-971, Brazil

² Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Campinas, Campinas, SP, 13081-970, Brazil.

Corresponding author

Kleber G. Franchini, M.D. Ph.D.

Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro 10.000, CP 6192, 13084-971 Campinas, SP, Brazil. Tel.: + 55 19 3512 1013; fax: + 55 19 3512 1006.

kleber.franchini@lnbio.cnpem.br

Running title: Proteome identification of FAK interactome

ABSTRACT

Focal adhesion kinase (FAK) has roles in many cellular processes. The identification of protein partners for FAK has greatly contributed to our understanding of its multiple function. Using inducible FLAG-tagged FAK combined with affinity/purification mass spectrometry (MS) approach, we identified proteins associated with FAK in HEK293 cells. A total of 153 proteins were repeatedly detected in high-resolution MS measurements. Beyond the well characterized partnering with paxillin, HSP90 and TGFB111, analysis of MS data uncovered novel sets of proteins that associate with FAK, playing a role in protein synthesis, gene expression, cellular growth, proliferation, death and survival. In addition, the network analysis established the unexpected finding that a module of 30 proteins linked to RNA post-transcriptional modifications are recruited by FAK, including SC35, which is a marker of the nuclear speckles. Indeed, this module is found to be enriched by proteins associated with spliceosome. Remarkably, a similar set of proteins was also recruited by FAK N-terminal FERM domain. Biochemical and imaging validations established that FAK associates and co-localizes with SC35 protein at the cell nuclei. We further pinpoint a functional role of FAK in mRNA splicing. We showed that FAK can modify the splicing site selection of the adenoviral E1A minigene in a dose-dependent manner. Our work provides new insights into the molecular function of FAK in the nucleus, indicating that it may be involved in events related to RNA function, such as pre-mRNA splicing.

Keywords: Focal adhesion kinase, immunoprecipitation, interactome, mass spectrometry.

INTRODUCTION

Focal adhesion kinase (FAK), a non-receptor tyrosine kinase and scaffold protein functions as key signaling integrator, coupling integrin and growth factor receptors to intracellular pathways that regulate such diverse processes as spreading, migration, proliferation, and survival in a variety of cell types [1]. The involvement of FAK in one or more of these processes is vital during embryonic development, since FAK knockout mice exhibit embryonic lethality [2]. Moreover, perturbations in FAK signaling have been further implicated in pathological processes including cancer and cardiovascular diseases [3, 4], making the understanding of how FAK is involved in this broad range of processes of prime interest and significance.

FAK consists of a large N-terminal FERM (band 4.1, ezrin, radixin, moesin) domain, followed by a tyrosine kinase domain, and a C-terminal focal adhesion targeting (FAT) domain. Intramolecular interactions between the FERM and Kinase domains maintain FAK in an autoinhibited state [5]. Activating signals relieve this autoinhibition leading to increased catalytic activity of FAK and to an autophosphorylation of the Tyr397 located within the FAK FERM-Kinase linker [5]. Phosphorylated Tyr397 creates a high-affinity binding site for c-Src family kinases (SFKs), which once recruited by phosphorylated FAK are also activated [6, 7]. The FAK-SFKs complex drives the phosphorylation of additional tyrosine residues in FAK and in functionally distinct substrates such as paxillin and p130Cas [8, 9], as well as critical regulators of Rho GTPase signaling including the nucleotide exchange factors (GEFs) PIX, Vav, DOCK180, and GTPase-activating proteins (GAPs) such as p190RhoGAP and ASAP1 [10-12]. In particular, SFK-mediated phosphorylation of Y925 in the FAK FAT domain promotes the

193

association with the SH2-containing protein Grb2, linked to the activation of Ras-Erk1/2 signaling pathways [13]. In addition, the multifaceted structural characteristics of the folded FERM and FAT domains underlie the ability of FAK to engage a number protein partners and thus regulating signaling independently of catalytic activity. An emerging picture posits that many binding partners enable FAK to contribute to different signaling pathways, influencing distinct cellular functions. For example, it is well documented that the FAT domain triggers focal adhesion recruitment through interactions with paxillin and/or talin [14], impacting functions such as cell spreading and migration. The FERM domain mediates the localization of FAK at cell membranes, sarcomeres and nuclei [15-17]. As such, FAK FERM domain mediates interactions with the membrane proteins including the tail of β 1-containing integrins, activated platelet derived growth factor (PDGF) and epidermal growth factor (EGF) receptors; these interactions are important in regulating FAK activity in cell migration and invasion [18]. In a previous study, we demonstrated that the interaction of the FAK FERM domain with sarcomeric myosin plays an important role in regulating FAK activity in cardiac myocytes [17]. In addition, FAK translocates from the cytosol to the nucleus, coordinated by nuclear localization signal (NLS) within the FERM domain [16]. The interaction of the FAK FERM domain with p53 in the cell nucleus promotes p53 turnover through an Mdm2-dependent p53 ubiquitination mechanism, contributing to cell survival in stress conditions [16, 19].

Despite the large number of FAK protein partners already identified, the diverse functions of FAK suggest that it might have an even greater assortment of binding partners. Thus, in order to allow deeper insights into the involvement of FAK in cellular control processes, it will be of high importance to identify and generate a comprehensive picture of

FAK interaction partners. To this end, we have performed a global analysis of FAK interaction partners in HEK293T cells, using an affinity tag/purification mass spectrometry (AP-MS) approach. The analysis revealed many novel FAK protein partners. Functional annotation using Gene Ontology (GO) biological processes of the FAK interacting partners by Ingenuity platform, revealed known FAK-associated functional modules (migration, motility, survival) and a novel one, regulation of mRNA post-transcriptional regulation with impact on mRNA splicing.

RESULTS

Establishment of Flag-tagged FAK stable HEK393 cells

FAK is constitutively expressed in a variety of cell lines but the investigation of its partners by AP-MS has proven to be difficult for several reasons including its relative low abundance and the technical difficulties associated with the purification of native FAK from cell systems. To overcome these restrictions we generated stable HEK293 Flp-In T-Rex cell line expressing tetracycline-inducible Flag-tagged FAK (HEK293-FF) (Fig 1A). The Flag epitope tag was chosen because it is recognized by antibodies useful for protein purification, immunoblotting, and immunofluorescence microscopy. HEK293-FF cells, which have been allowed to go through multiple cell divisions over a period of 48 hours, form microislands with individual cells coupled to each other. Endogenous basal FAK expression in this cell line is low (Fig. S1a). Addition of 0.05 to 1 μ g/ml of tetracycline into culture medium induced the expression of Flag-FAK as detected by Western blot analysis (Fig. S1a). A peak of Flag-FAK expression was reached with 0.5 μ g/ml of tetracycline. Cellular morphology and localization of Flag-FAK in HEK293-FF were studied in cells

double-labeled with phalloidin and anti-Flag or anti-FAK antibodies (Fig. 1b, Fig. S1b). No obvious changes in cell morphology or proliferation were observed in the cells overexpressing Flag-FAK after addition of tetracycline 0.5 µg/ml (Fig. S1c). In these cells, Flag-FAK stained diffusely in the cytoplasm as well as at sites of actin stress fiber attachment to the small and randomly arranged focal adhesions (Fig. 1b arrows). Confocal immunofluorescence microscopy also demonstrated nuclear localization of Flag-FAK in a punctate distribution (Fig. 1c, and Fig. S1b,d). Cell fractionation analysis further confirmed the nuclear distribution of Flag-FAK in HEK293-FF cells (Fig. 1d). Therefore, the HEK293-FF cells are useful cell system for conditional and stable expression of FAK.

Identification of FAK interacting proteins in HEK293-FF cells

To identify protein partners of FAK we used extracts from three independent HEK293-FF cell cultures treated with 0.5 µg/ml tetracycline. The results indicate that upon induction with tetracycline Flag-FAK was similarly overexpressed in all three cultures (Fig. 1e). The induction of Flag-FAK was accompanied by a proportional increase in the amount of FAK detected by the phosphospecific antibody targeted to FAK Tyr397. After immunoprecipitation, the complexes were eluted with Flag-peptide and digested with trypsin. Aliquots of the anti-Flag immunoprecipitated proteins from tetracycline-induced or control cells were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and silver stained (Fig. 1f). Immunoprecipitation of the extracts from HEK293-FF treated with tetracycline produced several bands that were visually absent in the input of control untreated cells. Materials from the three independent experiments from each group were analyzed by LC-MS/MS. Only proteins (a) present in at least two Flag-FAK expressing

samples with peptides *XCorr* scores up to 2 (b) for which at least two peptides (spectral counts) were identified that (c) were absent in the samples from untreated control cells, met criteria to be listed as FAK associated partners. Using these criteria we identified a total of 153 proteins that copurified with FAK in the anti-Flag immunoprecipitates of HEK293-FF induced with tetracycline (Table 1 and Table S1).

ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)	Unique Peptides
IPI00792186.4	ABCF1	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1 AI G11, alpha-1, 2-	Cytoplasm	transporter	2
IPI00973259.1	ALG11	mannosyltransferase	Other	other transcription	1
IPI01010794.1	ALYREF	Aly/REF export fator adaptor-related protein complex 3,	Nucleus	regulator	5
IPI00413686.2	AP3D1	delta 1 subunit Rho/Rac guanine nucleotide	Cytoplasm	transporter	2
IPI00940816.2	ARHGEF2	exchange factor (GEF) 2 ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex,	Cytoplasm	other	1
IPI00002521.1	ATP5J	subunit F6 BCL2-associated transcription	Cytoplasm	transporter transcription	1
IPI00980443.1	BCLAF1	factor 1 BRX1, biogenesis of ribosomes,	Nucleus	regulator	3
IPI00181728.1	BRIX1	homolog (S. cerevisiae) chromosome 14 open reading	Nucleus	other	1
IPI00006980.1	C14orf166	frame 166 chromosome 8 open reading	Nucleus	other	6
IPI00011997.4	C8orf33	frame 33 CD3e molecule, epsilon	Other	other	2
IPI00645816.1	CD3EAP	associated protein	Nucleus	other	2
IPI00465294.2	CDC5L	cell division cycle 5-like	Nucleus	other	2
IPI00978302.1	CFL1	cofilin 1 (non-muscle)	Nucleus	other transcription	1
IPI00472887.3	CKAP5	cytoskeleton associated protein 5 cytochrome c oxidase subunit VIb	Nucleus	regulator	2
IPI00797738.1	COX6B1	polypeptide 1 (ubiquitous) DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box	Cytoplasm	enzyme	2
IPI00293655.3	DDX1	helicase 1 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box	Nucleus	enzyme	6
IPI00889541.2	DDX17	helicase 17 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box	Nucleus	enzyme	5
IPI00985384.1	DDX3X	polypeptide 3, X-linked DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box	Cytoplasm	enzyme	5
IPI00017617.1	DDX5	helicase 5 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box	Nucleus	enzyme	8
IPI00925260.1	DDX56	helicase 56	Nucleus	enzyme	1

Table 1. Proteins identified in MS-analysis

		DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box			
IPI00030320.4	DDX6	helicase 6	Nucleus	enzyme	1
		DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box			
IPI00927809.1	DHX30	polypeptide 30	Nucleus	enzyme	2
		DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box			
IPI00844578.1	DHX9	helicase 9	Nucleus	enzyme	4
		DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily			
IPI01019083.1	DNAJA1	A, member 1	Nucleus	other	1
		developmentally regulated GTP			
IPI00031836.3	DRG1	binding protein 1	Cytoplasm	other	4
		dynein, cytoplasmic 1, heavy	~ .		
IPI00456969.1	DYNC1H1	chain 1	Cytoplasm	peptidase	3
ID100150100 5	DUUT DDA	dynein, light chain, roadblock-			~
IPI00178188.5	DYNLRB2	type 2	Cytoplasm	other	2
IPI00018009.2	EDC3	enhancer of mRNA decapping 3	Cytoplasm	other	2
101000 40202 2		eukaryotic translation elongation		translation	~
IPI00940393.3	EEFIAI	factor I alpha I	Cytoplasm	regulator	2
IDI000(2000 1		eukaryotic translation elongation		translation	1
IP100963998.1	EEFIEI	factor I epsilon I	Cytoplasm	regulator	I
IDI0010(200 (FFFA	eukaryotic translation elongation		translation	_
IP100186290.6	EEF2	factor 2	Cytoplasm	regulator	5
IDI00210679 2	EIE201	factor 2 suburit 1 alpha 251/Da	Cutonloam		5
IP100219078.5	EIF231	aukaruotia translation initiation	Cytoplasin	translation	3
IDI00021728 3	FIE282	factor 2 subunit 2 bata 38kDa	Cutoplasm	regulator	6
II 100021728.5	L11 ² 32	eukaryotic translation initiation	Cytoplasin	translation	0
IPI00207082 7	FIF2S3	factor 2 subunit 3 gamma 52kDa	Cytoplasm	regulator	Δ
II 100277702.7	LII 200	eukarvotic translation initiation	Cytoplashi	translation	-
IPI00299254-4	EIE5B	factor 5B	Cytoplasm	regulator	5
II 100277254.4	LIIJD	family with sequence similarity	Cytoplashi	regulator	5
IPI00921584 1	FAM98A	98 member A	Other	other	3
11100/2100111		phenylalanyl-tRNA synthetase.	0 1101		U
IPI00909657.1	FARSA	alpha subunit	Cytoplasm	enzyme	3
		phenylalanyl-tRNA synthetase,	- J - I		-
IPI01009249.1	FARSB	beta subunit	Cytoplasm	enzyme	4
		Finkel-Biskis-Reilly murine	, 1	2	
		sarcoma virus (FBR-MuSV)			
IPI00973736.2	FAU	ubiquitously expressed	Cytoplasm	other	2
IPI00217686.4	FTSJ3	FtsJ homolog 3 (E. coli)	Nucleus	enzyme	2
		GTPase activating protein (SH3		•	
IPI00012442.1	G3BP1	domain) binding protein 1	Nucleus	enzyme	8
		glioma tumor suppressor			
IPI00909733.1	GLTSCR2	candidate region gene 2	Cytoplasm	other	1
		guanine nucleotide binding			
IPI00015808.3	GNL2	protein-like 2 (nucleolar)	Nucleus	enzyme	1
		guanine nucleotide binding			
IPI00003886.3	GNL3	protein-like 3 (nucleolar)	Nucleus	other	2
IPI00216989.6	GPRIN3	GPRIN family member 3	Other	other	1
IPI00021924.1	H1FX	H1 histone family, member X	Nucleus	other	3
		hepatoma-derived growth factor-			
IPI01018333.1	HDGFRP2	related protein 2	Nucleus	other	3
IPI00217465.5	HIST1H1C	histone cluster 1, H1c	Nucleus	other	3
	HIST2H2BE				
IPI00003935.6	(includes others)	histone cluster 2, H2be	Nucleus	other	2
		heterogeneous nuclear			
IPI00011913.1	HNRNPA0	ribonucleoprotein A0	Nucleus	other	4

		heterogeneous nuclear			
IPI00045498.4	HNRNPDL	ribonucleoprotein D-like	Nucleus	other	1
		heterogeneous nuclear			
IPI00910614.1	HNRNPR	ribonucleoprotein R	Nucleus	other	2
IDI00402201 2	UNDNDUU 1	heterogeneous nuclear	Nucleur	- 4h	2
IP100402391.3	HNKNPULI	ribonucleoprotein U-like I	Nucleus	other	3
10100080052 2	HD1RD3	hinding protein 3	Nucleus	other	1
IF 100980952.2	III IDI 5	heat shock protein 90kDa alpha	Inucleus	oulei	4
IPI00414676 6	HSP90AB1	(cytosolic) class B member 1	Cytoplasm	enzyme	2
11 100 11 1070.0		heat shock 70kDa protein 9	Cytoplusin	enzyme	2
IPI00966238.2	HSPA9	(mortalin)	Cytoplasm	other	4
		insulin-like growth factor 2	5 1	translation	
IPI00008557.6	IGF2BP1	mRNA binding protein 1	Cytoplasm	regulator	7
IPI00001639.2	KPNB1	karyopherin (importin) beta 1	Nucleus	transporter	2
		La ribonucleoprotein domain		-	
IPI00185919.3	LARP1	family, member 1	Cytoplasm	other	8
IPI00170935.1	LRRC47	leucine rich repeat containing 47	Other	other	5
IPI00396321.1	LRRC59	leucine rich repeat containing 59	Cytoplasm	other	7
IPI00153032.1	LTV1	LTV1 homolog (S. cerevisiae)	Other	other	2
IPI01012991.1	LUC7L2	LUC7-like 2 (S. cerevisiae)	Other	other	2
IPI00924603.3	MAP4	microtubule-associated protein 4	Cytoplasm	other	3
IPI00827687.1	MAP7D1	MAP7 domain containing 1	Other	other	1
		Mov10, Moloney leukemia virus			
IPI00646886.1	MOV10	10, homolog (mouse)	Nucleus	enzyme	3
		mRNA turnover 4 homolog (S.			
IPI00106491.3	MRTO4	cerevisiae)	Cytoplasm	other	1
		nascent polypeptide-associated	~ .	transcription	
IPI01021585.1	NACA	complex alpha subunit	Cytoplasm	regulator	3
IDI00024620 1	NCADU	non-SMC condensin I complex,	Nuclaus	othor	n
IP100924030.1	NCAPП	NIN1/PPN12 binding protein 1	Inucleus	other	Z
IPI00022373 2	NOB1	homolog (S. cerevisiae)	Nucleus	other	3
11 100022375.2	NODI	nudix (nucleoside diphosphate	rucieus	other	5
IPI00552186.3	NUDT21	linked moiety X)-type motif 21	Nucleus	other	1
		poly(A) binding protein,		translation	
IPI00642944.1	PABPC4	cytoplasmic 4 (inducible form)	Cytoplasm	regulator	2
IPI00449049.5	PARP1	poly (ADP-ribose) polymerase 1	Nucleus	enzyme	7
				translation	
IPI00016610.2	PCBP1	poly(rC) binding protein 1	Nucleus	regulator	1
IPI01021465.1	PCBP2	poly(rC) binding protein 2	Nucleus	other	1
		progesterone receptor membrane	Plasma	transmembrane	
IPI00220739.3	PGRMC1	component 1	Membrane	receptor	2
IPI01010638.1	PHGDH	phosphoglycerate dehydrogenase	Cytoplasm	enzyme	3
IPI00219793.1	PPAN	peter pan homolog (Drosophila)	Nucleus	other	2
IPI0000874.1	PRDX1	peroxiredoxin 1	Cytoplasm	enzyme	6
IPI00657721.1	PRPF31	pre-mRNA processing factor 31	Nucleus	other	2
IPI00007928.4	PRPF8	pre-mRNA processing factor 8	Nucleus	other	2
		polypyrimidine tract binding			-
IPI00179964.5	PTBP1	protein 1	Nucleus	enzyme	2
IPI00793270.1	РГК2	protein tyrosine kinase 2	Cytoplasm	kinase	25
IPI00220030.2	PXN	Paxillin	Cytoplasm	other	1
IDI00046776 1		RAB/A, member RAS oncogene			1
11100946776.1	КАВ/А	Tamily	Cytoplasm	enzyme	1

IPI00658205.1	RAD50	RAD50 homolog (S. cerevisiae)	Nucleus	enzyme	1
IPI00221325.3	RANBP2	RAN binding protein 2	Nucleus	enzyme	4
IPI00004273.6	RBM25	RNA binding motif protein 25 regulator of chromosome	Nucleus	other	1
IPI00465044.2	RCC2	condensation 2 replication factor C (activator 1)	Nucleus	other transcription	4
IPI00375359.2	RFC1	1, 145kDa	Nucleus	regulator	2
IPI00335589.5	RNMTL1	RNA methyltransferase like 1	Cytoplasm	enzyme	2
IPI00554723.5	RPL10	ribosomal protein L10	Cytoplasm	other	7
IPI00412579.6	RPL10A	ribosomal protein L10a	Other	other	3
IPI00465361.4	RPL13	ribosomal protein L13	Cytoplasm	other	11
IPI01021673.1	RPL18	ribosomal protein L18	Cytoplasm	other	2
IPI00025329.1	RPL19	ribosomal protein L19	Cytoplasm	other	2
IPI00795751.1	RPL23	ribosomal protein L23	Cytoplasm	other	4
IPI00219155.5	RPL27	ribosomal protein L27	Cytoplasm	other	6
IPI00977964.1	RPL27A	ribosomal protein L27a	Nucleus	other	2
IPI00877999.1	RPL3	ribosomal protein L3	Cytoplasm	other	2
IPI00026302.3	RPL31	ribosomal protein L31	Other	other	2
IPI00219160.3	RPL34	ribosomal protein L34	Cytoplasm	other	3
IPI00793102.1	RPL35A	ribosomal protein L35a	Cytoplasm	other	4
IPI00216237.5	RPL36 RPL36A/RPL36A-	ribosomal protein L36	Cytoplasm	other	3
IPI00917181.1	HNRNPH2	ribosomal protein L36a	Cytoplasm	other	1
IPI00056494.5	RPL36AL	ribosomal protein L36a-like	Cytoplasm	other	1
IPI00924813.1	RPL37A	ribosomal protein L37a	Cytoplasm	other	2
IPI00215790.6	RPL38	ribosomal protein L38	Cytoplasm	other	1
IPI00795303.2	RPL4	ribosomal protein L4	Cytoplasm	enzyme	5
IPI00968128.1	RPL9	ribosomal protein L9 ribonuclease P/MRP 25kDa	Cytoplasm	other	4
IPI00166873.3	RPP25L	subunit-like	Other	other	1
IPI00977844.1	RPS13	ribosomal protein S13	Nucleus	other translation	8
IPI00026271.5	RPS14	ribosomal protein S14	Cytoplasm	regulator	5
IPI00479058.2	RPS15	ribosomal protein S15	Cytoplasm	other	2
IPI00221092.8	RPS16	ribosomal protein S16	Cytoplasm	other	6
IPI00847986.1	RPS24	ribosomal protein S24	Cytoplasm	other	3
ID1001071401	DD00(D11	ribosomal protein S26 pseudogene	0.1	.1	2
IPI0018/140.1	RPS26P11		Other	other	3
IPI00/19622.1	RPS28	ribosomal protein S28	Cytoplasm	other	3
IPI00182289.6	RPS29	ribosomal protein S29	Cytoplasm	other	I 7
IP100021840.1	RPS6	RNA 2',3'-cyclic phosphate and	Cytoplasm	other	5
IPI00550689.3	RTCB	5'-OH ligase splicing factor proline/glutamine-	Cytoplasm	enzyme	11
IPI00216613.1	SFPQ	rich SRA stem-loop interacting RNA	Nucleus	other	6
IPI00009922.3	SLIRP	binding protein structural maintenance of	Cytoplasm	other	1
IPI00947372.2	SMC4	chromosomes 4 staphylococcal nuclease and tudor	Nucleus	transporter	2
IPI01009513.2	SND1	domain containing 1 small nuclear ribonucleoprotein	Nucleus	enzyme	6
IPI00420014.2	SNRNP200	200kDa (U5)	Nucleus	enzyme	3

		small nuclear ribonucleoprotein			
IPI00219483.1	SNRNP70	70kDa (U1)	Nucleus	other	2
IPI00658151.5	SPEG	SPEG complex locus	Nucleus	kinase	1
IPI01015006.1	SRP68	signal recognition particle 68kDa	Nucleus	other	2
IPI00642816.2	SRP9	signal recognition particle 9kDa	Cytoplasm	other	2
IPI00966190.2	SRPK1	SRSF protein kinase 1	Nucleus	kinase	4
IPI00333420.6	SRPK2	SRSF protein kinase 2	Nucleus	kinase	2
IPI00647720.1	SRRM1	serine/arginine repetitive matrix 1	Nucleus	other	1
		serine/arginine-rich splicing factor			
IPI00218592.5	SRSF1	1	Nucleus	other	3
		Sjogren syndrome antigen B			
IPI00916802.1	SSB	(autoantigen La)	Nucleus	enzyme	2
		staufen double-stranded RNA			_
IPI00218609.2	STAU1	binding protein 1	Cytoplasm	transporter	6
IDI01015242 1		serine/threonine kinase receptor	Plasma		2
IP101015342.1	SIKAP	associated protein	Membrane	other	2
IDI00003155 2	SWAD70	5 w AP switching B-cell complex 70kDa subunit	Cytoplasm	other	4
II 100703133.2	5WAI 70	transcription elongation factor B	Cytoplashi	other	т
		(SIII), polypeptide 1 (15kDa.		transcription	
IPI00982721.1	TCEB1	elongin C)	Nucleus	regulator	1
IPI01014211.1	TCP1	t-complex 1	Cytoplasm	other	1
		transforming growth factor beta 1	5 1	transcription	
IPI00396399.5	TGFB1I1	induced transcript 1	Nucleus	regulator	8
		thyroid hormone receptor		transcription	
IPI00104050.3	THRAP3	associated protein 3	Nucleus	regulator	6
		translocase of inner mitochondrial			
		membrane 50 homolog (S.	~ .		
IPI01013489.1	TIMM50	cerevisiae)	Cytoplasm	phosphatase	I
IDI00020620 4	TDIM25	tringstite motif containing 25	Cutonlasm	transcription	2
IP100029029.4	I KIIVI23	tripartite motil containing 25	Cytopiasin	transcription	3
IPI00438229 2	TRIM28	tripartite motif containing 28	Nucleus	regulator	7
II 100 150229.2	11(11)120	U2 small nuclear RNA auxiliary	ivacieus	regulator	,
IPI00619942.1	U2AF1	factor 1	Nucleus	other	2
IPI00478734.3	WDR64	WD repeat domain 64	Other	other	1
IPI00790634.2	WIBG	within bgcn homolog (Drosophila)	Nucleus	other	5
		X-ray repair complementing			
		defective repair in Chinese			
		hamster cells 5 (double-strand-			
IPI00220834.8	XRCC5	break rejoining)	Nucleus	enzyme	6
IPI00397024.1	YTHDF2	YTH domain family, member 2	Other	other	2
		zinc finger CCCH-type containing			_
IPI01010979.1	ZC3H15	15	Nucleus	other	3
	702114	zinc finger CCCH-type containing	Other	- 4 1	1
1110018/011.4	20384	4	Diner	outer	1
IPI00981076 2	7C3HAV1	zinc finger CCCH type antiviral 1	r lasilla Membrane	other	3
11 100 201 270.2		Zine miger CCCH-type, anuvital 1	wiembrane	ouloi	5

In addition to the identification of novel potential FAK interacting protein candidates, our study identified previously reported FAK interacting proteins such as paxillin [8, 20, 21], Hsp90ab1 [22], and TGF β 1I1 [23, 24]. FAK and paxillin are important components of integrin-regulated signaling and function in crosstalk between cell–matrix and cell–cell adhesions [25]. FAK-paxillin association was confirmed by western blotting of the Flag-FAK-co-immunoprecipitated proteins (Figure 2a). We also validate by coimmunoprecipitation the association of FAK with the chaperone Hsp90 (Hsp90ab1) (Figure 2a). The overexpression of Hsp90 has been associated with higher expression and activation of FAK in myelodysplastic syndromes [26].

FAK-interacting protein candidates relate to multiple molecular functions.

To gain a broader understanding of the FAK protein partners and their putative role in biology of the cell, we applied Gene Ontology (GO) analysis using Ingenuity System Pathways® (IPA). When considering the category of Cellular Component (CC), 55 FAKassociated proteins are predicted to be localized in the cytoplasm (36%), 73 in the nucleus (48%), 4 in the plasma membrane (3%), 6 in the mitochondria (4%), 5 in the endoplasmic reticulum (3%), 3 in the Golgi apparatus (2%) and 7 with undefined localization (4%) (Fig. 2b). As for molecular function, the majority of proteins appeared to participate in binding and catalytic activity (Fig. 2c and supplementary Table S2). These include 57 protein bindings (37%) such as LRRC47, STRAP, HP1BP3 and others RNA and DNA binding protein; 30 enzymes (19%) such as the G3BP1, a GTPase activating protein that regulates mRNA stability and stress granules formation [27]; 3 kinases (3%) such as SRPK1 and SRPK2, that play central roles in the regulation of splicing, controlling the intranuclear

distribution of serine/arginine (S/R)-rich splicing factors[28]; 1 peptidase and 1 phosphatase. FAK also associates with 10 transcription regulators (6%), as for example Hic5 (TGFb111), a previously described FAK interactor that functions as an adapter protein coordinating protein-protein interactions at focal adhesions and nucleus [23].

FAK protein partners may function in multiple biological process

We next used network analysis with Ingenuity System Pathways[®] (IPA) to interrogate the over represented biological processes in our data set of FAK protein partners. Major MS-identified proteins copurified with FAK were related to protein synthesis, cell signaling and morphology, cellular growth and proliferation, cellular death and survival and RNA post-transcriptional modifications (Fig. 3a; Table S2). We identify 18 proteins in Protein Synthesis, 6 in Cell Signaling, 4 in Cell Morphology, 14 in Cell Growth and Proliferation, 15 in Cell Death and Survival, 23 proteins that are involved in RNA Post-Transcriptional Modifications, 12 in Gene Expression and 5 in Molecular Transport (Table S2). The biological pathways with some of these FAK copurified proteins are illustrated in Figure 3a. The RNA post-transcriptional modification module associate with FAK include several proteins involved in the processing, stabilization, maturation and splicing of the RNA (Table 2). Among splicing regulatory proteins, we found 4 S/R-rich or S/R-related splicing factors, 4 heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) and 7 associated splicing proteins. Serine/arginine-rich encompass a well-characterized splicing factor family. They typically activate splicing, by recruiting components of the splicing machinery and mediate RNA recognition and protein-protein interaction[29]. Besides the S/R-rich, FAK associates with the factors SRPK1 and SRPK2. These factors have previously been reported to phosphorylate SR proteins in their S/R-rich domains, regulating

selection of the splice site and spliceosome assembly[30]; they also associate with SRRM1 (also known as Srm160) and Aly/Ref proteins, components of the exon-exon junction complex (EJC). The heterogeneous ribonucleoproteins family (hnRNPs) encompasses splicing regulatory proteins also represented in FAK-interactome. Among these family, hnRNPA0, hnRNPUL1, hnRNP E (PCBP1) and hnRNP I (PTBP1) associate with FAK. These factors are recruited to spliceosome assembly, where it participates in pre-mRNA processing[31, 32]. Interestingly, we observed a novel association of FAK with proteins of the RNA post-transcriptional modifications pathway, including the splicing factor SF2/ASF (SRSF1). SF2/ASF is a serine/arginine-rich splicing factor that binds to pre-mRNA transcripts and components of the spliceosome and functions activating splicing[33]. FAK interaction with SF2/ASF was also validated by co-immunoprecipitation (Fig. 3b). The interaction of FAK with splicing factors may indicate a new role for FAK in regulation of RNA processing.

Table2. RNA post-transcriptional modifications proteins identified inimmunoprecipitated extracts.

Symbol	Entrez Gene Name	Subcellular	Biological
		Localization	Function
CDC5L	cell division cycle 5-like	Nucleus	Processing and
			Splicing of RNA
DDX17	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box	Nucleus	Processing and
	helicase 17		unwinding of RNA
DDX5	DEAD (Asp-Glu-Ala-	Nucleus	Processing and
	Asp) box helicase 5		maturation of RNA
DDX56	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box	Nucleus	Processing of RNA
	helicase 56		
HNRNPA0	heterogeneous nuclear	Nucleus	Processing of RNA
	ribonucleoprotein A0		
HNRNPUL1	heterogeneous nuclear	Nucleus	Processing of RNA
	ribonucleoprotein U-like 1		
NUDT21	nudix (nucleoside diphosphate	Nucleus	Processing of RNA

	linked moiety X)-type motif 21		
PABPC4	poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 (inducible form)	Cytoplasm	Processing of RNA
PCBP1	poly(rC) binding protein 1	Nucleus	Processing and
			Splicing of RNA
PPAN	peter pan homolog (Drosophila)	Nucleus	Processing and
			Splicing of RNA
PRPF31	pre-mRNA processing factor 31	Nucleus	Processing and
			Splicing of RNA
PRPF8	pre-mRNA processing factor 8	Nucleus	Processing and
			Splicing of RNA
PTBP1	polypyrimidine tract binding	Nucleus	Processing and
	protein 1		Splicing of RNA
RBM25	RNA binding motif protein 25	Nucleus	Processing and
			Splicing of RNA
RPL35A	ribosomal protein L35a	Cytoplasm	Processing of RNA
RPS15	ribosomal protein S15	Cytoplasm	Processing of RNA
RPS16	ribosomal protein S16	Cytoplasm	Processing of RNA
RPS24	ribosomal protein S24	Cytoplasm	Processing of RNA
RPS28	ribosomal protein S28	Cytoplasm	Processing of RNA
RPS6	ribosomal protein S6	Cytoplasm	Processing of RNA
SFPQ	splicing factor proline/glutamine-	Nucleus	Processing and
	rich		Splicing of RNA
SNRNP200	small nuclear ribonucleoprotein	Nucleus	Processing and
	200kDa (U5)		Splicing of RNA
SNRNP70	small nuclear ribonucleoprotein	Nucleus	Processing and
	70kDa (U1)		Splicing of RNA
SRPK1	SRSF protein kinase 1	Nucleus	Processing of RNA
SRPK2	SRSF protein kinase 2	Nucleus	Processing and
			Splicing of RNA
SRRM1	serine/arginine repetitive matrix	Nucleus	Processing and
	1		Splicing of RNA
SRSF1	serine/arginine-rich splicing	Nucleus	Processing and
	factor 1		Splicing of RNA
SSB	Sjogren syndrome antigen B	Nucleus	Processing of RNA
	(autoantigen La)		
U2AF1	U2 small nuclear RNA auxiliary	Nucleus	Processing of RNA
	factor 1		

Subnuclear localization of FAK

As the results that we present here pointed to involvement of FAK with mRNA processing, and as most of the so far characterized nuclear subdomains are sites for RNA maturation and processing, we decided to investigate, through confocal microscopy

analysis, the identity of the nuclear substructures where FAK is presented in HEK293-FF cells. We analyzed the HEK-293-FF and found that upon tetracycline induction, these cells displayed FAK nuclear localization (Fig. 6A). Using the recombinant FAK-fused with Flag in our confocal analysis, we observed punctated distribution throughout the nucleus. We next performed confocal IF microscopy using anti-FAK and anti-SC35 antibodies to investigate whether FAK co-localizes with nuclear speckles. IF assays show that FAK co-localizes with SC35 in cells overexpressing FAK (Fig. 6A). Reciprocal co-immunoprecipitation assays confirming the association of FAK and FERM with SC35 are presented in Figure 6B.

FAK positively regulates E1A pre-mRNA splicing in vivo

The association of FAK with splicing factors pointed FAK as a possible pre-mRNA splicing regulator. To investigate this hypothesis we used the adenoviral E1A minigene reporter system in Flp-In FAK-overexpressing cells. Depending on the 5'-splice site selection, the E1A pre-mRNA may generate five isoforms: 13S, 12S, 11S, 10S and 9S[34]. These isoforms can be monitored by RT-PCR followed by agarose gel analysis, where the intensity of each band in the gel directly correlates with the splicing site selection, which in turn, reflects the positive or negative influence of regulatory proteins[35]. We observed a significant effect of FAK in modifying the splicing pattern of E1A mRNA in relation to cells that not overexpressed FAK (Fig. 4). FAK overexpression promotes an increase in the 9S and 10S isoforms, concomitantly with a reduction of the 13S isoform formation. A dose response assay performed with increasing amounts of tetracycline confirmed the effect of FAK in the regulation of the isoforms generated from the E1A pre-mRNA (Fig. 4b). To test the specificity of this effect we performed similar assays with HEK293 cells overexpressing

FLAG-tagged α B-crystallin (CryAB), a small heat shock protein (Fig. S2a). Its interactome analysis revealed 47 interactors distributed in the over represented biological pathways by IPA: Cellular Growth and Proliferation; Cell Morphology; Cell Cycle and Protein Folding (Fig. S2b). Next, we tested if α B-crystallin could modulate the pre-RNA splicing using the adenoviral E1A minigene reporter system. No alterations in the pattern of E1A mRNA splicing were observed in α B-crystallin-overexpressing cells (Fig. S2c).

FAK FERM domain interacts with many splicing factors, but is not sufficient for the regulation of splicing

To evaluate whether FAK FERM domain may mediate the effects of FAK in RNA splicing we developed HEK-Flp-In cells overexpressing FLAG-tagged FAK FERM domain and performed a FLAG-FERM-co-immunoprecipitation assay (Fig. 5a,b). FLAG-FERM-interacting proteins were identified using the same criteria used to FAK immunoprecipitation. Among the FAK FERM protein partners we identify 34 proteins involved in the RNA Post-Transcriptional Modifications (Table 3). These proteins encompass 7 serine/arginine (S/R)-rich or S/R-related splicing factors, 4 heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) and 7 associated splicing proteins. In addition, nuclear speckles components, such as SC35[36] (SRSF2) and SF3b155[37] (SF3B1) were also identified in FERM-interactome (Fig.5 c).

Next, we assayed via adenoviral E1A minigene reporter system whether FAK FERM domain is sufficient to modify the splicing pattern of E1A mRNA. As shown in Fig. 5d, the FAK FERM domain alone was not sufficient to alter the E1A minigene splicing.

Table 3. RNA post-transcriptional molecules identified in FERM interactome.

207

ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)	Functions Annotations
CIORP	CIORP	complement component 1 a	Cytonlasm	transcription	Processing and Splicing
сторг	сторг	subcomponent binding	Cytopiasii	regulator	of RNA
DDV17	DDV17	protein	NT 1		D
DDX17	DDX17	box helicase 17	Nucleus	enzyme	unwinding of RNA
DDX21	DDX21	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)	Nucleus	enzyme	unwinding of RNA
DDX5	DDX5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)	Nucleus	enzvme	Processing and
DDIG	DDI	box helicase 5	1 (defedd)	enzyme	maturation of RNA
EFTUD2	EFTUD2	elongation factor Tu GTP	Nucleus	enzyme	Processing and Splicing
THO	FILO	binding domain containing 2	NY 1		of RNA
FUS	FUS	fused in sarcoma	Nucleus	transcription	Processing and Splicing
HNRNPF	HNRNPF	heterogeneous nuclear	Nucleus	other	Processing and Splicing
		ribonucleoprotein F	itueleus	ouler	of RNA
HNRNPK	HNRNPK	heterogeneous nuclear	Nucleus	other	Processing of RNA
		ribonucleoprotein K			
HNRNPU	HNRNPU	heterogeneous nuclear	Nucleus	transporter	Processing of RNA
		ribonucleoprotein U (scatfold			
HNRNPUL1	HNRNPUL1	heterogeneous nuclear	Nucleus	other	Processing of RNA
In did d CEI	Indda o'Ei	ribonucleoprotein U-like 1	itueleus	ouler	
IVNS1ABP	IVNS1ABP	influenza virus NS1A binding	Nucleus	other	Processing and Splicing
		protein			of RNA
MAP3K7	MAP3K7	mitogen-activated protein	Cytoplasm	kinase	Stabilization of RNA
	DARDC1	kinase kinase kinase /	Cutoplasm	translation	Processing
rAbrei	rAbrei	cytoplasmic 1	Cytopiasiii	regulator	polyadenylation and
				10guiner	decapping of RNA
PABPC4	PABPC4	poly(A) binding protein,	Cytoplasm	translation	Processing of RNA
		cytoplasmic 4 (inducible		regulator	
		form)	Maalaaa		Decession onlining and
PRPF19	PRPF19	19	Nucleus	enzyme	formation of
		19			spliceosome
RBMX	RBMX	RNA binding motif protein,	Nucleus	other	Processing and Splicing
		X-linked			of RNA
RPL14	RPL14	ribosomal protein L14	Cytoplasm	other	Processing of RNA
RPL26	RPL26	ribosomal protein L26	Cytoplasm	other	Processing of RNA
RPL35A	RPL35A	ribosomal protein L35a	Cytoplasm	other	Processing of RNA
RPL5	RPL5	ribosomal protein L5	Cytoplasm	other	Processing of RNA
RPL/	RPL7	ribosomal protein L7	Nucleus	regulator	Processing of RNA
RPS16	RPS16	ribosomal protein S16	Cytoplasm	other	Processing of RNA
RPS19	RPS19	ribosomal protein S19	Cytoplasm	other	Processing of RNA
RPS7	RPS7	ribosomal protein S7	Cytoplasm	other	Processing of RNA
SF3B1	SF3B1	splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa	Nucleus	other	Processing and Splicing of RNA
SF3B2	SF3B2	splicing factor 3b, subunit 2, 145kDa	Nucleus	other	Processing and Splicing of RNA
SNRPD2	SNRPD2	small nuclear ribonucleoprotein D2	Nucleus	other	Processing, splicing and formation of

		polypeptide 16.5kDa			spliceosome
SRSF1	SRSF1	serine/arginine-rich splicing	Nucleus	other	Processing and Splicing
		factor 1			of RNA
SRSF2	SRSF2	serine/arginine-rich splicing	Nucleus	transcription	Processing and Splicing
		factor 2		regulator	of RNA
SRSF3	SRSF3	serine/arginine-rich splicing	Nucleus	other	Processing and Splicing
		factor 3			of RNA
SRSF7	SRSF7	serine/arginine-rich splicing	Nucleus	other	Processing and Splicing
		factor 7			of RNA
SRSF9	SRSF9	serine/arginine-rich splicing	Nucleus	enzyme	Processing and Splicing
		factor 9			of RNA
U2AF2	U2AF2	U2 small nuclear RNA	Nucleus	other	Processing and Splicing
		auxiliary factor 2			of RNA

Discussion

There has long been a gap between the well-documented importance of FAK as a regulator of many cellular processes and our knowledge of the molecular mechanisms controlled by FAK. Cellular processes influenced by FAK are mainly dictated through its scaffolding function, in contrast with its catalytic activity, which is associated with only a subset of FAK functions[38]. Therefore, identification of the FAK interactome is a necessary prerequisite for understanding the biological functions of FAK. We performed an AP-MS approach in Flp-In HEK293 cells harboring FAK to identify novel interaction partners of FAK, potentially providing further insights into the function of this multifaceted protein.

We thereby identified a number of FAK copurified proteins in HEK293-FF . Among these were paxillin, HSP90 and TGF β 111, which are known interactors of FAK and were repeatedly identified with a significant number of unique peptides. Interactions of FAK with Paxillin and HSP90 proteins were verified by co-immunoprecipitation assays. The lack of identification of other known FAK binding proteins, especially the focal adhesion proteins, such as integrin, talin and p130Cas may be due to several factors, which include the possibility of paucity the focal adhesions in HEK293 cells and consequently

poor recovery of cytoskeletal and membrane proteins. Given the possibility of falsepositive results we also performed AP-MS with the α B-crystallin, which showed a completely distinct set of interacting proteins as compared to HEK295-FF. Actually, only 8 proteins were found to be common in the IP experiments (5 were ribossomal proteins, ATP5J, GNL3 and MOV10) of anti-Flag-FAK and anti-Flag- α B-Crystallin. Furthermore GO analysis also revealed that cell functions related to the set of proteins precipitated by Flag- α B-Crystallin was distinct of that of Flag-FAK. Distinct from HEK293-FF, the top functions of HEK293- α B-Crystallin were Cellular Growth and Proliferation, Cell Morphology and Cell Cycle (data not shown).

Despite these limitations, our approach revealed novel potential FAK protein partners. We identified 153 proteins that can potentially interact with FAK in HEK295-FF cells. Bioinformatic analysis was performed and visualized by Ingenuity Pathway in order to identify significant biological processes regulated by FAK. The analysis provided evidence that FAK may potentially interact with proteins associated with such diverse function as protein synthesis, cellular structure, molecular transport, cellular growth and proliferation, cell death and survival, and RNA post-transcriptional modification. Among these, we selected RNA post-transcriptional modification for further studies. We detected FAK in association with splicing factors and spliceossome associated proteins, including core proteins: CDC5L, U2AF, PRPF8, PRPF31, SNRP200, SNRP70, SRSF1, SRRM1, SFPQ, SSB, and THRAP3. Further validation was performed by immunoprecipitation of SF2/ASF [SRSF1] protein. Interestingly, FERM domain alone could precipitate a similar set of splicing-related proteins. It should be taken into consideration that we mainly have used co-immunoprecipitation of endogenous proteins to demonstrate interactions.

Associations may therefore not be direct binary interactions but most likely reflects that FAK associates with parts of the complex splicing apparatus. Further studies would be needed to delineate individual binary affinities.

Furthermore, we provide evidence that FAK may act as a splicing regulator. To specify the role of FAK in mRNA processing, we carried out in vivo splicing assays. Our results demonstrate that FAK favors not to use 5' proximal splice sites (13S) in the E1A minigene but, the use of distal 5' splice sites (9S) and stimulates exclusion of exons in E1A gene in vivo splicing assay. These changes are distinct and specific because superexpression of FAK readily results in a rapid increase in the use of distal splice site of E1A[35]. Interestingly, we additionally demonstrated that FAK could interact with SC35 (Fig. 6). Thus, the data of the present study supports the notion that FAK may participate itself directly in alternative splicing modulation or indirectly through interaction with SC35, a bona fide splicing regulator. Further work to understand the mechanism by which FAK regulates pre-mRNA splicing may explain its role in mRNA processing.

Here, as well as in other studies, FAK has been observed as dot-like structures in the cell nucleus [39, 40] Growing evidence points to important roles of nuclear subdomains, not only as storage spaces but also as dynamic structures involved in RNA transcription, processing, and maturation [41, 42]. We showed that FAK partially localizes to nuclear speckles, which are known to be storage places for pre-mRNA splicing complexes. Overall, this agrees with the biochemical and functional data of this study indicating a role for FAK in the regulation of mRNA splicing. In this context, several models may be envisioned for how a signaling molecule like FAK may be able to affect pre-mRNA splicing. The first and most trivial model would be that FAK affects splicing indirectly by causing enhanced or reduced expression of a subset of splicing factors because their genes are targets of

transcription factors regulated by FAK. A second possibility would be that FAK, as part of its activating function, enhances the elongation rate of RNA polymerase II, a change that have been reported to cause alterations in alternative splicing [43]. A third explanation would be that FAK recruits an activator with role in splicing control. A quite different possibility would be to assume that FAK itself operates directly in pre-mRNA processing. Further studies are needed to discriminate between models.

In conclusion, we identify a novel function for FAK in regulating alternative splicing. We further delineate its function with regard to modulation of pre-mRNA alternative splicing in vivo based on its subnuclear speckled distribution pattern and physical interaction with SC35, a SR family splicing protein with functions involved in splicing regulation. Further studies are necessary to dissect the molecular mechanisms underlying the regulatory effect of FAK in pre-mRNA splicing, as well as to unveil its putative endogenous pre-mRNA targets.

Experimental Procedures

Protein cloning and generation of stable cell clones: FAK, FAK FERM domain and α B-crystallin (*Mus musculus*) were cloned into the pcDNA5/FRT plasmid vector using the following primers:

FAK_mm_BamHI:	5' -GGCCGGGGATCCATGGCAGCTGCTTATCTT- 3' and
FAK_mm_NotI:	5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCAGTGTGGCCGTGTCTGCCC-3';
FERM_MmF	5'-CGCGGATCCCATATGGGTGCAATGGAACGAG-3' and
FERM_MmR	5'-CGCAAGCTTGGATCCTCAGTCTTCCTCATCG-3';

212

CryAB_mmF_EcoRI 5'-GCGAATTCCATATGGACATCGCCATCCACCA-3' and CryAB_mmR_XhoI 5'CTCTC GAGCTACTTCTTAGGGGGCTGCGG-3'. The vectors with the constructions were transfected in HEK 293 (Human Embryonic Kidney) FLP-IN (Invitrogen) cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. Positive clones were selected during 3 weeks in DMEM (Gibco-BRL) with 10% FBS (Gibco-BRL) and supplemented with antibiotics (streptomicin/ampicilin, blasticidine and hygromicin) at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. FAK, FAK FERM domain and α B-crystallin overexpression were induced by treatment with 500 ng/mL of tetracycline for 48 hours.

Protein Extraction and co-immunoprecipitation (co-IP): FLP-IN cells were washed in cold PBS and scraped into lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, proteases and phosphatases inhibitors). The samples were centrifuged for 20 min at 16,000 g and equal amounts of protein (500 μ g) were incubated with anti-FLAG M2 Affinity Gel (SIGMA-ALDRICH) or with the appropriated antibody plus 20 μ L of protein A Sepharose beads (GE Healthcare) overnight. The supernatant was collected and beads were washed four times with TBS. FLAG-immunocomplexes were eluted with a high concentration (150 ng/ μ L) of FLAG peptide (SIGMA-ALDRICH) during 2 hours at 4°C and the others co-IPs were resuspended in Laemmli loading buffer (2% SDS, 20% glycerol, 0.04 mg/ml bromophenol blue, 0.12 M Tris·HCl, pH 6.8, and 0.28 M - mercaptoethanol) and pre-heated for 5min at 95°C.

Mass Spectrometric Analysis (MS): Flag-FAK, Flag-FERM and Flag-CryAB associated proteins were reduced (5 mM dithiotreitol, 25 min at 56°C), alkylated (14 mM

iodoacetamide, 30 min at room temperature in the dark), and digested with trypsin (Promega). The peptides were dried in a vacuum concentrator and reconstituted in 20 µL of 0.1% formic acid. 4.5 µL of the resulting peptide mixture was analyzed on an ETD enabled LTO Velos Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) coupled with LC-MS/MS by an EASY-nLC system (Proxeon Biosystem) through a Proxeon nanoelectrospray ion source. Peptides were separated by a 2-90% acetonitrile gradient in 0.1% formic acid using a pre-column EASY-Column (2 cm x ID100 µm, 5 µm particle size) and an analytical column PicoFrit Column (20 cm x ID75 7µm, 5 µm particle size, New objective) at a flow rate of 300 nL/min over 45 min. The nanoelectrospray voltage was set to 2.5 kV and the source temperature was 200°C. All instrument methods for the LTQ Velos Orbitrap were set up in the data dependent acquisition mode. The full scan MS spectra (m/z 300-2,000) were acquired in the Orbitrap analyzer after accumulation to a target value of $1e^{6}$. Resolution in the Orbitrap was set to r = 60,000 and the 20 most intense peptide ions with charge states ≥ 2 were sequentially isolated to a target value of 5,000 and fragmented in the linear ion trap by low-energy CID (normalized collision energy of 35%). The signal threshold for triggering an MS/MS event was set to 1,000 counts. Dynamic exclusion was enabled with an exclusion size list of 500, exclusion duration of 60 s, and repeat count of 1. An activation q=0.25 and activation time of 10 ms were used. Peak lists (msf) were generated from the raw data files using Proteome Discoverer version 1.3 (Thermo Fisher Scientific) with Sequest search engine and searched against Human International Protein Database (IPI) v. 3.86 (91,522 sequences; 36,630,302 residues, release July 2011) with carbamidomethylation (+57.021 Da) as fixed modification, oxidation of methionine (+15.995 Da), as variable modification, one trypsin missed cleavage and a tolerance of 10 ppm for precursor and 1 Da for fragment ions, filtered using xcorr cutoffs (+1>1.8, +2>2.2, +3>2.5 and +4>3.5).

Data analysis and Bioinformatics. Data were processed with Proteome Discoverer using the FDR (False Discovery Rate) of 1%. System biology software Ingenuity (Ingenuity® Systems, <u>www.ingenuity.com</u>) was used to interpret the results.

Western blotting: Cell lysates were centrifuged for 20 min at 16,000 g and the soluble fraction was resuspended in Laemmli loading buffer. NE-PER Cytoplasmic and Nuclear Extraction Kit (Pierce) was used to obtain cytosolic and nuclear fractions according to the manufacture's specifications. Equal amounts of protein (50 µg) from cell lysates were separated by SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose membrane (GE Healthcare) by Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad). The nitrocellulose membrane was blocked with 5% skim milk for 2 h, and incubated with anti-FLAG (1:5000, Sigma), anti-FAK (1:1000,St. Cruz Biotech.), anti-Y397FAK (1:5000, Biosource.), anti-GAPDH (1:1000; St. Cruz Biotech.), anti-SF2 (1:1000, Invitrogen), anti-Hsp90 (1:1000, St. Cruz Biotech.), anti-paxillin (1:1000, St. Cruz Biotech.) or anti-histone H3 (1:1000, St. Cruz Biotech.) specific antibodies in 5% BSA in TBST buffer (10mM Tris, 0.1M NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4) overnight, under agitation. Following incubation with primary antibody, blots were washed three times for 5 min each with TBST buffer and incubated with appropriate horseradish peroxidase-labeled secondary antibodiest (horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG; 1:5000, KPL or rabbit anti-mouse IgG; 1:5000, KPL) in 3% BSA in TBST buffer for 2h at 37°C. Proteins were detected by chemiluminescence with the SuperSignal Chemiluminescense Kit (Pierce) in ImageQuant photo documenter (GE). Quantification of bands was performed using ImageJ (Image Processing and Analysis in JAVA-program/ National Institutes of Health NIH).

Confocal immunofluorescence (IF) microscopy. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde plus 4% sucrose, blocked with 3% BSA plus 0.6% Triton-X 100 at room temperature for 3 min. Then, the cells were incubated with primary antibodies (1:100) in PBS containing 1% BSA overnight at 4 °C. After washing, cells were incubated with Alexa Fluor 488 or 568-conjugated antibodies (1:200, Invitrogen) diluted in PBS containing 1% BSA for 1h. Slides were then mounted with vectashield and the images were obtained with a confocal microscope (Leica TCS SP8).

In vivo splicing assays: Flag-FAK, Flag-FAK FERM and Flag-CryaB HEK293 FLP-IN cells were transiently transfected with the minigene E1A encoding plasmid pMTE1A and treated with tetracycline. Control cells were transfected with the minigene E1A encoding plasmid but not treated with tetracycline. After 48 h of transfection, the cells were resuspended in 1 mL of TRizol reagent (Life Technologies Corporation) for total RNA extraction according to the manufacturer's protocol. cDNA synthesis was performed using oligodT primer (GE Health-8care, Waukesha, WI, USA) and the Super Script II reverse performed primers 5´ transcriptase (Invitrogen). PCRs were with the ATTATCTGCCACGGAAGGTGT-3' (sense) and 5'-GGATAGCAGGCGCCATTTTA-3' (antisense), as previously described (RAFFETSEDER et al, 2003). After separation of the amplification products on 3% agarose gels containing ethidium bromide, the band intensities were calculated using the software Image J (Image Processing and Analysis in
JAVA-program/ National Institutes of Health NIH). The intensities of all isoforms were summed, set as 100%, and used to normalize the intensity of each band.

Statistical Analysis: ANOVA and Bonferroni's post hoc comparison were used to compare the E1A pre mRNA isoforms 13S, 12S, 11S, 10S and 9S in the respective experimental groups. P < 0.05 was considered statistically significant. Data are presented as mean \pm s.e.m. for the indicated number of experiments.

Acknowledges

We thank The Mass Spectrometry Laboratory of National Bioscience Lab (LNBIO) for perfoming the mass spectrometry analyses.

Figure Legends

Figure 1. Characterization of HEK293-FFcells and FAK distribution. (A) Representative FLAG and GAPDH-specific immunoblots from lysates of Hek293-FF cells overexpressing (+tet) or not (-tet) the Flag-FAK construction. (B) Confocal immunofluorescence image of HEK293-FF cells overexpressing Flag-FAK after induction by tetracycline (+tet). The cells were double stained with Flag-specific antibody (green) and rhodamine-conjugated phalloidin (red). Scale bars, 10 μ m. (C) Confocal immunofluorescence image of Hek293-FF cells overexpressing Flag-FAK after induction by tetracycline (+tet) in the nucleus. Arrows show points of FLAG-FAK in the nucleus. The cells were double stained with Flag-specific antibody (green) and rhodamineconjugated phalloidin (red). Scale bars, 10 μ m. (D) Representative FAK and FLAG-

specific immunoblots from cytosolic and nuclear lysates of Hek293-FF cells overexpressing (+tet) or not (-tet) the FLAG-FAK construction. (E) Representative FAK, FLAG, pFAK and GAPDH-specific immunoblots from total lysates of HEK293-FF cells overexpressing (+tet) or not (-tet) the FLAG-FAK construction in three independent experiments. (F) Visualization of Flag-FAK and its interacting partners by SDS-PAGE. Shown are Flag-IPs of cells overexpressing (+tet) or not (negative control; -tet) Flag-FAK. Proteins were resolved by SDS-PAGE and visualized by silver staining.

Figure 2. Identification of FAK-interaction network and validation of FAK partners by co-IP of cell lysates. (A) Co-IP of FAK interactors. Shown are the anti-FAK, -Paxillin, -Hsp90 immunoblots of anti-Flag immunoprecipitates of Flp-In cells extracts. Cells without FAK overexpression (-tet) were used as negative control. (B) Subcellular localization of FAK partners generated by Ingenuity System Pathways® (IPA). (C) Distribution of FAKassociated proteins in functional classes.

Figure 3. Identification of FAK-interaction network by co-IP of cell lysates. (A) Interaction network generated by Ingenuity System Pathways® (IPA) of FAK-associated proteins identified by AP/MS. (B) Co-IP of FAK interactors. Shown are the anti-SF2 immunoblots of anti-Flag immunoprecipitates of Flp-In cells extracts. Cells without FAK overexpression (-tet) were used as negative control.

Figure 4. FAK influences the splicing pattern of the E1A pre-mRNA. (A) *In vivo* splicing assays performed with Flp-In cells transiently transfected with an E1A minigene encoding plasmid. Upper right shown a diagram of the 13S, 12S, 10S and 9S mRNAS

generated from the E1A reporter gene. FAK overexpression (+tet) enhanced the generation of the 9S and 10S isoforms concomitantly with a reduction of the 13S isoform formation. * p < 0.05 versus 9S -tet. # p < 0.05 versus 10S -tet. † p < 0.05 versus 13S -tet. (B) Flp-In cells were transiently transfected with an E1A minigene encoding plasmid and treated with increasing amounts of tetracycline (50ug/ul, 250ug/ul and 500ug/ul). This treatment gradually increases the effect of FAK in the splicing pattern of E1A mRNA. * p < 0.05versus 9S -tet. # p < 0.05 versus 10S -tet. † p < 0.05 versus 13S -tet. The displayed figures are representative of at least three independent experiments. Splicing activity quantization was performed as described in Experimental procedures.

Figure 5. FAK FERM may mediate the interaction of FAK with RNA splicing factors. (**A**) Representative FLAG and GAPDH-specific immunoblots from lysates of Flp-In Flag-FERM cells overexpressing (+tet) or not (-tet) Flag-FERM. (**B**) Visualization of Flag-FERM and its interacting partners by SDS-PAGE. Shown are Flag-IPs of cells overexpressing (+tet) or not (negative control; -tet) Flag-FERM. Proteins were resolved by SDS-PAGE and visualized by silver staining. (**C**) Interaction network generated by Ingenuity System Pathways[®] (IPA) of Flag-FERM partners associated with RNA Post-Transcriptional Modifications. (**D**) *In vivo* splicing assays performed with Flp-In cells transiently transfected with an E1A minigene encoding plasmid. No obvious alterations were observed after FERM overexpression (+tet).

Figure 6. FAK interacts and co-localized with a speckles marker. (A) Flp-In cells overexpressing (+tet) or not (-tet) FAK were double stained with FAK-specific (green) and SC35-specific (red) antibodies and visualized by confocal IF microscopy. Scale bars, 10

 μ m. (**B**) Reciprocal Co-IPs of lysates from Flp-In cells overexpressing (+tet) or not (-tet) FAK or the FAK FERM domain. FAK and its FERM domain were able to interact with SC35.

REFERENCES

- 1. Schaller, M.D., Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 7): p. 1007-13.
- 2. Ilic, D., et al., *Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice*. Nature, 1995. **377**(6549): p. 539-44.
- 3. Peng, X. and J.L. Guan, *Focal adhesion kinase: from in vitro studies to functional analyses in vivo*. Curr Protein Pept Sci, 2011. **12**(1): p. 52-67.
- 4. Franchini, K.G., *Focal adhesion kinase -- the basis of local hypertrophic signaling domains*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **52**(2): p. 485-92.
- Lietha, D., et al., *Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase*. Cell, 2007. 129(6): p. 1177-87.
- 6. Schaller, M.D., et al., Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. Mol Cell Biol, 1994. 14(3): p. 1680-8.
- Thomas, J.W., et al., SH2- and SH3-mediated interactions between focal adhesion kinase and Src. J Biol Chem, 1998. 273(1): p. 577-83.
- Schlaepfer, D.D., C.R. Hauck, and D.J. Sieg, *Signaling through focal adhesion kinase*. Prog Biophys Mol Biol, 1999. **71**(3-4): p. 435-78.
- Brown, M.C. and C.E. Turner, *Paxillin: adapting to change*. Physiol Rev, 2004.
 84(4): p. 1315-39.
- Brown, M.T., et al., ASAP1, a phospholipid-dependent arf GTPase-activating protein that associates with and is phosphorylated by Src. Mol Cell Biol, 1998.
 18(12): p. 7038-51.

- Rossman, K.L., C.J. Der, and J. Sondek, *GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. 6(2): p. 167-80.
- 12. Chang, F., et al., *FAK potentiates Rac1 activation and localization to matrix adhesion sites: a role for betaPIX.* Mol Biol Cell, 2007. **18**(1): p. 253-64.
- Schlaepfer, D.D., et al., Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. Nature, 1994. 372(6508): p. 786-91.
- Hall, J.E., W. Fu, and M.D. Schaller, *Focal adhesion kinase: exploring Fak* structure to gain insight into function. Int Rev Cell Mol Biol, 2011. 288: p. 185-225.
- Cai, X., et al., Spatial and temporal regulation of focal adhesion kinase activity in living cells. Mol Cell Biol, 2008. 28(1): p. 201-14.
- 16. Lim, S.T., et al., *Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation*. Mol Cell, 2008. **29**(1): p. 9-22.
- 17. Santos, A.M., et al., *FERM domain interaction with myosin negatively regulates FAK in cardiomyocyte hypertrophy.* Nat Chem Biol, 2012. **8**(1): p. 102-10.
- Sieg, D.J., et al., FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. Nat Cell Biol, 2000. 2(5): p. 249-56.
- 19. Golubovskaya, V.M., R. Finch, and W.G. Cance, *Direct interaction of the Nterminal domain of focal adhesion kinase with the N-terminal transactivation domain of p53.* J Biol Chem, 2005. **280**(26): p. 25008-21.
- 20. Scheswohl, D.M., et al., *Multiple paxillin binding sites regulate FAK function*.Journal of Molecular Signaling, 2008. 3(1): p. 1-11.
- Thomas, J.W., et al., *The role of focal adhesion kinase binding in the regulation of tyrosine phosphorylation of paxillin*. Journal of Biological Chemistry, 1999. 274: p. 36684-36692.
- 22. Taipale, M., et al., *Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition.* Cell, 2012. **150**(5): p. 987-1001.
- 23. Fujita, H., et al., Interaction of Hic-5, A senescence-related protein, with focal adhesion kinase. J Biol Chem, 1998. 273(41): p. 26516-21.

- Nishiya, N., et al., *Hic-5-reduced cell spreading on fibronectin: competitive effects between paxillin and Hic-5 through interaction with focal adhesion kinase.* Molecular Cell Biology, 2001. 21(16): p. 5332-5345.
- 25. Turner, C.E., *Paxillin and focal adhesion signaling*. Nature Cell Biology, 2000.
 2(12): p. E231-236.
- Flandrin-Gresta, P., et al., Heat Shock Protein 90 is overexpressed in high-risk myelodysplastic syndromes and associated with higher expression and activation of Focal Adhesion Kinase. Oncotarget, 2012. 3(10): p. 1158-68.
- 27. Matsuki, H., et al., *Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation*.Genes Cells, 2013. 18(2): p. 135-46.
- 28. Plocinik, R.M., et al., *Regulating SR protein phosphorylation through regions outside the kinase domain of SRPK1*. J Mol Biol, 2011. **410**(1): p. 131-45.
- Chen, M. and J.L. Manley, *Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009. 10(11): p. 741-754.
- 30. Zhong, X., et al., SR Proteins in Vertical Integration of Gene Expression from Transcription to RNA Processing to Translation. Molecular Cell, 2009. 35(1): p. 1-10.
- 31. Chaudhury, A., P. Chander, and P.H. Howe, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. RNA, 2010. 16: p. 1449-1462.
- 32. Wahl, M.C., C.L. Will, and R. Lührmann, *The Spliceossome: design principles of a dynamic RNP machine*. Cell, 2009. **136**: p. 701-718.
- Twyffels, L., C. Gueydan, and V. Kruys, *Shuttling SR proteins: more than splicing factors*. FEBS Journal, 2011. 278: p. 3246-3255.
- 34. Stephens, C. and E. Harlow, *Differential splicing yields novel adenovirus 5 E1A mRNAs that encodes 30 kd and 35 kd proteins*. The EMBO Journal, 1987. **6**(7): p. 2027-2035.
- 35. Cáceres, J.F., et al., *Regulation of Alternative Splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors*. Science, 1994. **265**: p. 1706-1709.

- Spector, D.L. and A.I. Lamond, *Nuclear Speckles*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2010. 3(2): p. 1-12.
- 37. Girard, C., et al., *Post-transcriptional spliceosomes are retained in nuclear speckles until splicing completion*. Nature Communications, 2012. **3**(994): p. 1-12.
- 38. Arold, S.T., *How focal adhesion kinase achieves regulation by linking ligand binding, localization and action.* Current Opinion in Structural Biology, 2011.
 21: p. 808-813.
- 39. Yi, X.P., et al., *Subcellular Redistribution of Focal Adhesion Kinase and Its Related Nonkinase in Hypertrophic Myocardium.* Hypertension, 2003. **41**: p. 1317-1323.
- 40. Senyo, S.E., Y.E. Koshman, and B. Russell, *Stimulus interval, rate and direction differentially regulate phosphorylation for mechanotransduction in neonatal cardiac myocytes.* FEBS Letters, 2007. **581**: p. 4241-4247.
- 41. Dirks, R.W., E.S. Pauw, and A.K. Raap, *Splicing factors associate with nuclear HCMV-IE transcripts after transcriptional activation of the gene, but dissociate upon transcription inhibition: evidence for a dynamic organization of splicing factors.* Journal of Cell Science, 1997. **110**: p. 515-522.
- 42. Bregman, D.B., et al., *Transcription-dependent redistribution of the large subunit of RNA polymerase II to discrete nuclear domains*. The Journal of Cell Biology, 1995.
 129(2): p. 287-298.
- 43. IP, J.Y., et al., *Global impact of RNA polymerase II elongation inhibition on alternative splicing regulation.* Genome Research, 2011. **21**: p. 390-401.



224



B Subcellular localization





APÊNDICES

```
FIGURE 3.
```

В



RNA post-Transcriptional and Modifications



FIGURE 4.



APÊNDICES



FIGURE 5.



229