

PATRÍCIA CRISTINA RODRIGUES

**INVESTIGAÇÃO FUNCIONAL DE ANKHD1 NAS
NEOPLASIAS MALIGNAS**



UNICAMP

Campinas

2010

PATRÍCIA CRISTINA RODRIGUES

**INVESTIGAÇÃO FUNCIONAL DE ANKHD1 NAS
NEOPLASIAS MALIGNAS**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para Obtenção do título de Doutor
em Fisiopatologia Médica, Área de Concentração
Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do
Desenvolvimento.*

Orientadora: Sara Teresinha Olalla Saad

Campinas

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

R618i Rodrigues, Patrícia Cristina
Investigação funcional de ANKHD1 nas neoplasias malignas /
Patrícia Cristina Rodrigues. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador : Sara Teresinha Olalla Saad
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Apoptose. 2. Transfecção. 3. Leucemia. I. Saad, Sara
Teresinha Olalla. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Functional investigation of ANKHD1 in malignant
neoplasms**

Keywords: • Apoptosis
• Transfection
• Leukemia

Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica

Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular

Banca examinadora:

Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad

Prof. Dr. José Andrés Yunes

Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

Prof. Dr. Serge Benichou

Profa. Dra. Gisele Wally Braga Colleoni

Data da defesa: 26-02-2010

Banca examinadora da tese de Doutorado

Patricia Cristina Rodrigues

Orientador(a) : Prof(a). Dr(a). Sara Teresinha Olalla Saad

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Sara Teresinha Olalla Saad

2. Prof(a). Dr(a). José Andres Yunes

3. Prof(a). Dr(a). Licio Augusto Velloso

4. Prof(a). Dr(a). Serge Benichou

5. Prof(a). Dr(a). Gisele Wally Braga Colleoni

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26/02/2010

Dedicatória

Dedico este trabalho especialmente ao meu pai, que não se conformou com a idéia de ver alguém desistindo de seu sonho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antônio e Gerci por terem sempre reconhecido e compreendido que eu era uma criança com necessidade de explorar o mundo e pela liberdade responsável com a qual me ensinaram a fazê-lo.

Aos meus irmãos Renata e Marco Aurélio por torcerem por mim à distância e sobretudo por compreenderem minhas muitas ausências em momentos tão importantes das suas vidas.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Sara Saad por sua orientação na realização deste trabalho e em especial pela confiança em três momentos decisivos deste trabalho: no início quando me deixou ficar, depois quando me deixou sair e agora no final, pelas apaixonadas discussões científicas que ajudaram a tornar este trabalho ainda melhor. Seu exemplo de dinamismo e prontidão eu vou levar comigo.

Ao meu amigo e orientador espiritual Pe Raniéri Araújo, sj, pai amoroso, pela constante preocupação comigo e pelos valorosos conselhos: Regra de ouro “na tristeza, não mude o caminho, faça o caminho ao caminhar”.

Ao Prof. Dr. Serge Benichou pelo espírito aberto e generoso com que me acolheu no seu laboratório do Institute Cochin (Université Paris V, René Descartes) pelos diversos insights científicos que permitiram novas abordagens a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Andrés Yunes, meu eterno mestre, pelos conselhos de trabalho e de vida.

Ao Prof Dr. Lício Augusto Veloso pelas críticas na qualificação e defesa e a pela gentileza científica com que sempre as faz.

A Prof Dr^a Gisele Colleoni por ter aceitado vir de São Paulo para minha banca, num período de tanta instabilidade climática, e principalmente pelas sensibilidade com que percebeu as desafios da execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Vassalo pelas valorosas críticas feitas na minha qualificação e pela disponibilidade com que aceitou o convite.

A Dr^a. Adriana da Silva Santos Duarte por ter sido a primeira a me acolher no laboratório, por toda a experiência partilhada na cultura de células e pela leitura atenta e crítica deste manuscrito.

A Prof. Dr^a. Sheila Winnischofer pela amizade e apoio no início desta tese, pelos valiosos conhecimentos científicos que partilhou comigo num momento tão decisivo como foi o que nos conhecemos.

A Dr^a. Fabíola Traina por todo o conhecimento sobre a ANKHD1, hematologia e metodologia científica partilhados e pelas críticas que muito ajudaram a me nortear em diversos momentos deste trabalho.

A Dr^a. Dulcinéia Albuquerque por ter me iniciado no mundo do Real time e pela boa vontade e eficiência com que sempre ajuda todo mundo.

A Priscilla Maidou–Pendara, mon ange gardian, que acompanhou meus passos iniciantes no laboratório do Institute Cochin. Exemplo de disciplina e profissionalismo que vou sempre levar comigo.

A companheira Mariana Lazarini por fazer meu cotidiano mais agradável e humano e pelas inúmeras discussões científicas tão enriquecedoras.

A Brigitte Chanaud e Pierre Bourdoncle por me iniciarem no mundo do FACS e da microscopia confocal e por partilharem um pouco da sua expertise comigo.

Aos amigos do laboratório do Institute Cochin Jérôme Bouchet, Sthepan Basmaciogullari, Rania Ghossoub, Anahi Molla, Anthony Hevenneu, Christelle Brégnard, Ghania Ramdani e Marie Chaussepied por terem me acolhido com curiosidade e coração aberto.

Aos alunos e equipe de trabalho da Dr^a. Sara: Carolina Bigarela, Mariana Barati, Maria Teresa, Luciene Borges, João Agostinho, Letícia Archangelo, Daniela Crossara, Claudia Bandeira, Pedro Bordeaux, Thiago Borsoi, Patrícia Favaro e em especial a Tereza Sales. Agradeço a todos vocês pelas inúmeras ajudas e ensinamentos adquiridos e pela convivência que ao longo destes anos permitiu nos conhecermos profundamente.

Aos meus amigos da CVX e agregados : Sérgio Sakai, Anali Furquim, Flávia Fuchs, Marlene, Alessandro Vila, Érica e Gabriel Hornink, Juliana Leite, Lucas Ribeiro, Karina

Hymno, Joseane Carina e Felipe Massia, que sempre estiveram lá para ser minha família em Campinas em momentos difíceis e alegres.

Aos meus amigos do grupo de dança, estes dançarinos e pesquisadores das mais diversas áreas: Alberto Moureau, Sílvia D'alboit, Mariana Constantino, Rafael Dias Santos, Kívia Amadei, Stanislau Jr, Giuliana Ciola, Aldenir Antunes, com os quais eu pude desfocar a minha mente por alguns instantes no prazer da dança, para depois retornar com novo ânimo.

Agradeço aos meus amigos de república com quem morei nestes últimos anos e que acabaram sendo testemunhas do meu envolvimento com o trabalho: Sílvia D'alboit, Sérgio Sakai, Bianca Ayres, Emerson Yoshio, Nelson Uto e Márcia Hoffmann

À agência financiadora FAPESP pela bolsa de doutorado.

À agência financiadora Capes pelo financiamento durante o sanduíche em Paris.

E finalmente, agradeço sobretudo a Deus que me deu forças, sabedoria e alegria para concluir este trabalho.

*só vejo que os passos
cada um encontra os seus,
mesmo sem saber da infinitude
vazia do chão que,

se existe,
acontece no breve farfar seguinte
do passo dado, já foi...
e o chão se apresenta ...
e o precipício caminha logo adiante
do pouco de sola que sempre
e ainda
me resta.*

Marnen Carvalho

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ix
LISTA DE ABREVIACÕES	xxiii
<i>LISTA DE TABELAS</i>	xxv
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	xxvii
RESUMO... ..	xxxix
ABSTRACT	xxxvii
INTRODUÇÃO.....	43
1.0 Desordens Hematológicas e a busca de novos genes alvo.	45
1.1 Citoesqueleto e Domínio Anquirina.....	47
1.2 A proteína ANKHD1.....	50
1.3 A proteína SHP2 e sua interação com ANKHD1	54
1.4 A proteína Siva e sua interação com ANKHD1	56
1.5 A proteína Vpr e sua interação com ANKHD1	57
1.6 Hipótese do trabalho.....	60
OBJETIVOS.....	63
2.0 Objetivo geral	65
2.1 Objetivos específicos.....	65
MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
3.0 Casuística e Linhagens Celulares	69
3.1 Células hematopoéticas de pacientes com diagnóstico de Leucemia Aguda	69
3.2 Exames para diagnóstico de Leucemia Aguda	69
3.3 Células hematopoéticas normais	71
3.4 Células hematopoéticas de pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica.....	71
3.5 Linhagens celulares	71
3.6 Tratamento com drogas	72
3.7 RNA de interferência.....	72
3.8 Extração do RNA total	73
3.9 Tratamento do RNA total com DNase I.....	73

3.10	Transcrição em cDNA.....	74
3.11	PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	74
3.12	<i>Western Blotting</i>	76
3.13	<i>Microarray</i> da Inibição de ANKHD1.	77
3.14	Crerios usados na escolha dos genes validados.	78
3.15	Hiperexpresso de ANKHD1 isoforma 1 e 2.....	78
3.16	Microscopia de Fluorescncia	80
3.17	Estudo da apoptose	80
3.18	Anlise Estatstica	81
	RESULTADOS	83
4.1	Inibio de ANKHD1 e anlise microarray	85
4.1.1	Inibio de ANKHD1 em LNCaP :.....	85
4.1.2-	Anlise da Expresso gnica global ps inibio de ANKHD1.	86
4.1.2-	Validao do microarray por qPCR.....	95
4.1.3	Validao do array em amostras de portadores de leucemia aguda.	97
4.2	Hiperexpresso de ANKHD1 em linhagens tumorais.....	100
4.2.1	Localizao subcelular das isoformas de ANKHD1.....	101
4.2.2-	Avaliao do efeito de Siva e Vpr na expresso proteica de ANKHD1 isoforma 1	104
4.2.3-	Avaliao do efeito de Vpr na expresso proteica de isoforma 2 de ANKHD1... ..	109
4.2.4	Localizao de ANKHD1 isoformas 1 e 2 co-transfectadas com Vpr:GFP.....	111
4.2.5	Ensaio funcional de apoptose.	113
4.3	Expresso de ANKHD1 em clulas hematopoiticas submetidas a agentes teraputicos.....	116
4.3.1	Tratamento com Interferon α	116
4.3.2	Tratamento com Talidomida	118
4.3.3	Cclulas de pacientes de SMD tratadas com Decitabina	120
4.3.4	Tratamento com drogas indutoras de apoptose: Daunorubicina e Metotrexate	122
	DISCUSSO	127
	CONCLUSOES	141
	REFERNCIAS BIBLIOGRFICAS	145

ANEXOS	157
Anexo I.....	159
Anexo II.....	162
APÊNDICES	165
Apêndice I	167
Apêndice II	169

LISTA DE ABREVIACÕES

ANKHD1 – *Ankyrin Repeat Single KH Domain containing 1*
EIF4EBP3 – *Eukaryotic Initiation Factor 4E-Binding-Protein 3*
BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*
cDNA – *complementary DNA*
DNA – *Desoxiribonucleic Acid*
EST – *Expression Sequence Tags*
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
ORESTES – *Open Reading frame ESTs*
Mask- *Multiple Ankyrin repeat and single KH domain*
Csw – *tirosina fosfatase Corkscrew*
FAB – *French-American-British*
HA – *Hemagglutinin*
hMASK – *Human Mask*
KH – *K homology domain*
LLA – *Leucemia Linfóide Aguda*
LMA – *Leucemia Mielóide Aguda*
SMD-*Síndrome Mielodisplásica*
LMC – *Leucemia Mielóide Crônica*
LMMJ – *Leucemia mielomonocítica juvenil*
PE – *Phycoeritrine*
RNA – *Ribonucleic Acid*
RNAm- *RNA mensageiro*
RNAi – *RNA interference*
qPCR – *Reverse transcription quantitative PCR*
DDB1-Cul4A- *Complexo de ubiquitina ligase cullin 4^a*
DCAF1- *DDB1-Cul4A-Associated Factor 1*
ATR- *Ataxia and Telangiectasia-mutated and Rad3 related protein*
BMF- *Bcl2-modifying factor*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pacientes com diagnóstico de Leucemia Aguda.	70
Tabela 2: Pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica	71
Tabela 3: Seqüências dos primers utilizados na amplificação dos genes estudados por PCR quantitativo em tempo real (qPCR).	75
Tabela 4: Principais redes de atuação associadas à inibição de ANKHD1 segundo o Ingenuity Pathway analysis.	91
Tabela 5: Genes relacionados às principais vias moduladas pela inibição de ANKHD1.	94
Tabela 6: Seqüência de aminoácidos de sinal nuclear (NLS) encontradas em ANKHD1 isoforma 1.	103
Tabela 7 :Dados clínicos dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda.	167
Tabela 8 : Primers utilizados na validação do array	169

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da seqüência genômica do gene <i>ANKHD1</i>	51
Figura 2: Representação esquemática da estrutura protéica primária de ANKHD1, de suas isoformas e da fusão ANKHD1- EIF4EBP3.....	52
Figura 3: Representação esquemática da ativação de SHP2	55
Figura 4: Representação esquemática da atuação de Siva via CD27.....	57
Figura 5 Modelo molecular das atividades citostática e pró-apoptótica de Vpr	59
Figura 6: Mapa dos vetores utilizados neste trabalho	79
Figura 7. Análise da inibição de ANKHD1 em LNCaP através de siRNA	85
Figura 8: Reprodutibilidade de dados de microarrays:.....	87
Figura 9: Perfil de alteração da expressão gênica global da inibição de ANKHD1.....	87
Figura 10: Número de genes supra-regulados com a inibição de ANKHD1, organizados em classes funcionais	88
Figura 11: Número de genes sub-regulados com a inibição de ANKHD1, organizados em classes funcionais,	89
Figura 12 –Vias de sinalização ativadas em células LNCaP submetidas à inibição de ANKHD1.....	91
Figura 13: Perspectiva das principais vias de sinalização cuja expressão gênica foi alterada pela inibição de ANKHD1	92
Figura 14: Validação do Codelink array por qPCR.....	96
Figura 15 : Expressão do RNAm das isoformas 1 e 2 de ANKHD1 em células leucêmicas de pacientes.	98
Figura 16: Expressão do RNAm de BMF em células leucêmicas de pacientes.....	99
Figura 17: Imunolocalização fluorescente da isoforma 1 de ANKHD1 hiperexpressa em células HeLa	101
Figura 18: Imunolocalização fluorescente da isoforma 2 de ANKHD1 hiperexpressa em células HeLa.	102
Figura 19: Presença de um sinal de exportação nuclear na isoforma 1 de ANKHD1. A presença da NES está indicada pelo pico vermelho acima do threshold no gráfico. A última posição hidrofóbica da NES encontrada está no aminoácido 1437 de ANKHD1 isoforma 1 (Leucina). (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/).....	104

Figura 20: Western Blotting da Contransfecção de ANKHD1 e Siva em células HEK 293T	105
Figura 21: Western Blotting da Co-transfecção de ANKHD1 e VprHA em células HEK 293T.....	107
Figura 22: Western Blotting de células HEK 293T transfectadas com ANKHD1 isoforma 2 e Vpr HA	109
Figura 23: Imunolocalização fluorescente de Vpr em presença de ANKHD1 isoforma 1	111
Figura 24: Imunolocalização fluorescente de Vpr em presença de ANKHD1 isoforma 2	112
Figura 25: Taxas de apoptose celular em Jurkat após eletroporação e tratamento com camptotecina.....	114
Figura 26: Taxas de apoptose celular após hiperexpressão de ANKHD1 isoforma 2 e Siva-GFP em Jurkat	115
Figure 27. Efeito de Interferon α na expressão de ANKHD1 em linhagens leucêmicas ...	118
Figure 28. Efeito de talidomida na expressão de ANKHD1 em linhagens de leucêmicas.	120
Figura 29: Análise da expressão relativa de ANKHD1 em amostras de pacientes com SMD tratados com decitabina.	121
Figura 30. Expressão de ANKHD1 em linhagens leucêmicas tratadas com indutores de apoptose.....	124
Figura 31: Modelo proposto do bloqueio da função anti-apoptótica da ANKHD1 através de sua associação com Vpr.....	132
Figura 32: Genes supra-regulados no microarray de ANKHD1 contidos na via de sinalização de Interferon.....	136

RESUMO

A proteína humana ANKHD1 (Ankyrin Repeat Single KH Domain containing 1) foi inicialmente descrita em células de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP), e sua expressão também é observada em diversas linhagens leucêmicas.

ANKHD1 é homóloga a proteína Mask (Multiple Ankyrin repeat and single KH domain) de *Drosophila melanogaster*, relacionada com diferenciação, sobrevivência e proliferação de fotorreceptores dos olhos de drosófila.

Interações diretas entre ANKHD1 e SHP2, proteína que exerce um papel crítico na hematopoiese, foram descritas nas linhagens mielóide K562, de adenocarcinoma de próstata, LNCaP, e em linhagem de mieloma múltiplo RPM1 8226. Porém pouco se sabe sobre a função de ANKDH1 e seu papel na leucemogênese.

O objetivo do presente estudo foi investigar o envolvimento da ANKHD1 em processos biológicos relacionados com a leucemogênese

Para tal utilizamos duas abordagens metodológicas principais: inibição e hiperexpressão de *ANKHDI*.

A inibição de *ANKHDI* em linhagem LNCaP foi seguida de rastreamento das demais alterações gênicas associadas através de microarray. O microarray realizado mostrou 706 genes cuja expressão foi aumentada e 159 genes cuja expressão foi diminuída. Os genes foram agrupados em 26 classes funcionais, sendo que diversos genes conhecidos por regularem ciclo celular e apoptose tiveram seu perfil de expressão alterada. Importante ressaltar que a inibição de *ANKHDI* resultou em aumento significativo da expressão de um grande número de Histonas, sugerindo seu papel no controle epigenético. Dentre as modulações validadas, algumas foram verificadas também em amostras provenientes de portadores de leucemia.

Neste estudo, foi demonstrada a baixa expressão gênica de *ANKHD1* em amostras de 38 pacientes com diagnóstico de leucemia aguda, quando comparadas às células de medula óssea normal. Uma vez que esta amostra leucêmica se mostrou como um modelo natural de inibição de *ANKHD1*, a expressão de outros genes modulados no array foi testada, e o gene *BMF*, que se mostrou aumentado no array, se mostrou também mais expresso em amostras de leucemias, confirmando a oposição de expressão destes dois genes.

Simultaneamente, células de leucemia aguda e mielodisplasia foram submetidas à ação de diversas drogas usadas no tratamento dessas doenças mostrando aumento de expressão de *ANKHD1*. Estes dados em conjunto com os observados no microarray sugerem a participação da *ANKHD1* na via de JAK/STAT1 e vias de controle epigenético.

A segunda abordagem utilizada neste trabalho foi a hiperexpressão *ANKHD1*, isoformas 1 e 2, em linhagens tumorais, seguidas da detecção de expressão protéica de *ANKHD1* em cotransfecção com os genes *Siva* e *Vpr*. As proteínas *Siva* e *Vpr* foram recentemente descritas como capazes de interagir fisicamente com as isoformas 1 e 2 de *ANKHD1* respectivamente. Tanto a proteína a *Siva* quanto a *Vpr* foram atribuídos papéis de indução de apoptose em linfócitos T.

Observou-se que ao cotransfectarmos *Siva* ou *Vpr* com *ANKHD1* houve diminuição de expressão de *ANKHD1* tanto para a isoforma 1 quanto para isoforma 2 (western blotting) e também se observou que a isoforma 1 de *ANKHD1* é citoplasmática assim como ocorre com a *Mask* de drosófila, porém a isoforma 2 se mostrou predominantemente nuclear em microscopia de fluorescência.

A análise funcional da hiperexpressão de *ANKHD1* seguida de análise por FACS sugere diminuição de apoptose em células leucêmicas.

Em conclusão, o presente estudo identificou diversos possíveis participantes da via de sinalização de ANKHD1 por análise microarray, relatou a diminuição da sua expressão em amostras de pacientes portadores de leucemia, bem como o aumento de sua expressão em linhagens leucêmicas sob a ação de diversos tratamentos correntemente utilizados no combate de desordens hematopoiéticas. Descrevemos também o aumento de expressão da expressão do gene *BMF* nas mesmas amostras em que há diminuição de ANKHD1, corroborando os dados encontrados no microarray da inibição de ANKHD1. Descrevemos também pela primeira vez a localização nuclear da isoforma 2 de ANKHD1, confirmando todas as previsões computacionais de localização de ANKHD1.

Os resultados aqui descritos sugerem que ANKHD1 esteja envolvida com o fenótipo anormal da célula leucêmica e permitirão direcionar novos estudos com o objetivo de melhor elucidar as funções específicas de ANKHD1 na hematopoiese.

ABSTRACT

The human protein ANKHD1 (Ankyrin Repeat Single KH Domain containing 1) was initially described in Human prostate adenocarcinoma cells (LNCaP), and can also be expressed in many different leukemic cell lines.

ANKHD1 is homologous to the *Drosophila melanogaster* Mask protein (Multiple Ankyrin repeat and single KH domain), related to differentiation, proliferation and survival in photoreceptors of *Drosophila* eyes.

Direct interactions between ANKHD1 and SHP2, a protein that plays a critical role in hematopoiesis, have been described in the myeloid cell line K562, in prostate adenocarcinoma, LNCaP, and in multiple myeloma cell line RPM1 8226. Nevertheless, little is known of the function of ANKDH1 and its role in leukemogenesis.

The purpose of this work was to investigate the involvement of ANKHD1 in biological processes related to leukemogenesis

For this purpose, we used two main methodological approaches: ANKHD1 inhibition and overexpression.

The inhibition of ANKHD1 in LNCaP cell lines was followed by the tracking through microarray of the remaining associated genetic alterations. Microarray revealed 706 genes with upregulated expression and 159 genes with downregulated expression; the genes were gathered in 26 functional groups and many genes, known for regulating cell cycle and apoptosis, had alterations in their expression profile. Importantly, inhibition of ANKHD1 resulted in significant increase in the expression of a large number of Histones, suggesting its role in epigenetic control. Among the validated modulations, some were also observed in the samples collected from leukemia patients.

In this study, the downregulation of ANKHD1 was demonstrated in samples collected from 38 acute leukemia patients when compared to normal bone marrow cells. As this leukemic sample represented a natural model of inhibition of ANKHD1, the expression of other genes processed through array were tested, and the *BMF* gene, which was upregulated in the array, was also more elevated in leukemia samples.

Simultaneously, cells of acute leukemia and myelodysplasia were subjected to the action of various drugs used to treat these diseases showing increased expression of ANKHD1. These data together with those observed in the microarray suggest the participation of ANKHD1 towards JAK/STAT1 and pathways of epigenetic control.

The second approach used in this work was the ANKHD1 overexpression, isoforms 1 and 2, in tumor lines, followed by the detection of protein expression in cotransfection with Siva and Vpr genes. The proteins Siva and Vpr have been recently described as being capable of physical interaction with the isoforms 1 and 2 of ANKHD1, respectively. The role of inducing apoptosis in T lymphocytes was attributed to both Siva and Vpr.

By cotransfecting Siva and Vpr with ANKHD1 a reduction of ANKHD1 expression to isoform 1 as well as to isoform 2 (western blotting) was obtained and isoform 1 of ANKHD1 was observed to be cytoplasmatic, such as occurs with drosophila Mask, although isoform 2 happened to be predominantly nuclear in the fluorescence microscope.

Functional analysis of overexpression of ANKHD1 followed by FACS analysis suggests reduction of apoptosis in leukemic cells

Finally, this study identified many possible participants in the signaling pathway of ANKHD1 by microarray analysis, and related the reduction of its expression in leukemia patients, as well as the increasing of its expression in leukemic cell lines under the effect of many different treatments currently used against hematopoietic disorders. We also

described the increasing of *BMF* expression in the same samples where we found a reduction of ANKHD1, corroborating all the data we obtained from the ANKHD1 inhibition microarray. In addition, we described, for the first time, the nuclear location of ANKHD1's isoform 2, confirming all the computer-aided predictions regarding the location of ANKHD1.

The results herein described suggest that ANKHD1 could be involved with the abnormal phenotype of leukemic cells and these results could guide further studies towards elucidating the specific functions of ANKHD1 in hematopoiesis.

INTRODUÇÃO

1.0 Desordens Hematológicas e a busca de novos genes alvo.

O processo originário das neoplasias é resultado de mutações ou alterações epigenéticas no genoma de células somáticas (Martinez-Climent et al., 2006; Testa e Riccioni, 2007), as quais exercem seus efeitos através de mudanças nas funções protéicas. A origem das leucemias, em especial, é bastante complexa, sendo comumente associada a sucessivas alterações genéticas que conduzem a transformação neoplásica, tendo como características canônicas o aumento de proliferação celular e inibição da apoptose (Jagani e Khosravi-Far, 2008).

As síndromes mielodisplásicas (SMD) compreendem um grupo de distúrbios hematológicos caracterizado por citopenias, hematopoiese ineficaz e medula óssea geralmente hipercelular (Lorand-Metze e Magalhães, 2004). A origem das síndromes mielodisplásicas envolve também mecanismos genéticos (perda ou multiplicação de material genético e alterações estruturais), e epigenéticos (hipermetilação do DNA) (Hellstrom-Lindberg e Malcovati, 2008; Hopfer et al., 2007; Jadersten e Hellstrom-Lindberg, 2009; Nolte e Hofmann, 2008).

A mielodisplasia é uma das doenças hematológicas mais comuns do idoso, atingindo 25 a 50 000 por ano em 100 000 habitantes acima de 60 anos de idade (Gilliland and List, 2009) e até o momento, não há tratamentos eficazes para cura nem das leucemias agudas e nem das mielodisplasias.

Em muitos casos, a leucemogênese, ocorre devido a ativação aberrante de vias de sinalização envolvendo quinases, tornando as células capazes de se multiplicar de maneira autônoma (Dash e Gilliland, 2001). Já nas SMD ocorre excessiva apoptose intramedular, sendo este um dos mecanismos implicados na hematopoiese ineficaz observada nesse grupo

de doenças. As taxas de morte celular são mais pronunciadas nos estágios iniciais da doença do que nos estágios mais avançados, e a progressão das SMD para leucemia mielóide aguda, fenômeno freqüente, é acompanhada por redução na apoptose e bloqueio na diferenciação mielóide. No entanto vias de sinalização celular que desencadeiam a apoptose nas SMD ainda são pouco conhecidas (Braun et al., 2006; Claessens et al., 2002; Yamamoto et al., 2004).

Afim de melhor compreender o processo fisiopatológico destas desordens hematológicas e talvez no futuro bloquear estes processos anômalos de replicação e diferenciação celular é importante identificar e caracterizar novos genes ativos no processo.

Uma abordagem freqüentemente utilizada na identificação de novos genes é a análise de bibliotecas gênicas de neoplasias permitindo a identificação de novas *Expression Sequence Tags* (ESTs) diferencialmente expressas (Brentani et al., 2003). O Projeto Genoma Humano do Câncer, desenvolvido pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo e Instituto Ludwig, realizou o seqüenciamento de ESTs de tecidos humanos neoplásicos através de uma estratégia denominada *Open Reading Frame* ESTs (ORESTES), que gerava seqüências localizadas na região central dos transcritos (Brentani et al., 2003). O objetivo deste Projeto Genoma foi identificar novos genes de forma a suscitar descobertas e hipóteses que poderiam acelerar o conhecimento necessário para melhorar o diagnóstico, tratamento e entendimento do câncer em humanos. A era pós-genoma busca as funções biológicas de cada proteína codificada pelos novos genes descritos e pretende melhorar o entendimento dos processos celulares que ocorrem em diferentes organismos.

Com o objetivo de estudar novas proteínas do citoesqueleto relacionadas às neoplasias, uma EST com similaridade à proteína anquirina do citoesqueleto de espectrina,

identificada em neoplasia de cólon, foi selecionada a partir das informações geradas pelo Projeto Genoma Humano do Câncer. Utilizando-se programas de análise por similaridade disponibilizados pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) identificou-se a proteína humana denominada *Ankyrin Repeat Single KH Domain containing 1* (ANKHD1) (número de acesso NP_060217.1), inicialmente denominada *Human Multiple Ankyrin repeat and single KH domain* (hMask), depositada no NCBI por Poulin e colaboradores em dezembro de 2003 (Poulin et al., 2003).

Esta nova proteína com repetições de Anquirina tem função desconhecida e expressão diferenciada em linhagens tumorais como LNCaP e por isso foi escolhida como alvo deste estudo.

1.1 Citoesqueleto e Domínio Anquirina

O citoesqueleto é uma importante estrutura celular composta por um extenso complexo protéico oligomérico (Beck et al., 1997) presente na superfície citoplasmática das membranas celulares (Beck e Nelson, 1998). O citoesqueleto dá suporte estrutural à membrana, limita a difusão de proteínas no plano da membrana e regula a formação de domínios funcionais distintos nas membranas (Beck et al., 1997). A composição de proteínas do citoesqueleto difere nos diversos compartimentos e nos diversos tipos celulares, refletindo a diversidade de funções das diferentes membranas. Existem diferentes classes de proteínas capazes de se associarem para formar uma rede oligomérica bidimensional (Bennett e Gilligan, 1993; Pascual et al., 1997). Dentre as mais conhecidas encontramos as proteínas da família das anquirinas. A anquirina funciona como um adaptador molecular, mediando as interações entre diferentes proteínas integrais da

membrana (transportadores, receptores e proteínas adesivas) e componentes do citoesqueleto (Bennett e Healy, 2008; Peters e Lux, 1993).

A família das anquirinas compreende três genes altamente relacionados. A anquirinaR (ANKR), assim denominada por ter sido primeiramente descrita nos eritrócitos ("Red cells") (Lambert et al., 1990) e por apresentar uma distribuição restrita, é codificada pelo gene *ANK1* e é encontrada principalmente nos eritrócitos, no músculo esquelético e em populações de células específicas do cérebro e do rim (Gascard e Mohandas, 2000). A anquirinaB (ANKB) é codificada pelo gene *ANK2*, é a principal forma encontrada no cérebro ("Brain") e apresenta uma distribuição ampla ("Broad") (Kunimoto et al., 1991; Otto et al., 1991). Finalmente, a anquirinaG (ANKG) é codificada pelo gene *ANK3* e foi assim denominada pelo fato de que sua primeira isoforma caracterizada é cerca de duas vezes maior que a maioria das outras anquirinas conhecidas ("Giant") e por seu padrão de expressão generalizado em múltiplos tecidos (Kordeli et al., 1995). A ANKG é a forma mais amplamente expressa da anquirina, constituindo a principal forma encontrada no rim e em outros tecidos epiteliais (Gascard e Mohandas, 2000).

As anquirinas são proteínas globulares de cerca de 220 kDa e possuem características estruturais altamente conservadas, caracterizadas por um domínio amino-terminal de cerca de 90 kDa cuja função é realizar a ligação com os domínios citoplasmáticos de uma variedade de proteínas de membrana. Este domínio amino-terminal de ligação à membrana é especialmente interessante porque ele contém 24 repetições de 33 aminoácidos, dos quais 15 são evolutivamente bem conservados e 18 são variáveis (Lux et al., 1990). Estas repetições são denominadas "repetições de anquirina" e encontram-se

presentes em um grande número de proteínas funcionalmente diferentes, bem como em diversos organismos, desde vírus a humanos (Sedgwick e Smerdon, 1999).

Esta ampla distribuição filogenética inclui: a) os domínios citoplasmáticos das proteínas de membrana envolvidas na diferenciação celular, como as proteínas Lin12 e Glp-1 de *Caenorhabditis elegans* e a proteína Notch de *Drosophila* (Austin e Kimble, 1989); b) proteínas citoplasmáticas envolvidas na regulação do ciclo celular, como as proteínas SW16 e SW14 de *Saccharomyces cerevisiae* e CDC10 de *Saccharomyces pombe*, onde estas repetições foram observadas pela primeira vez (Breedon e Nasmyth, 1987) e c) proteínas envolvidas na regulação da transcrição, como o fator de transcrição GABP50 e a proteína I κ B, inibidor da proteína NF- κ B, um fator de transcrição ubíquo (Blank et al., 1992; Jacobs e Harrison, 1998).

Uma proteína com um domínio protéico semelhante ao domínio de repetição da anquirina e com atividade oncogênica foi descrita no fígado e, quando altamente expressa, reduz a estabilidade da proteína RB1 (Higashitsuji et al., 2000). Esta proteína foi denominada ganquirina e parece ser crucial para regulação do ciclo celular nos hepatócitos, sugerindo que este domínio específico da anquirina pode ser importante no controle do ciclo celular e levar à transformação oncogênica. Outra proteína que contém repetições de anquirina e pode estar envolvida com o controle do ciclo celular é a proteína 53BP2, que se liga à proteína supressora de tumores p53 (Gorina e Pavletich, 1996).

Muitas outras proteínas incluem estas repetições (Peters e Lux, 1993). O sucesso evolutivo destas repetições se deve, provavelmente, ao fato de constituírem um módulo versátil de geração de interfaces de dimerização, que têm sido moldadas pela evolução para interagir com diferentes proteínas e até mesmo com o DNA (Peters e Lux, 1993).

Possivelmente, muitas outras proteínas humanas contendo repetições de anquirina devem existir e ainda não foram identificadas. A clonagem e caracterização destas novas proteínas vão aumentar o entendimento sobre a diversidade de processos celulares nos quais este domínio pode estar envolvido.

1.2 A proteína ANKHD1

A proteína Ankyrin repeat and KH domain containing 1 (ANKHD1) foi primeiramente identificada na linhagem de adenocarcinoma de próstata, LNCaP por Poulin e colaboradores (2003) quando caracterizavam a estrutura do gene EIF4EBP3. Os genes *ANKHD1* e *EIF4EBP3* estão localizados no cromossomo 5q31.3 e estes autores relataram a existência de *ANKHD1* devido ao raro caso de sobreposição de “open reading frames” (orfs) entre *ANKHD1* e *EIF4EBP3*. Esta fusão resultou num transcrito 8,3 kb chamado de *ANKHD1-EIF4EBP3* (**figura 1**).

Simultaneamente nosso laboratório, a partir das seqüências diferencialmente expressas do Projeto Genoma do Câncer, pesquisava uma isoforma menor de *ANKHD1* (Santos Duarte Ada et al., 2005), hoje descrita como isoforma 2 de *ANKHD1*.

O gene *ANKHD1* codifica 3 transcritos reconhecidos pelo NCBI atualmente (**figura 1**): O transcrito 1 é o mais longo possuindo 8,2 kb, gerando uma proteína de 2542 aa, o transcrito 2 é o menor possuindo 2,1 Kb e codifica uma proteína de 619 aa, e o transcrito 3 que é intermediário, possuindo 2,2 Kb, codificando uma proteína de 627 aa (**figura 2**).

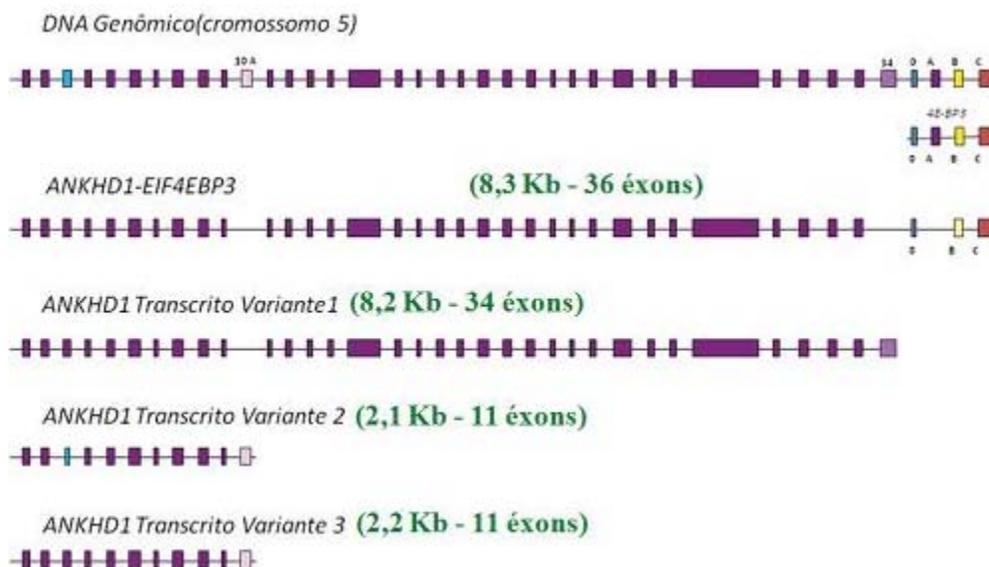


Figura 1: Representação esquemática da sequência genômica do gene *ANKHD1* no cromossomo 5 (banda 5q31.3) e de seus transcritos variantes. Os retângulos representam os éxons e as linhas representam os íntrons. O gene *EIF4EBP3*, contíguo ao gene *ANKHD1*, apresenta 4 éxons denominados **0, A, B e C**. Na fusão do gene *ANKHD1* variante **1** com o gene *EIF4EBP3* houve a perda do éxon 34 de *ANKHD1*, que possui 34 éxons, e ganho dos éxons 0, B e C de *EIF4EBP3*, originando o transcripto *ANKHD1- EIF4EBP3* com 36 éxons. O transcripto *ANKHD1* variante **1** apresenta 34 éxons. Os transcritos *ANKHD1* variantes **2** e **3** apresentam 11 éxons em comparação aos transcritos maiores, sendo os 10 primeiros éxons altamente homólogos, com exceção do éxon 3 da variante 2 (em azul) que apresenta uma deleção de 32 pb, e do éxon 10 (em lilás) que está ausente nos transcritos maiores.

ANKHD1, como seu próprio nome subentende, possui 5 blocos de repetições de anquirinas e um domínio KH. As repetições de anquirina de todas as isoformas de *ANKHD1* e do transcripto fusional estão distribuídas conforme a **figura 2**.

As repetições de anquirina permitem supor uma série de funções para as proteínas que as possuem, como fatores de transcrição, reguladoras do ciclo celular ou ainda proteínas acopladoras, facilitando interação de outras proteínas (Sedgwick e Smerdon, 1999).

Domínios KH possuem cerca de 70 aminoácidos bem conservados e permitem a ligação das proteínas que os contém ao DNA ou RNA, sendo associado a proteínas que regulam processos transcricionais e traducionais (Valverde et al., 2008). Domínios KH são observados apenas na isoforma 1 e no transcrito fusional (**figura 2**, círculo vermelho),

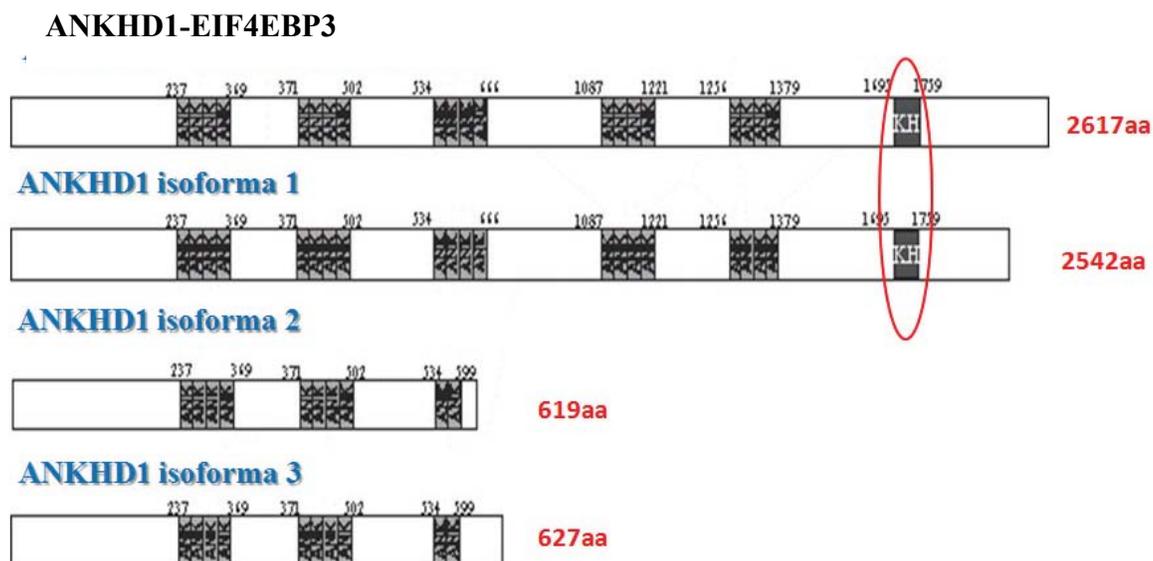


Figura 2: Representação esquemática da estrutura proteica primária de ANKHD1, de suas isoformas e da fusão ANKHD1- EIF4EBP3. As isoformas 1 (2542aa) e EIF4EBP3 (2617) apresentam 20 domínios de anquirina (indicada como **ANK**) organizadas em 5 blocos de 4 domínios e mais um domínio **KH** na porção C terminal, circulado em vermelho. As **isoformas 2** (619 aa) e **3** (627 aa) apresentam 10 domínios de anquirina organizadas em 2 blocos de 4 domínios e 1 bloco de 2 domínios mas o domínio **KH** se encontra ausente. Os 10 primeiros domínios de anquirina são altamente homólogos nos 4 transcritos de *ANKHD1*. A posição de cada domínio (numeração descrita na parte superior) estão indicados no esquema.

ANKHD1 foi inicialmente denominada como hMask, devido a sua homologia com a proteína Mask (Multiple ankyrin repeat and single KH domain protein) de *Drosophila melanogaster*. A proteína homóloga Mask foi descoberta na caracterização da via de sinalização dos receptores tirosina quinase (RTQ) da qual faz parte a tirosina fosfatase Corkscrew (Csw) (Smith et al., 2002). Este trabalho demonstrou, através de indução de mutações, que a perda de Mask leva a comprometimento na diferenciação, proliferação e sobrevivência dos fotoreceptores de drosófila, acentuando o fenótipo induzido por mutações em Csw. A homóloga humana de Csw é a proteína SHP2 (Nonreceptor protein-tyrosine phosphatase), que exerce um papel crítico na hematopoiese (Xu et al., 2005).

O aumento da expressão de ANKHD1 na hematopoiese foi inicialmente evidenciado por Santos Duarte et al., (2005), que demonstraram aumento do RNAm de todas as suas isoformas durante a diferenciação eritróide induzida em células tronco e durante diferenciação de linhagem HL60. Expressão aumentada de ANKHD1 também foi observada em diversas linhagens leucêmicas (Traina et al., 2006).

Interações diretas entre ANKHD1 e a proteína SHP2, foram descritas nas linhagens mielóide K562, de adenocarcinoma de próstata, LNCaP, e em linhagem de mieloma múltiplo RPM1 8226 (Traina et al., 2006; Santos Duarte, tese de doutorado). Além disso, a expressão de *ANKHD1* apresenta-se significativamente reduzida em células de medula óssea de pacientes com Mielodisplasia (Santos Duarte, tese de doutorado).

Estas evidências indicam que ANKHD1 pode exercer algum papel na hematopoiese e leucemogênese.

1.3 A proteína SHP2 e sua interação com ANKHD1

A proteína SHP2 (Nonreceptor protein-tyrosine phosphatase) é uma fosfatase de tirosinas codificada pelo gene *PTPN11*, que participa de vias de sinalização celular de fatores de crescimento e citocinas, e exerce importantes funções na regulação da proliferação, diferenciação e migração celular (Feng, 1999). SHP2 é constituída de dois domínios com homologia à Src, SH2, na porção N-terminal, um domínio catalítico com atividade fosfatase na região central, *Phospho-Tyrosine-Phosphatase Domain* (PTP), e uma cauda C-terminal contendo dois sítios de fosforilação em tirosina e uma região rica em prolina (Neel et al., 2003).

Em condições basais, SHP2 apresenta baixa atividade catalítica, sendo que o domínio catalítico está inibido pela ligação intramolecular com o domínio N-SH2. A ligação dos domínios SH2 da SHP2 a outras proteínas fosforiladas em tirosina induz a uma mudança conformacional da proteína SHP2, sendo desfeita a ligação auto-inibitória entre o domínio N-SH2 e o domínio catalítico. A proteína SHP2 torna-se ativa e adquire a capacidade de desfosforilar substratos (**Figura 3**).

A proteína SHP2 exerce um papel crítico na hematopoiese: mutações dominantes têm sido detectadas no gene *PTPN11* em 35% das leucemias mielomonocíticas juvenis (JMML) (Tartaglia et al., 2003). Poucas mutações têm sido encontradas em leucemias agudas, porém SHP2 está hiperexpressa em linhagens leucêmicas e em amostras de leucemia primária quando comparada a progenitores hematopoiéticos normais, sendo que seu nível de expressão correlaciona-se diretamente com a capacidade de hiperproliferação e é inversamente correlacionada ao grau de diferenciação, além disso ao silenciar-se a

expressão de de SHP2 ocorre indução de apoptose e inibição do crescimento de clones leucêmicos (Xu et al., 2005).

Interações entre ANKHD1 e a proteína SHP2 foram descritas na linhagem mielóide K562, na linhagem de adenocarcinoma de próstata LNCaP (Traina et al., 2006) e na linhagem de mieloma múltiplo RPM1 8226 (Santos Duarte, tese de doutorado). SHP2 é a homóloga humana da Csw de *Drosophila* e esta interação encontrada entre ANKHD1 e SHP2 permite levantar a hipótese que ANKHD1 tenha, na hematopoiese, as mesmas funções que Mask, que ao interagir com Csw atua na proliferação, diferenciação e sobrevivência de fotoreceptores de drosófila.

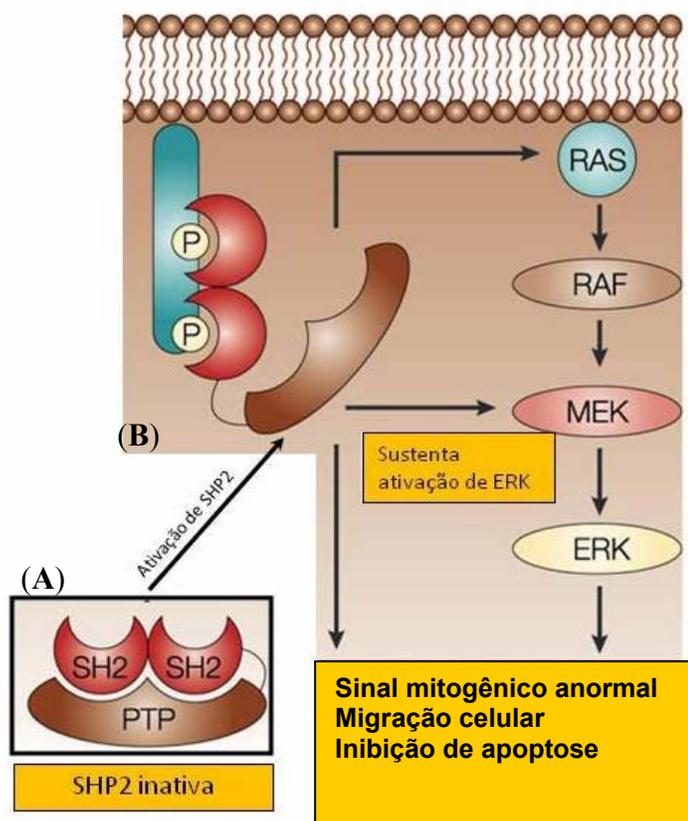


Figura 3: Representação esquemática da ativação de SHP2. (A) A figura indica a estrutura protéica de SHP2 inativada, com a representação dos dois domínios SH2, do domínio catalítico *Phosphotyrosine-Phosphatase* (PTP) com atividade fosfatase na região central.. Em condições

basais, SHP2 apresenta baixa atividade catalítica, sendo que o domínio PTP está inibido pela ligação intramolecular com o domínio SH2. **(B)** A partir da ativação de receptores transmembrana (receptores com atividade tirosina quinase ou receptores de citocinas), proteínas adaptadoras e fosforiláveis em tirosina são ativadas, simbolizadas na figura por um **P**. A ligação dos domínios SH2 da SHP2 a estas proteínas adaptadoras ativadas induz a uma mudança conformacional da proteína SHP2, sendo desfeita a ligação auto-inibitória. SHP2 é então ativada e adquire a capacidade de desfosforilar substratos, ativando diferentes vias de sinalização (RAS/ERK e AKT). Modificada de Hatakeyama, 2004.

1.4 A proteína Siva e sua interação com ANKHD1

Siva é uma proteína ubíqua de 175 aa (17KDa), e de expressão aumentada em células de origem linfóide. Esta proteína foi identificada em 1997, como um ligante do CD27 (Prasad et al., 1997), um membro da família dos receptores do fator de necrose tumoral, em linfócitos, mas atualmente sabe-se que sua ativação pode ser iniciada por outros receptores de células T como CD4 e GITR (Py et al., 2004).

A função pró-apoptótica da SIVA1 foi descrita a partir da identificação de sua associação com BCL-XL, sendo que SIVA1 inibe a função anti-apoptótica de BCL-XL (Xu et al., 2005). Posteriormente foi descrito que ambas as isoformas de SIVA possuem uma função pró-apoptótica em células HPB e Jurkat (LLA), onde ativam a via mitocondrial das caspases (Py et al., 2004).

Através de ensaio de duplo híbrido em levedura, foi identificada a interação de ANKHD1 isoforma 1 e SIVA (SIVA1 e SIVA2). (tese de doutorado, Dr. Fabíola Traina). A identificação da região C-terminal da SIVA através do seqüenciamento do clone obtido do ensaio de duplo híbrido em levedura a partir da isca de ANKHD1 e da biblioteca de cDNA

de medula óssea normal, sugere que a região C-terminal da SIVA é a região de interação com ANKHD1. A região N-terminal e C-terminal da SIVA, comum a ambas as isoformas, são as responsáveis por sua função pró-apoptótica (Py et al., 2004).

A identificação da associação de ANKHD1 com ambas isoformas de SIVA corrobora a hipótese de que ANKHD1 esteja envolvida em importantes vias de sinalização celular que medeiam mecanismos essenciais à sobrevivência da célula e o desenvolvimento de neoplasias.

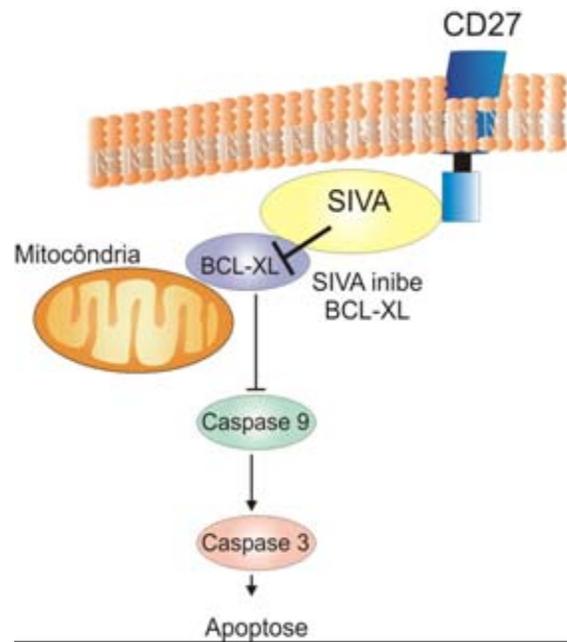


Figura 4: Representação esquemática da atuação de Siva via CD27. Siva associa-se e inibe a função anti-apoptótica de BCL-XL. A função anti-apoptótica de BCL-XL ocorre através da inibição das caspases na via extrínseca da apoptose.

1.5 A proteína Vpr e sua interação com ANKHD1

Vpr é uma pequena proteína de 96 aminoácidos (14 kDa), codificada pelo genoma do HIV (vírus da imunodeficiência adquirida). Apesar de suas pequenas dimensões,

diversas funções são atribuídas a Vpr, como ajudar na retrotranscrição do RNA virótico, e facilitar a importação do DNA virótico até o núcleo, otimizando o processo de infecção do HIV.

Uma das principais funções atribuídas a Vpr é capacidade de induzir bloqueio no ciclo celular na fase G2/M nas células infectadas pelo HIV (Planelles et al., 1996). Esta atividade citostática de Vpr é ainda pouco conhecida, porém seria vantajosa ao vírus pois forneceria um ambiente favorável à expressão dos demais genes virais e também de alguns genes celulares (Cui et al., 2006).

A infecção pelo HIV é caracterizada por uma importante diminuição de células CD4+ nos pacientes que desenvolvem a AIDS. Entre diferentes fatores virais, Vpr surge como uma proteína com propriedade pro-apoptótica (Le Rouzic e Benichou, 2005).

O mecanismo pelo qual Vpr leva a bloqueio do ciclo ou apoptose ainda não são bem conhecidos, mas Vpr parece exercer um papel de adaptador entre uma proteína ainda não determinada, (chamada de proteína X, **figura 5**), e o complexo de ubiquitina ligase, DDB1-Cul4A, através da interação Vpr/ DCAF1, o que permite desencadear o processo de degradação da proteína X através do proteossoma. Mesmo que muitos dos membros integrantes de processo ainda sejam desconhecidos, eles terminariam por ativar a proteína quinase ATR (Ataxia-telangiectasia and rad3 protein), que esta associada à via de reparo de lesões no DNA, e as consequências da ativação de ATR são hiperfosforilação de Cdc25 e em seguida hipofosforilação relativa de Cdc2, inibindo a ligação com a ciclina B1 e a entrada na mitose. Por outro lado, a proteína ATR provoca hiperfosforilação de GADD45 e ativa a proteína mitocondrial BAX contribuindo para aumento da apoptose (**Figura 5**).

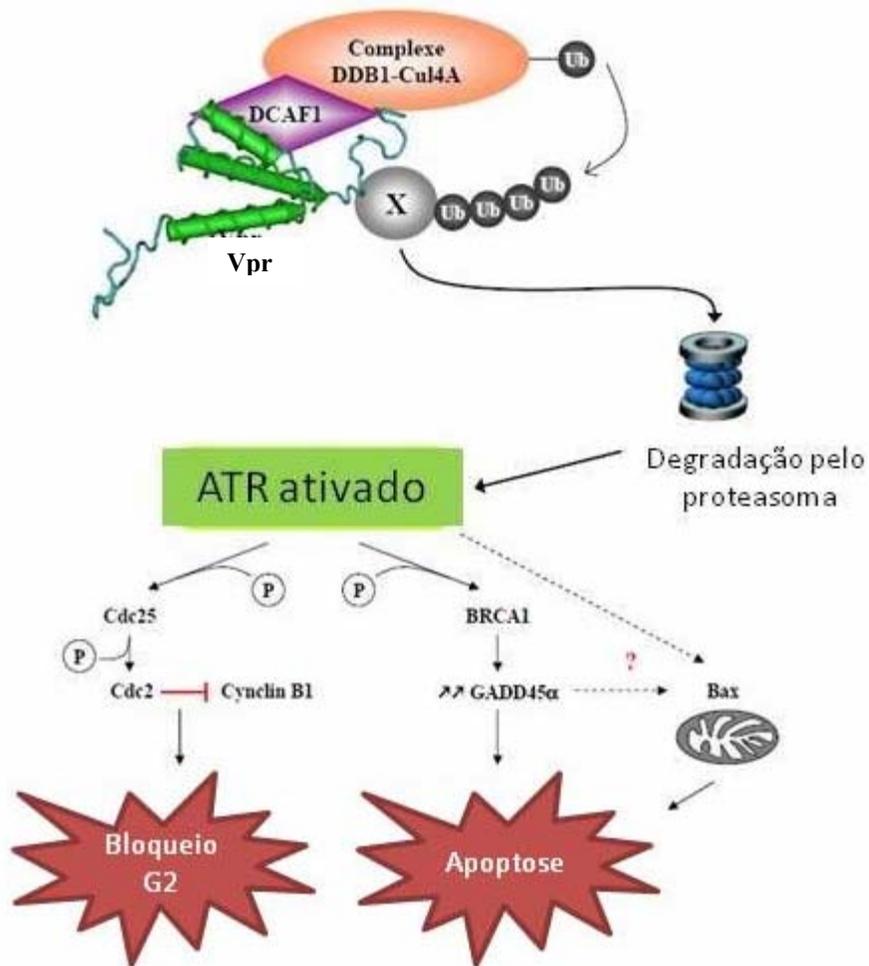


Figura 5 Modelo molecular das atividades citostática e pró-apoptótica de Vpr Vpr medeia a ligação entre a proteína ainda não determinada (proteína X), e o complexo de ubiquitina ligase, DDB1-Cul4A, através da interação Vpr/ DCAF1, o que permite desencadear o processo de degradação da proteína X pelo proteossoma, que leva a ativação de ATR por mecanismos não bem conhecidos. ATR ativada hiperfosforila Cdc25 e em seguida hipofosforila Cdc2, inibindo ligação com a ciclina B1 e impede a entrada na mitose. A proteína ATR também induz hiperfosforilação de GADD45 e ativa a proteína mitocondrial BAX contribuindo para aumento da apoptose.

A interação de Vpr com a isoforma 2 de ANKHD1 foi descrita por Miles e colaboradores (2005), Estes autores mostraram também um aumento das taxas de apoptose quando ANKHD1 isoforma 2 é inibida em HeLa e NT2.

ANKHD1 poderia portanto estar protegendo a célula do efeito pró apoptótico de Vpr.

A identificação da associação ANKHD1 com Vpr corrobora a hipótese de que ANKHD1 esteja envolvida em importantes vias de sinalização celular que mediam mecanismos essenciais à sobrevivência celular.

1.6 Hipótese do trabalho

A expressão de ANKHD1 é descrita em diversos tecidos como linfonodos, estômago, musculatura esquelética e em linhagens leucêmicas (Traina et al., 2006). O envolvimento de ANKHD1 na hematopoiese foi primeiramente evidenciado por Santos Duarte et al, (2005) que demonstraram aumento da expressão dos transcritos de ANKHD1 durante a indução de diferenciação hematopoiética em células tronco e na linhagem leucêmica HL60. A interação física de ANKHD1 e SHP2, homóloga de Csw de drosófila, em linhagens leucêmica e de mieloma (Traina et al., 2006, Santos Duarte, tese de doutorado), juntamente com a homologia de ANKHD1 e Mask sugerem que ANKHD1 poderia exercer as mesmas funções de Mask de drósfila na hematopoiese: diferenciação, proliferação ou sobrevivência celular.

As interações com proteínas tipicamente associadas a apoptose como Vpr e Siva, bem como os resultados de siRNA obtidos por Miles e colaboradores (2005) em HeLa e

NT2, mostrando aumento significativo nas taxas de apoptose quando ANKHD1 é inibida, e permitem levantar a hipótese de que ANKHD1 atue como proteína antiapoptótica.

Para auxiliar na caracterização da função de ANKHD1 se faz importante investigar seus demais parceiros de atuação e em que via de sinalização estes genes estão atuando; para tal duas abordagens metodológicas foram ensaiadas: inibição e hiperexpressão de ANKHD1, como explicitam os objetivos a seguir.

OBJETIVOS

2.0 Objetivo geral

Investigar o envolvimento de ANKHD1 em processos celulares relacionados á leucemogênese

2.1 Objetivos específicos

1. Estudar o perfil de expressão gênica em células tumorais LNCaP cuja expressão de ANKHD1 foi inibida (microarray).
2. Verificar a expressão de isoformas *ANKHD1* e genes modulados nos ensaios de microrray em banco de amostras de portadores de leucemia Aguda.
3. Hipexpressar as isoformas 1 e 2 ANKHD1 em linhagens tumorais HeLa e HEK 293T.
4. Determinar a localização subcelular das isoformas 1 e 2 de ANKHD1.
5. Avaliar o efeito de Vpr e Siva na expressão protéica de ANKHD1
6. Avaliar o envolvimento de ANKHD1 na apoptose, após a hiperexpressão na linhagem leucêmica Jurkat.
7. Estudar a expressão de ANKHD1 em diversas linhagens leucêmicas submetidas a diferentes agentes terapêuticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.0 Casuística e Linhagens Celulares

3.1 Células hematopoéticas de pacientes com diagnóstico de Leucemia Aguda

As células leucêmicas foram obtidas de amostras de medula óssea de pacientes atendidos no ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e consentimento informado (Anexo I). As amostras foram coletadas no momento do diagnóstico de leucemia aguda, antes de qualquer tratamento. Utilizamos neste estudo as amostras que foram coletadas entre o período de fevereiro de 2001 a dezembro de 2005 e que possuíam os dados hematológicos do diagnóstico, confirmação do diagnóstico de leucemia aguda através de mielograma, citoquímica e imunofenotipagem, e que apresentavam RNA de boa qualidade no momento da realização dos experimentos. Foram incluídos um total de 38 pacientes com diagnóstico de Leucemia Aguda (mediana de idade de 47 anos, variando de 18–83 anos), incluindo 7 LLA (leucemia linfóide aguda), 1 leucemia aguda bifenotípica e 30 LMA, leucemia mielóide aguda, (1 M0, 5 M1, 6 M2, 3 M3, 10 M4, 3 M5, 1 M6, 1 M7) de acordo com a classificação *French-American-British* (FAB) (Bain, 2003). Os dados clínicos estão descritos no Apêndice I. As células mononucleares de medula óssea foram obtidas através de um gradiente de separação Ficoll-Hypaque. A seguir, as células foram submetidas à extração de RNA.

3.2 Exames para diagnóstico de Leucemia Aguda

Os exames para diagnóstico de leucemia aguda foram realizados de acordo com a rotina do serviço de Hematologia da Unicamp, incluindo avaliação do sangue periférico e do mielograma corados com Leishmann e citoquímica incluindo as colorações de Sudan Black, Esterase inespecífica e Esterase NaF. As amostras foram simultaneamente

submetidas a exame de imunofenotipagem com os marcadores característicos de LMA e LLA. Os casos com suspeita de LMA M3 foram submetidos a RT-PCR para pesquisa de t(15;17). A maioria dos casos de LLA foram submetidos a RT-PCR para pesquisa de t(9;22) p190 e p210. Todos os pacientes foram submetidos à coleta de material de medula óssea para análise de cariótipo por banda G, sendo avaliadas vinte metáfases.

Tabela I: Pacientes com diagnóstico de Leucemia Aguda.

	Número de pacientes
Pacientes estudados	38
Sexo	
Masculino/ Feminino	25/13
Idade (anos), mediana (variação)	47 (18-83)
FAB	
LMA	30
M0	1
M1	5
M2	6
M3	3
M4	10
M5	3
M6	1
M7	1
LLA	7
LLA T	5
LLA pré-B	2
LA Bifenotípica	1

Abreviações. FAB: French-American-British; LMA: Leucemia Mielóide Aguda; LLA: Leucemia Linfóide Aguda; LA: Leucemia Aguda.

3.3 Células hematopoéticas normais

As células hematopoéticas normais foram obtidas de medula óssea (n=11) de doadores normais do Hemocentro da Unicamp com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e consentimento informado (anexo). As células mononucleares de medula óssea foram obtidas através de um gradiente de separação Ficoll-Hypaque

3.4 Células hematopoéticas de pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica.

Amostras de medula óssea foram obtidas de pacientes com SMD atendidos no ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e consentimento informado. As células mononucleares de medula óssea foram obtidas através de um gradiente de separação Ficoll-Hypaque e foram colocadas sob cultura com duas doses de decitabina de 1 e 5 μM para averiguar qual dosagem seria a mais adequada, por 72h. Dados dos pacientes e sua distribuição de acordo com as classificações da doença estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica

<i>Pacientes</i>	<i>FAB</i>	<i>Hb (g/dl)</i>	<i>Leucócitos (mm³)</i>	<i>Neutrófilos (mm³)</i>	<i>Plaquetas (mm³)</i>	<i>%blastos (medula óssea)</i>	<i>Citogenética</i>	<i>Idade (anos)</i>
1	RARS	7,9	2180	520	87000	2,0	46XX	70
2	RA	10,5	5890	2450	361000	1,0	46XX del(5)(q13)	86
3	AREB	5,1	8890	4260	841000	19	46 XY	64
4	RA	12,2	3000	1370	226000	4,0	46XX	38

3.5 Linhagens celulares

Linhagens celulares de leucemias agudas humanas foram adquiridas no ATCC, Philadelphia, USA: KG-1(leucemia miéloide aguda), K562 (leucemia mielóide crônica em

fase blástica, t(9;21), HL-60 (leucemia promielocítica aguda), Jurkat (leucemia linfóide T), HEK 293T (Human Embryonic Kidney 293 cells), LNCaP (adenocarcinoma de próstata humano) e HeLa (câncer de colo de útero).

3.6 Tratamento com drogas

As linhagens leucêmicas. KG1, Jurkat e HL60 foram cultivadas até a fase exponencial e tratadas com as doses 25, 100 ou 200 U/mL de IFN α por 18 horas. Estas mesmas linhagens foram submetidas às seguintes doses de talidomida 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} or 10^{-7} M por 16 horas, ambos os tratamentos foram repetidos em dois experimentos independentes. Para a indução de apoptose na linhagem KG1 foi utilizada Daunorubicina nas doses $2\mu\text{g/mL}$ e $4\mu\text{g/mL}$. Para a indução de apoptose na linhagem Jurkat foi utilizado Metotrexate ou 100 ng/mL e 1000 ng/mL de metotrexate, ambas as drogas por 24 horas, em duas réplicas experimentais independentes.

3.7 RNA de interferência

O silenciamento pós transcricional da ANKHD1 foi obtido através do uso dos oligos *SMART pool siRNA* da Dharmacon (Lafayette, CO). O reagente foi utilizado a uma concentração de 120 nM em células LNCaP, linhagem na qual se descreveu pela primeira vez a expressão da isoforma 1 de ANKHD1, utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). As células foram tripsinizadas, lavadas e cultivadas em meio RPMI com 10% de soro bovino fetal, em uma concentração de 2×10^6 células no dia precedente a transfecção. No dia do experimento as células foram lavadas com tampão PBS estéril e incubadas com OPTI-MEM até o momento da lipofecção. Os oligos foram incubados com $30\ \mu\text{L}$ de lipofectamina 2000 na presença de OPTI-MEM por um período de 25 minutos. Em seguida

o complexo DNA-lipofectamina foi adicionado as células e estas foram mantidas em contato com essa solução por 5 horas. Ao final desse tempo foi, o meio foi retirado e acrescentou-se às células meio de cultura com 10% de soro bovino fetal e as células foram mantidas em cultura 72 horas. As células foram então coletadas e submetidas à extração de RNA e proteína para verificar a redução da expressão de ANKHD1 .

3.8 Extração do RNA total

O RNA de células foi isolado utilizando Trizol (Life Technologies, USA). O Trizol é um reagente que apresenta uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. A extração de RNA com esse reagente é uma adaptação do método desenvolvido por Chomczinki e Sacchi (Chomeczynski e Sacchi, 1987). Ao precipitado de células, contendo 5×10^6 a 1×10^7 células, foi acrescentado 1 mL de Trizol e a amostra homogeneizada até que se tornasse bastante fluida. A quantificação do RNA obtido foi realizada através da leitura da densidade óptica (DO) de uma alíquota da amostra em espectrofotômetro com comprimento de onda equivalente a 260 nm, considerando que 1 DO à 260 nm equivale a 40 $\mu\text{g/mL}$ de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas, e esse varia normalmente entre 1,6 e 1,8. A qualidade das amostras de RNA obtidas após a extração foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose.

3.9 Tratamento do RNA total com DNase I

O RNA total de células foi tratado com DNase livre de RNase 1 U/ μL (Life Technologies), utilizando 1 U da enzima para tratar 2 μg de RNA por 15 minutos à temperatura ambiente, a fim de eliminar uma possível contaminação deste material com

DNA genômico. A enzima foi, subsequentemente, inativada por uma incubação de 10 minutos a 65°C.

3.10 Transcrição em cDNA

As amostras de RNA total, contendo 2 µg de RNA e tratadas com DNase I, foram transcritas reversamente em cDNA (híbrido RNA-cDNA) numa reação de volume final de 20 µL (Life Technologies). A reação foi iniciada adicionando aos 2 µg de RNA tratado 1 µL de oligonucleotídeo (dT) 500 µg/mL e 1µL da mistura (10 mM) de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP). Essa mistura foi aquecida por 5 minutos a 65°C, e, em seguida, incubada no gelo. Adicionou-se, então, 4 µL do tampão de reação 5x, contendo 250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, e 0,1 M DTT, e também 200 U enzima transcriptase reversa SuperScript II, que catalisa a reação de extensão da fita complementar. Essa mistura foi incubada por 50 minutos a 42°C. A seguir, foi feita a desnaturação da reação por 15 minutos a 70°C e finalmente foram adicionadas 40 unidades de Rnase H e a solução incubada por 20 minutos a 37°C. As amostras de cDNA foram quantificadas através do espectrofotômetro Nanodrop (Thermo scientific) para que quando fossem usadas em qPCR partíssemos sempre da mesma concentração de c-DNA.

3.11 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Amplificação em tempo real foi realizada no 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando-se Power SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). 120 ng de cada amostra de cDNA foram utilizados na reação com os primers nas concentrações

indicadas na **Tabela 3**. Um controle negativo, sem adição de cDNA, sempre foi utilizado em toda reação para cada par de primers. Cada reação foi repetida 2 vezes, com três réplicas cada por experimento. As expressões dos genes housekeeping *ABL*, *HPRT* ou *GAPDH* foram utilizadas como controle endógeno. Em geral foram utilizados sempre dois controles endógenos em todas as reações apresentadas. A escolha do *housekeeping* mais adequado se deu segundo a expressividade do gene alvo quantificado, e também segundo o tipo de amostras utilizado. Sendo que o melhor housekeeping para um dado gene alvo, em uma determinada amostra, foi o que teve expressão mais próxima deste gene alvo, tendo regiões de amplificação exponencial em torno dos mesmos ciclos de amplificação e de expressão não variável segundo a drogas utilizadas. A quantificação relativa da expressão gênica da *ANKHD1* foi calculada utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et al.,2001).

Tabela 3: Seqüências dos primers utilizados na amplificação dos genes estudados por PCR quantitativo em tempo real (qPCR). A tabela a seguir mostra os primers previamente utilizados no laboratório, os primers desenhados para validação do *array* se encontram em tabela no apêndice.

<i>Primer</i>	<i>[]ηM</i>		<i>sequencia 5'para 3'</i>
ANKHD1 iso 1	300	Sense	CCTGCTTGGAACCCTCTGATAAA
		Antisense	CGTGCCAGGCCAAATCTG
ANKHD1 iso 2	150	Sense	CAAGCAGGAGGACATGAAGCAT
		Antisense	CGTAGTAGCTTACAAGCATCAAAGG
ABL	300	Sense	TGGAGATAAACTCTAAGCA
		Antisense	GATGTAGTTGCTTGGGACCC
GAPDH	150	Sense	ACCCACTCCTCCACCTTTGA
		Antisense	CTGTTGCTGTAGCCAAATTCG
HPRT	150	Sense	GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA
		Antisense	TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT

3.12 Western Blotting

Ao pellet celular contendo 5×10^6 a 1×10^7 células foi acrescentado tampão de extração de proteínas contendo 100 mM Tris (pH 7.6), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 0,1 mg Aprotinina, 35 mg PMSF/mL, 10 mM Na_3VO_4 , 100 mM NaF, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, e 4 mM EDTA. As amostras foram homogeneizadas até que se tornassem bastante fluidas. Após 30 minutos a 4°C , essas amostras passaram por um processo de centrifugação a 4°C durante 20 minutos para remoção dos restos celulares. Para produção do extrato total proteico, adicionou-se às alíquotas tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditioneitol e aqueceu-se em água fervente por 5 minutos. Após isso, as amostras foram submetidas à eletroforese ou armazenadas a -80°C . As proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e 12 % SDS-PAGE segundo seu peso molecular em aparelho de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 90 minutos a 120 V (constante) em aparelho miniaturizado de transferência úmida da Bio-Rad. A ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 1 hora com tampão de bloqueio (5% leite em pó magro, 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, and 0.02% Tween 20) a 4°C . A membrana de nitrocelulose foi então incubada com anticorpos específicos diluídos em tampão de bloqueio (5% de leite em pó magro) por 12 horas a 4°C e então lavadas 3 vezes com solução basal (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, and 0.02% Tween 20). Os anticorpos primários utilizados foram: HA (Roche) V5 (Invitrogen) e o anticorpo anti-ANKHD1 endógeno foi desenvolvido pela Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), a partir da escolha do peptídeo antigênico de 16 aminoácidos. O sistema de revelação usado foi o baseado em quimioluminescência, de acordo com as instruções no

kit ECL™ Western Blotting Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Em suma, as membranas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário, conjugado à HRP (*Horseradish peroxidase*), lavadas novamente, e então submetidas ao substrato da enzima, resultando num produto luminescente, detectado por auto-radiografias em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY).

3.13 *Microarray* da Inibição de ANKHD1.

Após a inibição de ANKHD1 (item 3.6) e extração do RNA segue-se um ensaio de *microarray*. O sistema de *microarray* utilizado permitiu a análise simultânea de cerca de 55.000 transcritos humanos distintos (Whole Genome Bioarray, CodeLink, GE Health Care). Esta plataforma utiliza um sistema de detecção de cor única, baseado na incorporação indireta de um fluorocromo para a marcação das amostras. Este sistema elimina resultados falsos decorrentes de parâmetros enzimáticos, que afetam a frequência de incorporação de fluorocromos distintos, ou relativos à sobreposição espectral de duas fluorescências.

Basicamente o processo consiste na purificação, amplificação e hibridização a *microarrays* de DNA para a análise de expressão gênica global. Em termos gerais, RNAs complementares (cRNA) marcados com uridina biotinilada foram preparados por amplificações lineares (transcrição reversa a partir de 2µg de RNA total, síntese de cDNA dupla fita e transcrição *in vitro*), fragmentados e hibridizados com os oligonucleotídeos presentes nos *microarrays* a 37°C por 18 h. Após sucessivas lavagens, fragmentos de cRNA especificamente aderidos foram marcados com fluorocromo (cyanine 5) conjugado a streptavidina e a intensidade fluorescente foi captada por um Axon GenePix 4000B Scanner (Axon Instruments).

Genes diferencialmente expressos no *array* foram identificados de acordo com o método HTself com réplicas técnicas baseado no cálculo de *um limite experimental dependente* da intensidade de todos os pontos da lâmina. Esse método diminui a necessidade de réplicas uma vez que não se baseia no desvio experimental de cada ponto ou de amostragem e tem probabilidade de até 75% ou mais de modulação real (Vencio e Koide, 2005).

3.14 Critérios usados na escolha dos genes validados.

Genes diferencialmente expressos foram agrupados em classes funcionais utilizando DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*; <http://niaid.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>). DAVID é um aplicativo que permite o acesso a bases de dados inter-relacionadas contendo diferentes tipos de anotações funcionais. Os parâmetros utilizados para as análises nesse trabalho foram os termos de *Gene Ontology* (GO, <http://www.geneontology.org/>) e de vias metabólicas descritas em KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, <http://www.genome.jp/kegg/>).

O software Ingenuity Pathway Analysis (<http://www.ingenuity.com/>), também foi utilizado na determinação das classes funcionais significativamente alteradas pela inibição de ANKHD1.

3.15 Hiperexpressão de ANKHD1 isoforma 1 e 2

O método de transfecção utilizado para células HEK 293T foi o baseado na precipitação do fosfato de cálcio $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Vinte e quatro horas antes do experimento, as células foram colocadas em garrafas de T 75 numa densidade de 3×10^6 /garrafa em 15 mL de DMEM 10 %.

No dia do experimento 10 a 20 μg de DNA plasmidial foi misturado a 120 μl de CaCl_2 1M e água destilada qsp 500 μl . Em seguida, para formação dos cristais de fosfato de cálcio, a solução plasmidial foi acrescentada gota a gota à 500 μl de HBS 2X (5,6 mL de

Nacl 5M, 10 mL de Hepes 0,5 M, 1mL de Na₂HPO₄, 83,4 ml de H₂O). Em seguida esta solução foi distribuída sobre as células também gota a gota. Seis horas depois o meio foi trocado por meio novo suplementado e as células foram coletadas após 24 horas para extração protéica.

As células HeLa, utilizadas para experimentos de imunofluorescência, foram transfectadas com lipofectamina 2000 (Invitrogen) em protocolo análogo ao usado para RNAi, porém 3x 10⁵ células foram semeadas em placas com 6 poços , em meio DMEM sem antibiótico 24 horas antes da transfecção.

Para esta transfecção, a quantidade de DNA por poço foi de 4 µg e as células foram incubadas com a mistura DNA, lipofectamina, OPTIMEM por 5 horas, em seguida o meio foi trocado e as células em lamínulas foram fixadas 24 horas depois do procedimento (conforme item 3.15).

As células Jurkat foram transfectadas por metodologia AMAXA[®] de eletroporação utilizando o Kit nucleofactor V[®] e o programa S018, com 5µg de DNA em 2x10⁶ células por poço, em placas com seis poços, conforme especificações do fabricante.

Mapas das construções usadas na Hipexpressão

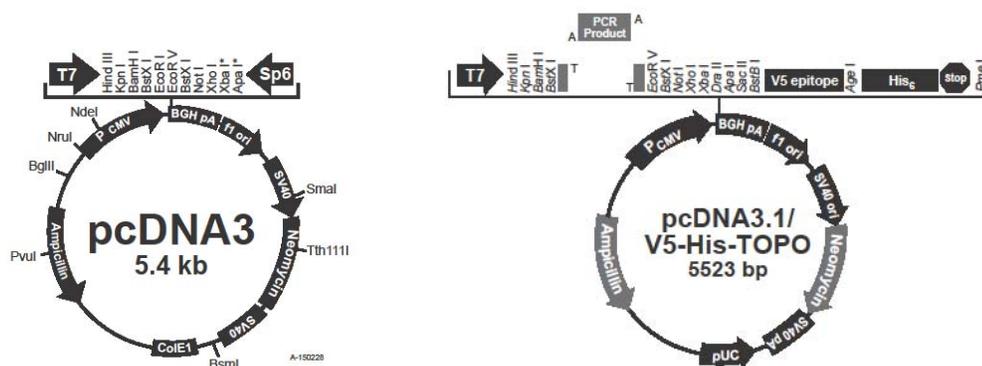


Figura 6: Mapa dos vetores utilizados neste trabalho. O vetor pcDNA 3 contém a isoforma 1 de ANKHD1 e o vetor pcDNA 3.1V5-HIS-TOPO contém a isoforma 2

A isoforma 1 de ANKHD1 está contida no plasmídeo pcDNA 3, possui um epítipo HA e foi gentilmente cedida pela equipe do Dr Nahum Sonenberg (Poulin et al., 2003). A

isoforma 2 de ANKHD1 está contida no plasmídeo pcDNA3.1 CMV/ T7 TOPO e possui um epítipo V5/His que foi gentilmente cedido por pela equipe do Dr.Velpandi Ayyavoo (Miles et al., 2005).

3.16 Microscopia de Fluorescência

Células HeLa cultivadas e transfectadas sobre laminulas de vidro foram lavadas com solução de tampão fosfato duas vezes e fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos e permeabilizadas com 0.1% Triton X-100 por 10 min. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo primário, HA, V5 ou Kdel segundo o experimento, diluídos de 1:500, 1:200, 1:500 respectivamente, por 2 horas a 4°C. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em tampão fosfato três vezes e incubadas com o anticorpo secundário com a cor escolhida, por 45 min a temperatura ambiente . A reação foi interrompida com tampão Tris 50 mM e as células foram cobertas com meio de montagem DAPI (Invitrogen). Imagens fluorescentes foram obtidas usando um microscópio de Leica DMRB epifluorescência equipado com câmera CCD câmera (Princeton) controlado pelo software Metamorph V5.0r6. Análises das imagens foram feitas através do Image J (*Image processing and analysis Java*).

3.17 Estudo da apoptose

O estudo da apoptose foi realizado através da marcação das células Jurkat com anexina V (Molecular probes) e 7AAD (BD Pharmingen™) por citometria de fluxo. Células Jurkat submetidas à superexpressão de ANKHD1 ou células controle

(eletroporadas) (2×10^5) foram submetidas a duas lavagens em RPMI sem SFB e ressuspensas em 200 μ L de tampão de ligação (10 mM Hepes pH=7,4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$ e 1,8 mM $CaCl_2$). Foi adicionado 1 μ g/mL de anexina V-PE e as amostras foram incubadas durante 20 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Imediatamente antes da aquisição, foi adicionado 1 μ L/mL de 7AAD, 10000 eventos foram adquiridos. Os dados foram analisados no citômetro FACSCalibur (BD Bioscience), utilizando-se o software CellQuest (BD Bioscience). As células positivas para anexina V e negativas para 7AAD, em relação ao número de células GFP positivas, indicaram células Jurkat em processo de morte celular programada.

3.18 Análise Estatística

A comparação dos valores da quantidade relativa de expressão do RNAm de *ANKHDI* entre os pacientes com diagnóstico de Leucemias Agudas e células hematopoéticas normais foi realizada através do teste estatístico de Mann-Whitney. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

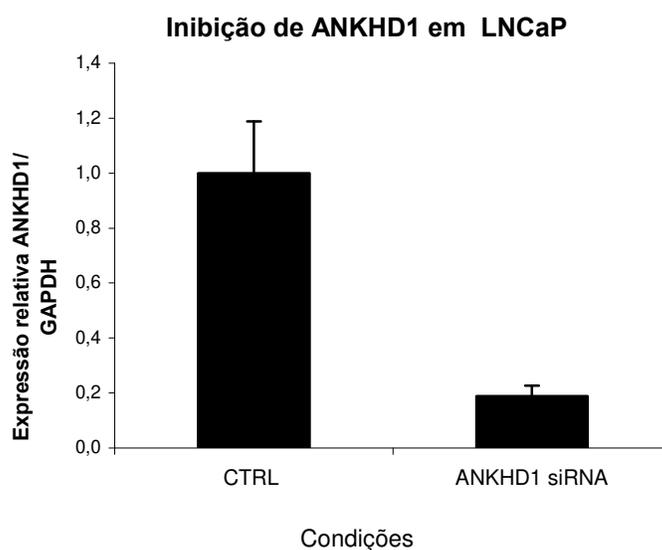
RESULTADOS

4.1 Inibição de ANKHD1 e análise microarray

Uma abordagem usual na busca da função de novos genes é seu silenciamento (siRNA) seguido da averiguação das possíveis alterações gênicas associadas à ausência de sua expressão, através de microarray. A linhagem tumoral LNCaP foi utilizada para a inibição devido à baixa eficiência de silenciamento de células leucêmicas em suspensão.

4.1.1 Inibição de ANKHD1 em LNCaP :

(A)



(B)

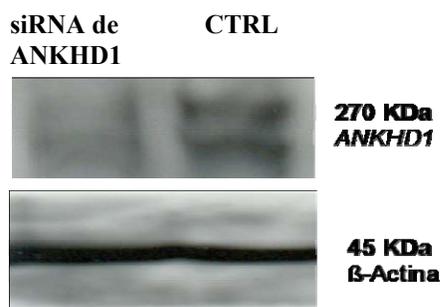


Figura 7. Análise da inibição de ANKHD1 em LNCaP através de siRNA: (A) qPCR 72 horas pós transfecção, o RNA total foi isolado das células e amplificado com primers de ANKHD1 ou GAPDH. CTRL representa o controle transfectado com lipofectamina. (B) por Western blotting.

Extrato total das células 72 horas pós transfecção, e incubadas com o anticorpo anti- ANKHD1, 270 KDa. Como controle da quantidade protéica aplicada no gel, a membrana foi incubada com anticorpo anti-actina (45 kDa). A membrana de nitrocelulose foi revelada com *ECL Western Blotting Analysis System*. A coluna 1 mostra a inibição de ANKHD1 e em 2 o controle transfectado com lipofectamina.

4.1.2- Análise da Expressão gênica global pós inibição de ANKHD1.

Técnicas de hibridização como de microarrays permitem mensurar o nível de expressão de muitos genes simultaneamente (Margalit et al., 2005) representando uma ferramenta útil para o estudo de genes ainda não bem caracterizados, por permitir traçar um amplo perfil de alterações gênicas associadas a inibição ou superexpressão de genes pouco conhecido, como ANKHD1.

Os RNAs provenientes da inibição de ANKHD1 em linhagem celular de adenocarcinoma de próstata (LNCaP) e de células controle (LNCaP transfectadas com lipofectamina) foram submetidos a análise por microarray na plataforma Codelink (GE). Cada amostra foi utilizada em duplicata e a reprodutibilidade das lâminas é evidenciada na

figura 8:

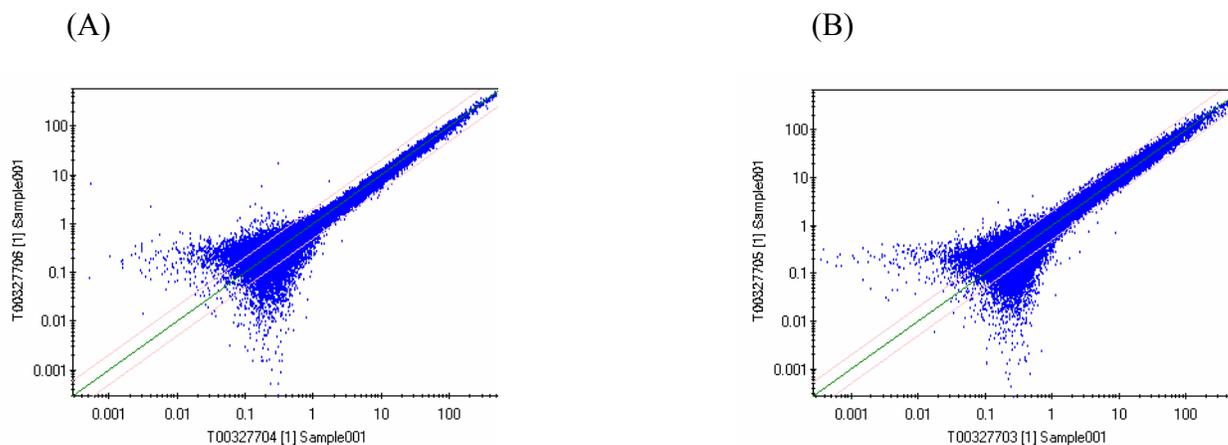


Figura 8: Reprodutibilidade de dados de microarrays: (55.000 transcritos), conduzidos em duplicata, com RNA extraído do (A) células controle e (B) de LNCaP transfectadas com o siRNA anti ANKHD1. No eixo x estão os valores (log) das intensidades de expressão gênica e em y (log) dos dados relativos à sua réplica. Pearson > 0.95.

Os dados de array mostraram que 2 dos transcritos da ANKHD1 (isoforma 1 270-kDa e isoforma 2 – 49kDa) foram inibidas 2 e 8 vezes, respectivamente em relação as células do controle. O resultado das lâminas foi bastante reprodutivo (Pearson > 0.95) para ambas as condições, controle e inibido.

A figura 12 mostra o total de genes considerados diferencialmente expressos com probabilidade de até 75% (**figura 9**), sendo 706 genes mais expressos e 159 menos expressos nas células inibidas , em relação às células controle.

Perfil de alteração de expressão gênica global

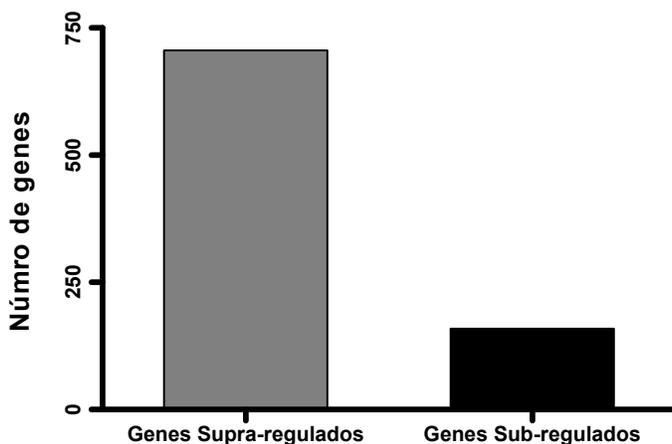


Figura 9: Perfil de alteração da expressão gênica global da inibição de ANKHD1. A barra em cinza representa o número total de genes que tiveram sua expressão aumentada quando ANKHD1 foi inibida. A barra em preto evidencia o número total de genes que tiveram diminuída a sua expressão na inibição de ANKHD1.

Em seguida estes genes foram agrupados por classes funcionais, como mostram as figuras 10 e 11.

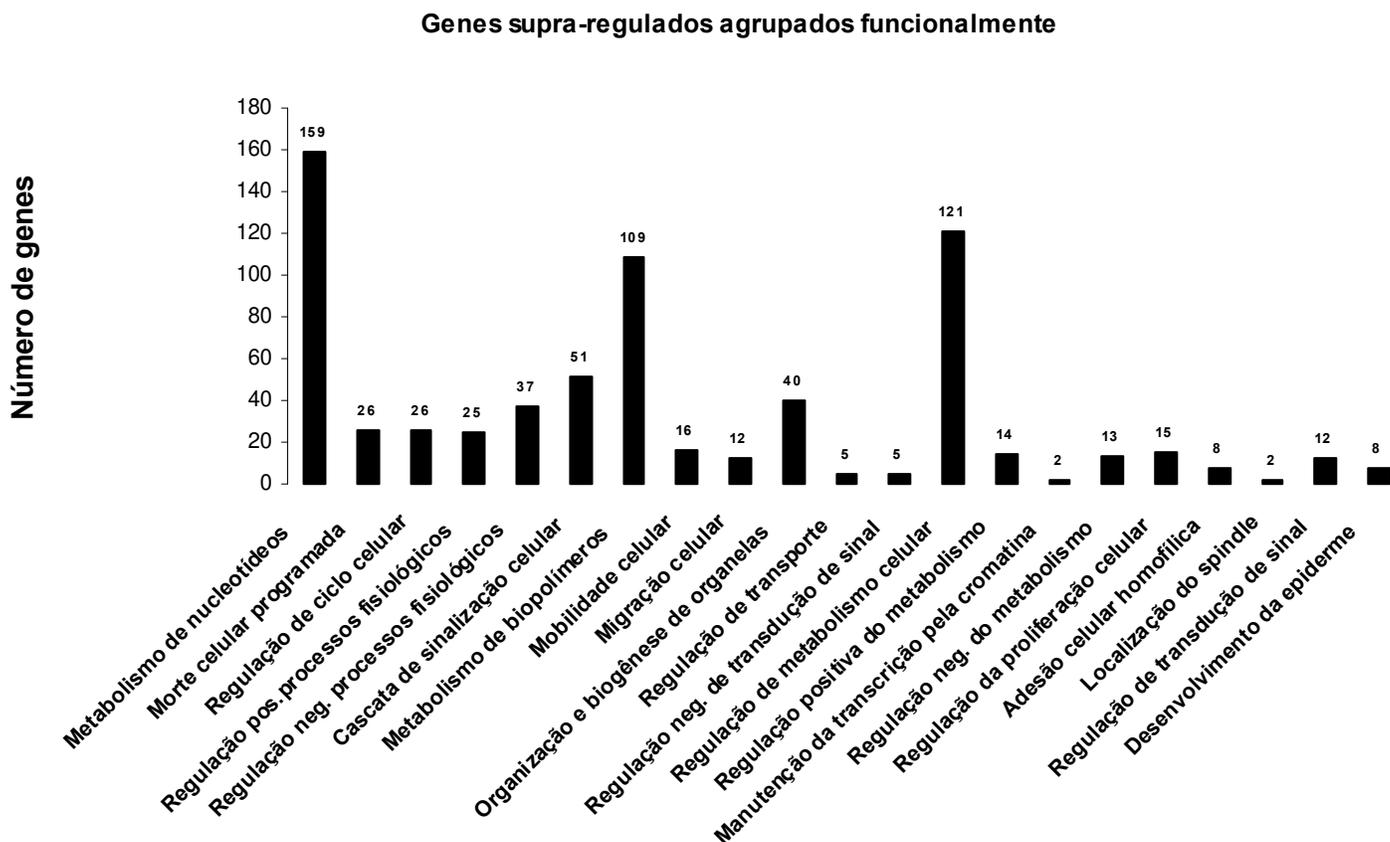


Figura 10: Número de genes supra-regulados com a inibição de ANKHD1, organizados em classes funcionais, segundo critérios do Gene Ontology. O número de genes por classe está indicado sobre cada barra. Só foram considerados genes com probabilidade de 75% ou mais de modulação real.

Houve aumento da expressão gênica nas 21 classes funcionais mostradas na **figura 10**: metabolismo de nucleotídeos, morte celular programada, regulação de ciclo celular , regulação positiva e negativa de processos fisiológicos, cascata de sinalização celular,

metabolismo de biopolímeros, mobilidade celular, migração celular, organização e biogênese de organelas, regulação de transporte, regulação negativa de transdução de sinal regulação de metabolismo celular, regulação negative e positiva do metabolismo, manutenção da transcrição pela cromatina, regulação da proliferação celular, adesão celular homofílica, localização do spindle, regulação de transdução de sinal e desenvolvimento da epiderme.

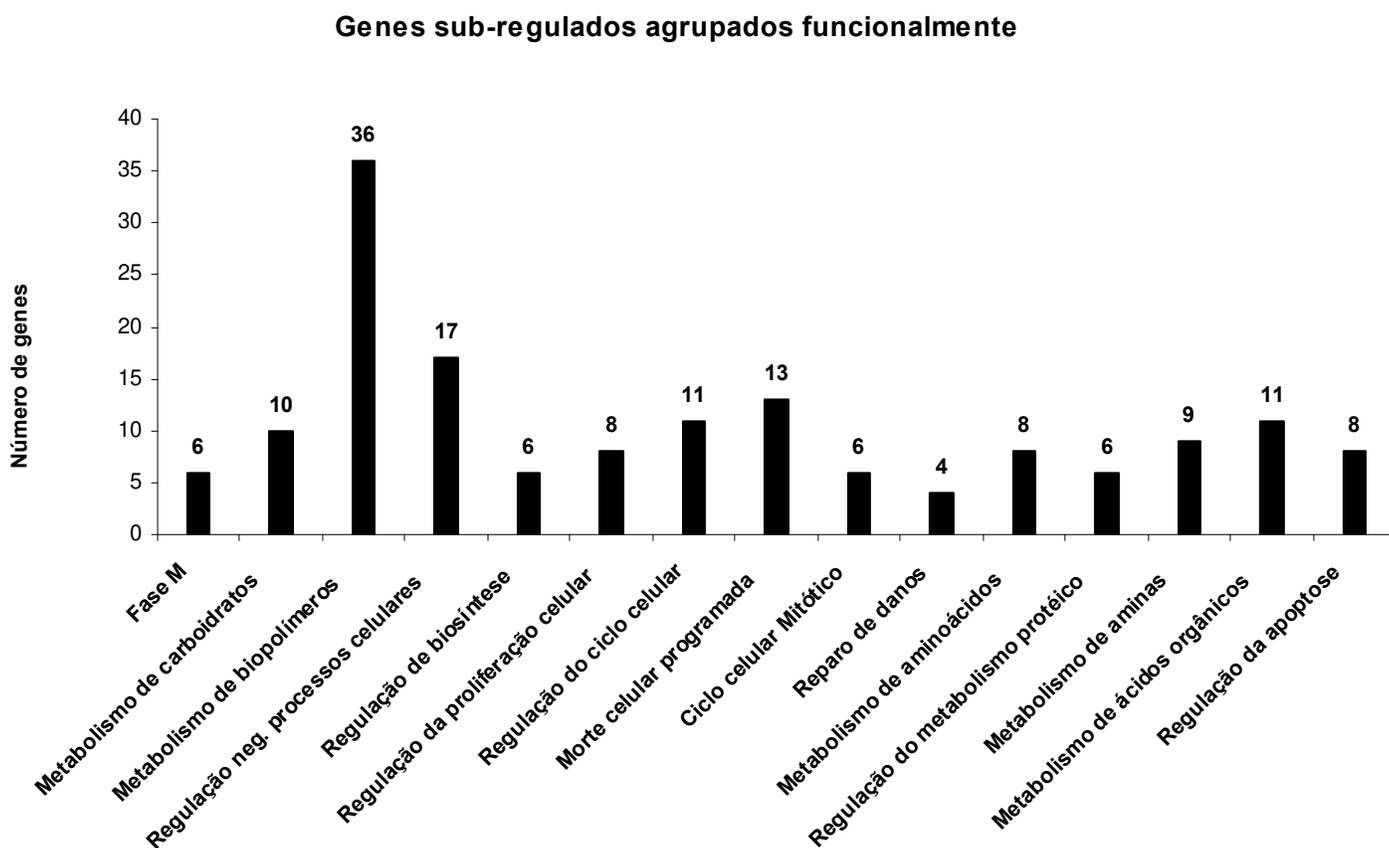


Figura 11: Número de genes sub-regulados com a inibição de ANKHD1, organizados em classes funcionais, segundo critérios do Gene Ontology. O número de genes por classe está indicado sobre cada barras. Só foram considerados genes com probabilidade de 75% ou mais de modulação real.

Houve diminuição da expressão gênica nas 15 classes funcionais mostradas no gráfico acima: genes relacionados a fase M da multiplicação celular, metabolismo de carboidratos, metabolismo de biopolímeros, regulação negativa de processos celulares, regulação de biosíntese, regulação da proliferação celular, regulação do ciclo celular, morte celular programada, ciclo celular mitótico, reparo de danos, metabolismo de aminoácidos, regulação do metabolismo protéico, metabolismo de aminas, metabolismo de ácidos orgânicos e regulação da apoptose.

Posteriormente, a análise destes dados foi refeita com o software Ingenuity Pathway Analysis (<http://www.ingenuity.com/>), que possui um banco de dados de vias de sinalização mais atualizado. Esta análise confirmou a importância de algumas vias de sinalização em especial, como mostram a **Tabela 4** e a **Figura 12**

Tabela 4: Principais redes de atuação associadas à inibição de ANKHD1 segundo o Ingenuity Pathway analysis.

	<i>Principais Redes de atuação associadas</i>	<i>Score</i>
1	Organização e montagem celular, Morte celular e Metabolismo de drogas.	3
2	Metabolismo de carboidratos, Diferenciação celular, Desenvolvimento embrionário.	3
3	Ciclo celular, Migração celular, Organização e montagem celular.	3

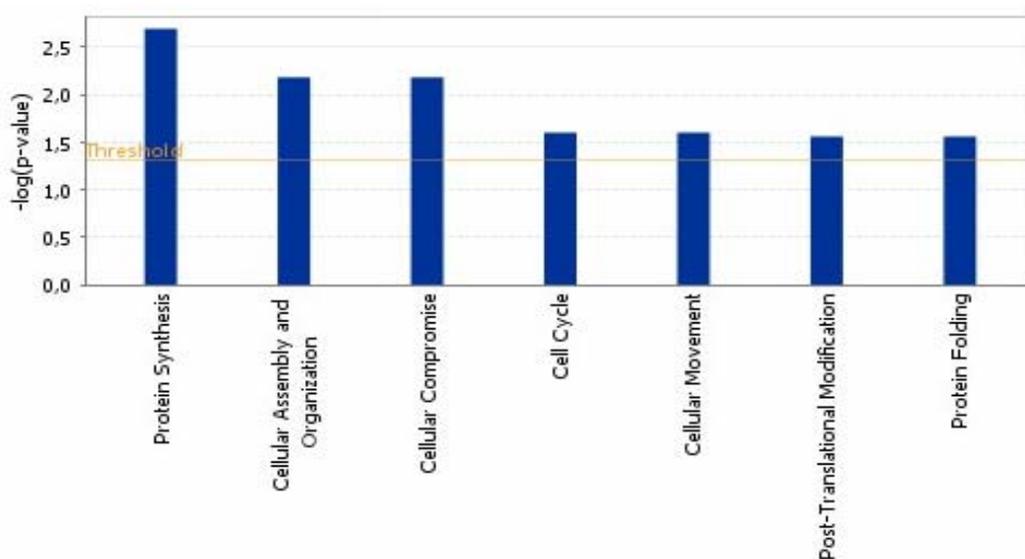


Figura 12 –Vias de sinalização ativadas em células LNCaP submetidas à inibição de ANKHD1. O *limiar* estatístico, (threshold, linha laranja) representa o ponto de corte para significância na escala log (eixo y). As análises foram realizadas no *software* Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems).

As vias de sinalização de síntese protéica, organização e modelagem celular, diferenciação, migração, modificação pós traducional e estruturação protéica se mostraram significativamente moduladas pela análise Ingenuity do microarray de ANKHD1 inibida, como mostram as barras acima da linha de threshold (**figura 12**).

A **tabela 4** evidencia também morte celular e metabolismo de drogas como vias principalmente associadas à inibição de ANKHD1.

A **figura 12** mostra o agrupamento dos genes por classes funcionais segundo o software DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) que utiliza os parâmetros do Gene Ontology (GO) e vias metabólicas KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

As vias de sinalização encontradas pelo DAVID ratificam os resultados da análise feita pelo método Ingenuity uma vez que vias de sinalização como ciclo celular, proliferação, apoptose e migração foram encontradas em ambos os métodos conforme ilustra a **figura 13**:

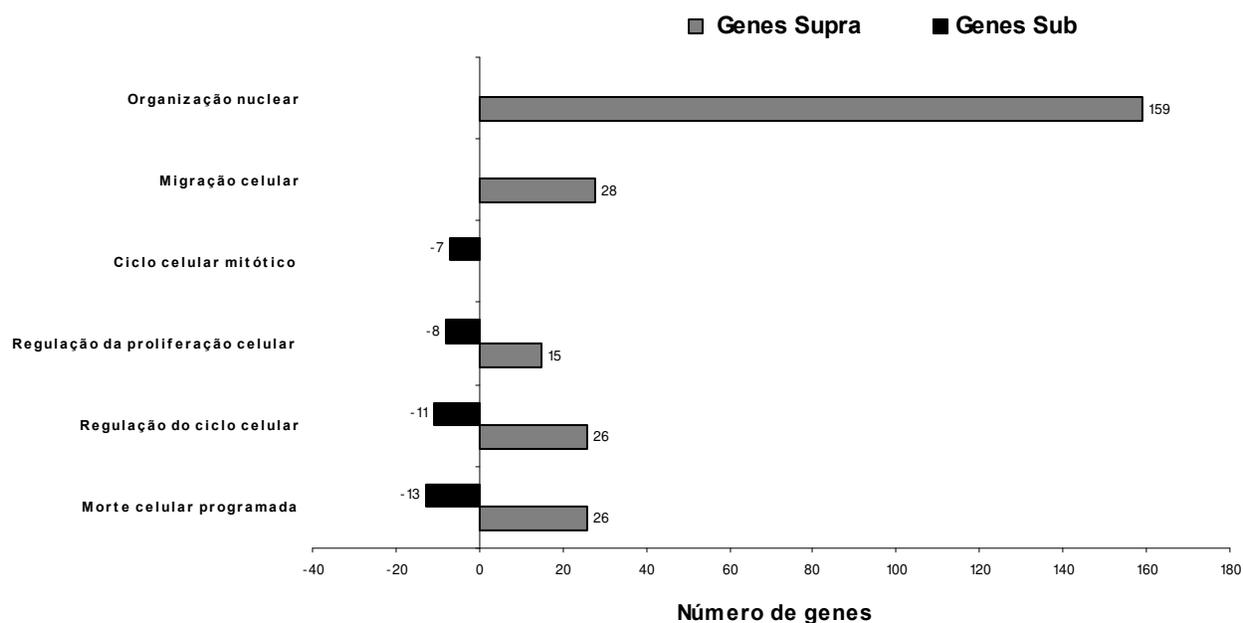


Figura 13: Perspectiva das principais vias de sinalização cuja expressão gênica foi alterada pela inibição de ANKHD1. O perfil de expressão gênica foi gerado pela análise de duas réplicas de amostras do controle e de amostras de células LNCaP inibidas. Os resultados foram analisados pelo Axon GenePix 4000B Scanner software. Só foram considerados genes que possuíam aumento ou diminuição de expressão maior ou igual a 2. As barras cinza e negras representam, respectivamente o número de genes supra e sub-regulados. O número de genes por classe está indicado sobre cada barra.

Como esperado para uma proteína contendo repetições de Anquirina, características de citoesqueleto, foram encontradas alteradas as funções de movimento celular e organização celular.

Mas a análise por microarray revelou também vários genes relacionados com a proliferação celular, morte celular programada e organização da estrutura nuclear como descreve a tabela a seguir (**tabela 5**).

Tabela 5: Genes relacionados às principais vias moduladas pela inibição de ANKHD1. Os genes foram organizados em classes funcionais por Gene Ontology (GO). Os genes em vermelho foram supra regulados. Os genes em verde foram sub-regulados.

<i>Classe Funcional (GO)</i>	<i>Símbolo do gene</i>
Regulação de proliferação celular	<p>IGF1R, ING4, ANAPC5, WWOX, ID2, CDC2L5, CABLES2, EGFR, CCNE1STAT1, RFP2, UBE2V1, LATS2, PTEN, TSC2, EXT1, E2F2, MACF1, TFDP2, ID1, PLCB1, NUSAP1, FLJ14166, DLG5, SUGT1, SPP1, BCL2, EGR4, IRS2, FTH1, JAG2, DLG5, BTG2, NCK2, NRP1</p> <p>DLG1, SIRT2, BUB1, CDC20, GADD45A, DLG7 EREG, BCAR3, ATM, IL8, TGFA.</p>
Morte celular programada	<p>IGF1R, ING4, PIK3R2, MALT1, BNIP2, ZNF346, ZDHHC16, SEMA4D, STAT1, BMF, NFKB1, TP53INP1, GADD45B, PTEN, TRAF3, SIAH1, IHPK2, SPP1, BCL2, SEMA6A, SGK, SGPL1, PHF17, C5, FOXO3A, SOCS3.</p> <p>NME5, ANXA1, NPM1, MX1, GLO1, AMIGO2, GADD45A, TNFSF7, ATM, PHLDA2 CEBPG, FOXO1A, TRIB3.</p>
Controle epigenético	
<ul style="list-style-type: none"> • Organização do Nucleosomo • Formação do complexo de interação proteína DNA • Estabelecimento e manutenção da arquitetura da cromatina • Empacotamento do DNA 	<p>HIST1H2BJ, HIST1H2BB, HIST2H2BE, HIST1H2AC, HIST1H2BK, H2AFZ, HIST2H2AA, HIST1H2AG, HIST1H2AI, HIST1H2AK, HIST1H2AM, HIST1H2AL, HIST1H2AJ, HIST1H2AH, MYST3, H4/O, HIST1H4D, HIST1H4F, HIST1H4I, HIST1H4K, HIST4H4, HIST2H4, HIST1H4L, HIST1H4J, HIST1H4H, HIST1H4E, HIST1H4C, HIST1H4A, HIST1H4B, HIST1H2AB, HIST1H2AE, HIST1H3A, HIST1H3D, HIST1H3C, HIST1H3B, HIST1H3E, HIST1H3G, HIST1H3I, HIST1H3J, HIST1H3H, HIST1H3F, H3/O, HIST1H2BI, HIST2H3C, RP5-998N21.6, HIST1H2BO, HIST1H2BG, HIST1H2BC, HIST1H2BD, HIST1H2BF, HIST1H2BE,</p>

4.1.2-Validação do microarray por qPCR

O agrupamento em classes funcionais é muito importante na escolha dos genes a serem validados, pois na prática, após as correções estatísticas necessárias, muitos genes não encontram o limiar de significância estatística, pois a diferença de expressão real e de relevância biológica é pequena em relação ao ruído do array. (Subramanian et al., 2005)

A priorização da análise de genes altamente modulados por exemplo pode subestimar a importância de que processos celulares ocorrem na atuação conjunta de vários genes e não na atuação individual de um único gene. Portanto o aumento de apenas 20 % na expressão de vários genes de uma mesma via metabólica pode mudar drasticamente esta via, sendo mais importante que um aumento de 20 vezes em um único gene sem nenhuma associação biológica (Subramanian et al., 2005). Sendo imprescindível portanto o bom senso do pesquisador, suas hipóteses e resultados preliminares no momento da escolha dos genes a serem validados.

Os genes de expressão modulada no array e escolhidos para serem validados por qPCR foram genes relacionados à proliferação, regulação do ciclo celular e morte celular programada. Esta escolha foi feita baseada na significância encontrada nas classes funcionais do array e em resultados prévios do nosso laboratório, que indicaram atuação de ANKHD1 na apoptose (Fabíola Traina, tese de doutorado), endossados pelos resultados de Miles et al (2005) que propõem que ANKHD1 é uma proteína anti-apoptótica.

Foram escolhidos 25 genes para serem validados, sendo 19 supra-regulados: *BMF*, *BCL2*, *STAT1*, *PTEN*, *SIAH1*, *PIK3R2*, *SOCS3*, *TP53INP1*, *GADD45B*, *IHPK2*, *BNIP2*, *NFKB1*, *MALT1*, *TRAF3*, *PHF17*, *ZDHHC16*, *SGPL1*, *ING4*, *FOXO3A*, e 6 sub-regulados: *FOXO1A*, *CEBPG*, *GLO1*, *NPM1*, *AMIGO2* e *MX1*.

Para a validação foram desenhados primers no software Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), flanqueando exons diferentes e que contemplassem todas as isoformas dos genes escolhidos (Tabela Anexo II). As reações foram padronizadas para obter-se amplificação com eficiência de 100 % e em seguida foram utilizados na amplificação por qPCR das mesmas amostras submetidas ao array para validação (**Figura 14**).

Validação do Microarray por Real time

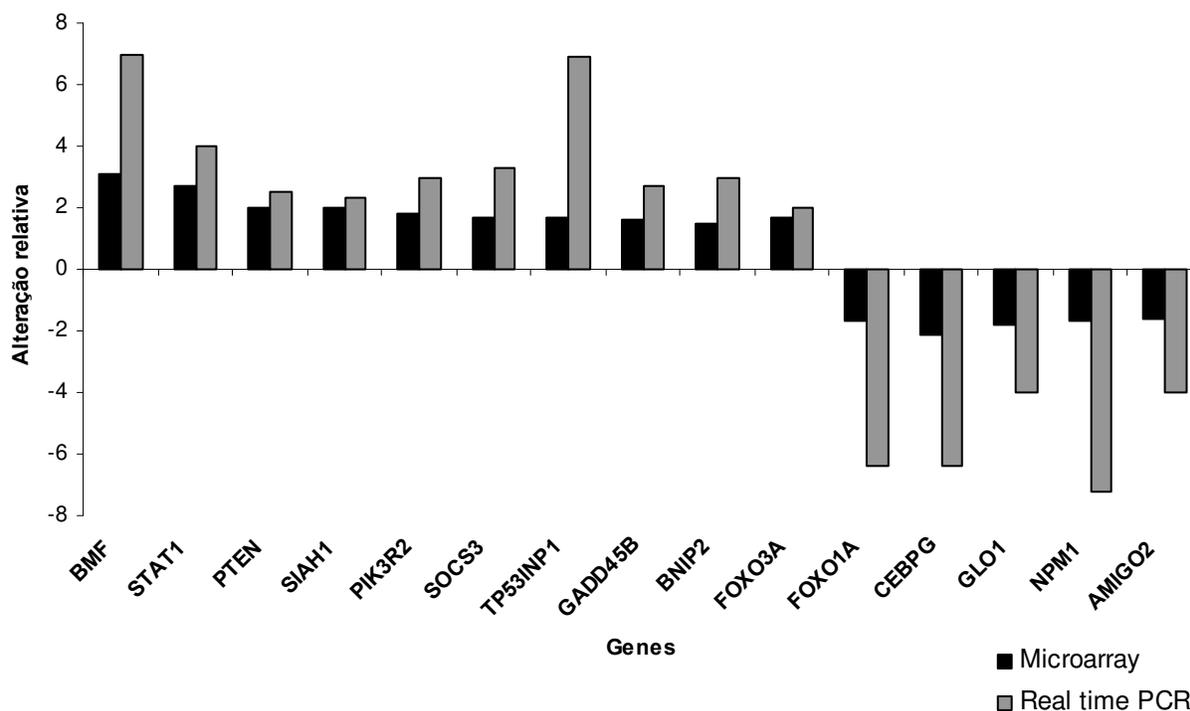
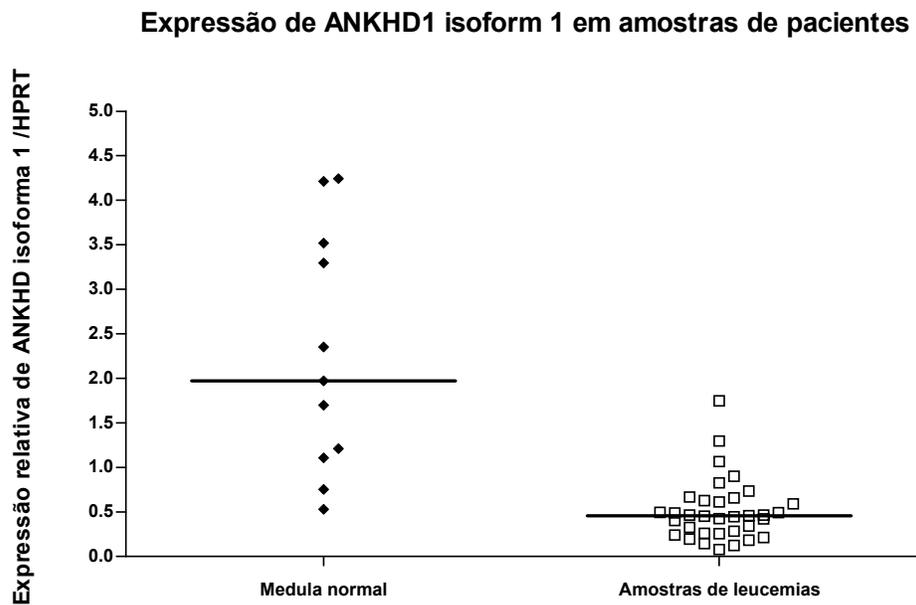


Figura 14: Validação do Codelink array por qPCR. A figura mostra os genes cuja modulação observada no array foi confirmada por qPCR. Genes supra-regulados têm barras voltadas para cima e os genes sub-regulados têm barras voltadas para baixo. Barras em preto representam a alteração relativa ao controle encontrada no array e barras cinza representam a alteração relativa a GAPDH encontrada por qPCR.

Dos 25 genes escolhidos para validação, 15 mostraram modulação por Real time (60%), sendo eles: *BMF*, *STAT1*, *PTEN*, *SIAH1*, *PIK3R2*, *SOCS3*, *TP53INP1*, *GADD45B*, *BNIP2*, e *FOXO3A* (supra-regulados) e *FOXO1A*, *CEBPG*, *GLO1*, *NPM1*, *AMIGO2* (sub-regulados) como mostra a **figura 14**. Como essas modulações foram observadas em LNCaP, fez-se necessário observar também em leucemias se estes genes teriam padrão de expressão associado ao de ANKHD1 como explicita o item a seguir.

4.1.3 Validação do array em amostras de portadores de leucemia aguda.

No intuito de melhor conhecer a atuação de ANKHD1 na leucemogênese, um banco de RNAs de amostras de medulas ósseas de pacientes com leucemia aguda, segundo os critérios FAB, colhidas ao diagnóstico, e contendo mais de 80% de blastos, foi analisado por qPCR quanto à expressão das duas isoformas de *ANKHD1* inibidas no array (**figura 15**).



de ANKHD1 em amostras de LNCaP. A expressão de SIAH não mostrou diferença significativa entre medula óssea normal e amostras de pacientes com leucemia (dados não apresentados), ao contrário de BMF, como mostra a **figura 16**

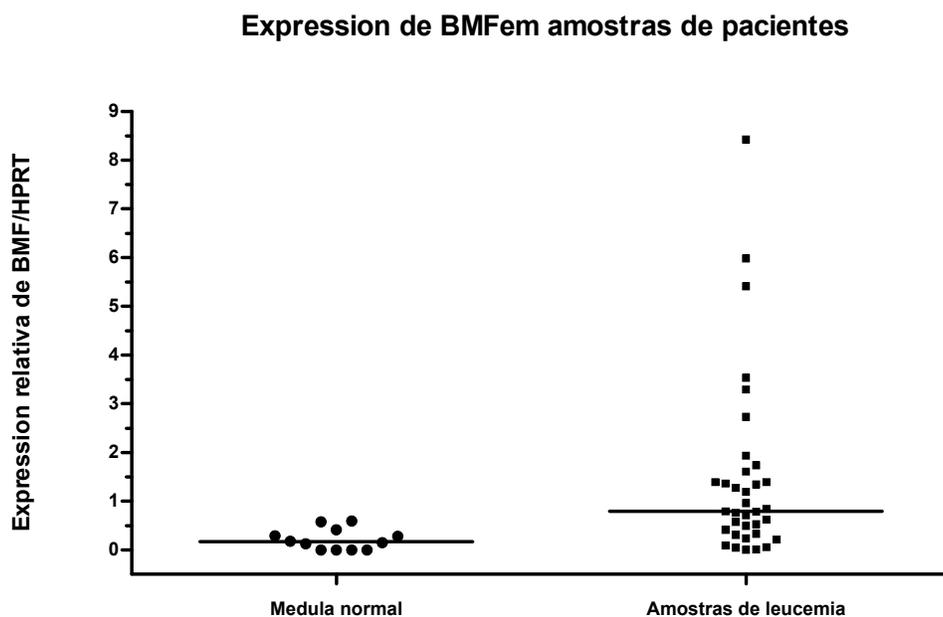


Figura 16: Expressão do RNAm de BMF em células leucêmicas de pacientes. O qPCR - foi realizado a partir de RNAm proveniente de células mononucleares de medula óssea de pacientes com diagnóstico de leucemia aguda (n=38) ou de células de medulas ósseas normais (n=12). O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão do RNAm de *ANKHD1* pelo controle endógeno *HPRT*. As linhas horizontais representam a mediana de expressão de cada grupo. Observa-se que a expressão do RNAm de *BMF* foi significativamente mais alta em amostras de pacientes com leucemia aguda do que em amostras de medulas ósseas normais (Mann-Whitney test $p < 0.001$).

Estes resultados, além de reproduzirem o resultado do array, baixa expressão de *ANKHD1* associada à alta expressão de *BMF* (**Figura16**), indicam uma relação significativa da expressão de ANKDH1 e *BMF* nas leucemias.

4.2 Hipexpressão de ANKHD1 em linhagens tumorais

A outra abordagem experimental utilizada neste trabalho para avaliar a atuação de ANKHD1 foi a hiperexpressão de suas isoformas em linhagens tumorais como HEK293T (Human Embryonic Kidney 293 cells), HeLa (câncer cervical) e Jurkat (leucemia linfóide T). Esta parte do trabalho foi realizada em parceria com o Institute Cochin (Université Paris V, René Descartes), como doutorado sanduíche ,sob a coorientação do Dr. Serge Benichou.

A hiperexpressão desta proteína se mostrou um procedimento de difícil execução e verificação: ANKHD1, como muitos dos genes recém caracterizados, ainda não possui bons anticorpos que permitam a detecção da proteína, dificultando assim verificar os níveis de expressão ectópicos alterados pela transfecção.

A transfecção estável de ANKHD1 foi tentada sem sucesso diversas vezes ao longo deste projeto, o tamanho do inserto 8,2Kb e da proteína 270 kDa podem ser fatores que tornaram esse processo extremamente difícil de ser executado.

4.2.1 Localização subcelular das isoformas de ANKHD1

Após a transfecção as células HeLa foram coletadas, fixadas e incubadas com os anticorpos HA e V5 para determinar a localização subcelular das isoformas 1 e 2 de ANKHD1, respectivamente.

A **figura 17** mostra a sublocalização de ANKHD1 isoforma 1

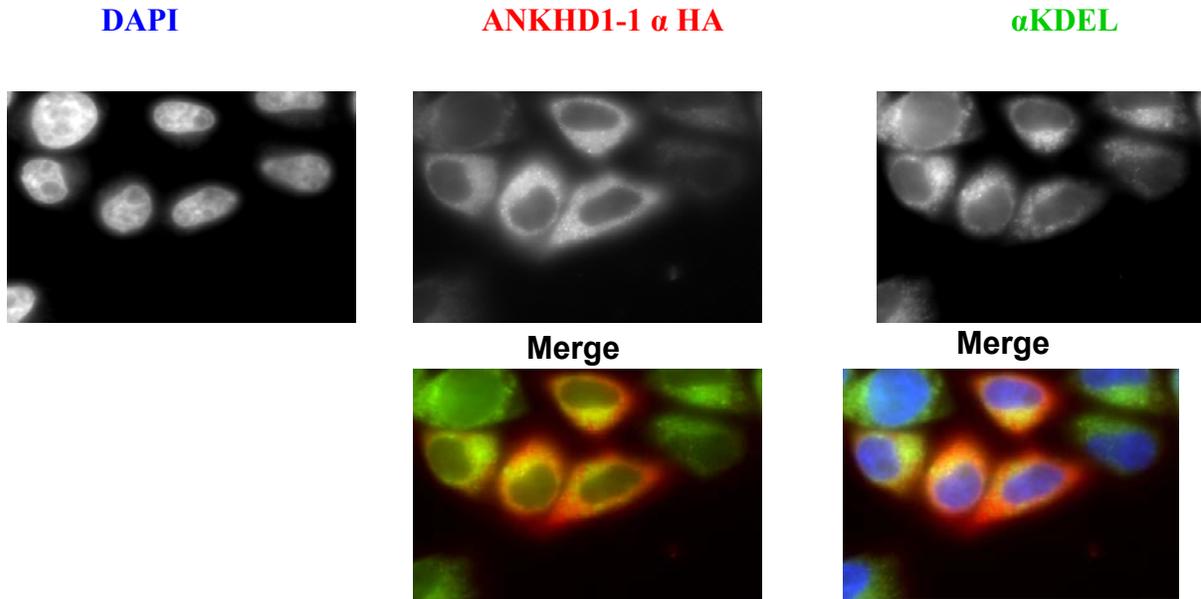


Figura 17: Imunolocalização fluorescente da isoforma 1 de ANKHD1 hiperexpressa em células HeLa: ANKHD1 pode ser visualizada pela marcação com o anticorpo anti-HÁ (rato, vermelho, A555) e o retículo endoplasmático com anticorpo α Kdel (ovelha, verde, A488), marcador de retículo endoplasmático. DAPI é o marcador nuclear evidenciado em azul. A reação de imunofluorescência foi visualizada em microscópio confocal a laser (Zeiss LM510). Observa-se na sobreposição das imagens (merge) a localização citoplasmática de ANKHD1, concentrada no retículo que circunda o núcleo (em amarelo).

A localização citoplasmática da isoforma 1 de ANKHD1 já tinha sido descrita (Traina et al., 2006) porém sua aparente sublocalização citoplasmática no retículo, especialmente em torno do núcleo, ainda precisa ser mais bem caracterizada, usando drogas

capazes de impedir a saída de proteínas do retículo e assim confirmar a presença desta no retículo. Marcação com anticorpos específicos para o complexo de golgi (α TGN) também foram feitas mas não houve colocalização com ANKHD1 (dados não apresentados).

A **figura 18** mostra a sublocalização de ANKHD1 isoforma 2:

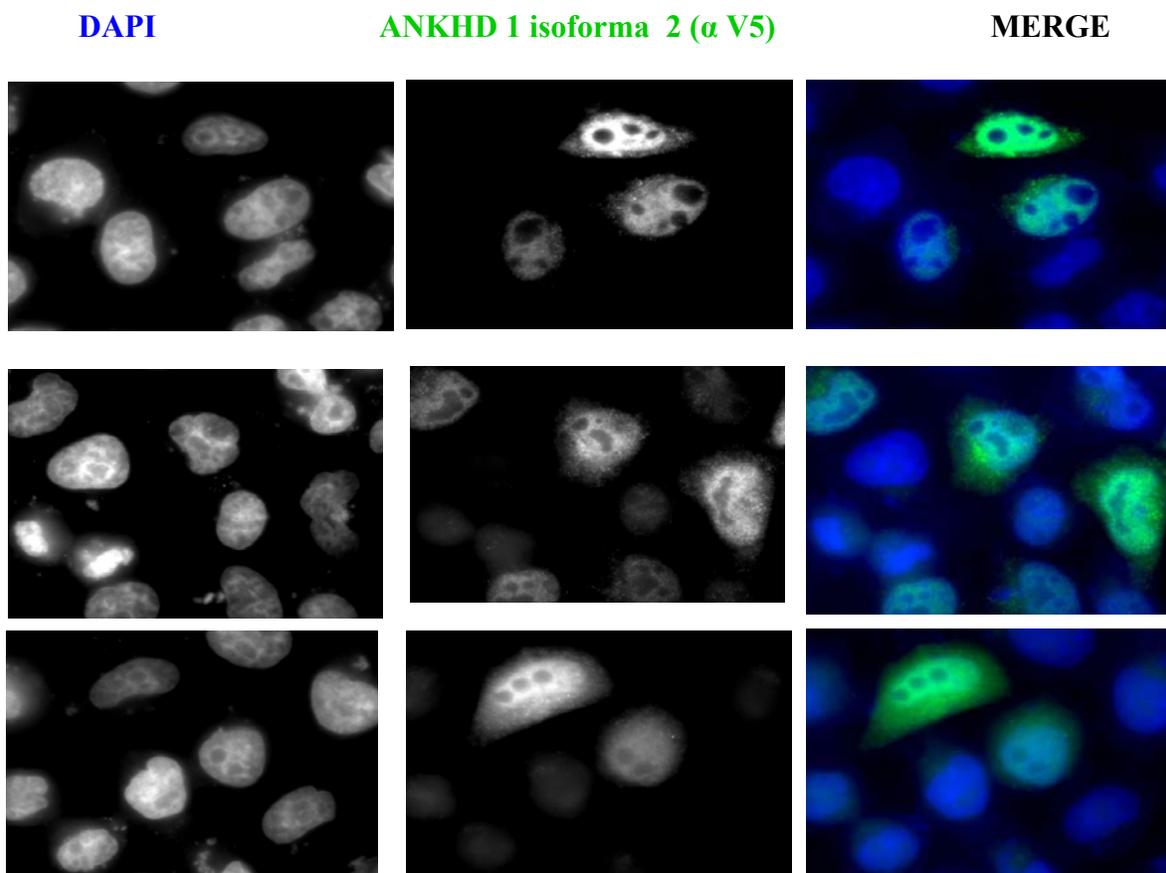


Figura 18: Imunolocalização fluorescente da isoforma 2 de ANKHD1 hiperexpressa em células HeLa. ANKHD1 isoforma 2 pode ser visualizada pela marcação com o anticorpo anti-V5.(mouse, verde, A488). DAPI é o marcador nuclear evidenciado em azul.. A reação de imunofluorescência foi visualizada em microscópio confocal a laser (Zeiss LM510). Observa-se na sobreposição das imagens (merge) a localização predominantemente nuclear da isoforma 2 de ANKHD1.

Até agora não tinha sido relatada nenhuma isoforma de ANKHD1 no núcleo, porém esta descoberta corrobora todas as previsões *in silico* feitas até então sobre a localização de ANKHD1 .

Segundo a análise feita pelo software “Predict NLS online software” (<http://cubic.bioc.columbia.edu/cgi/var/nair/resonline.pl>) ANKHD1, seria uma proteína nuclear, com grande probabilidade de se ligar ao DNA (90,15%) segundo previsão do mesmo site.

ANKHD1 possui algumas sequências NLS (nuclear localization sequence) mostradas na **Tabela 6** e proteínas que possuem NLS são geralmente capazes de serem transportadas do citoplasma para o núcleo através do complexo de poro nuclear.

A análise feita pelo software NetNES1.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>) descreve um sinal nuclear de exportação (NSE) na sequência de ANKHD1 (**figura 19**). Sinais NSE são encontrados em proteínas com a habilidade de transitar do núcleo para o citoplasma .

Tabela 6: Sequência de aminoácidos de sinal nuclear (NLS) encontradas em ANKHD1 isoforma 1.

NLS encontradas na sequência de ANKHD1	Posição da NLS na sequência de ANKHD1
KRKEKRKK	1454
RKEKRKKKK	1455
RKKKKE	1459
KRKEKRKKKKKEEQKRK	1454
RKEKRKKKKE	1455
PKRGQKR	1679

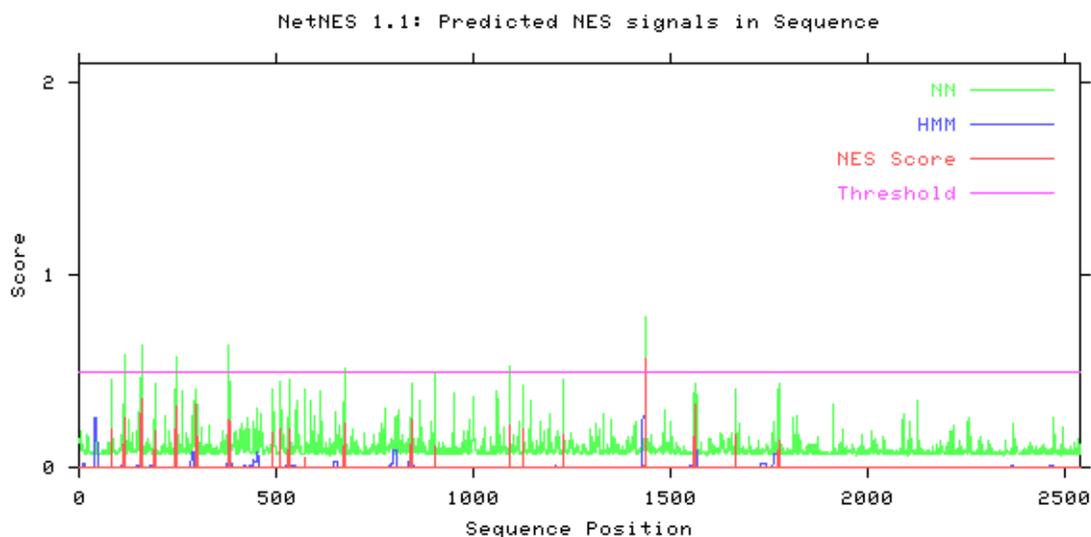


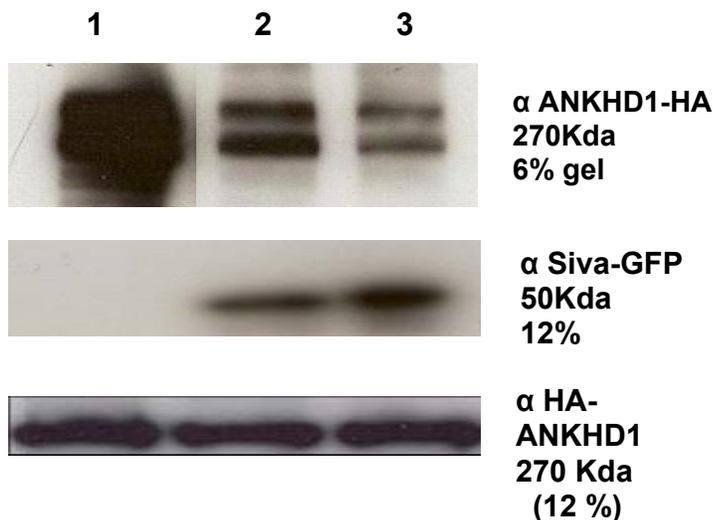
Figura 19: Presença de um sinal de exportação nuclear na isoforma 1 de ANKHD1. A presença da NES está indicada pelo pico vermelho acima do threshold no gráfico. A última posição hidrofóbica da NES encontrada está no aminoácido 1437 de ANKHD1 isoforma 1 (Leucina). (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>)

Estes resultados sugerem, juntamente com a sublocalização nuclear agora relatada, que ANKHD1 seja uma proteína capaz de transitar entre citoplasma e núcleo, porém na sequência protéica da isoforma 2 não foram encontradas NLS ou NES. De forma que a presença da isoforma 2 no núcleo deve estar associada a NLS não características e a ausência de NES em sua sequência explicaria a sua permanência no núcleo.

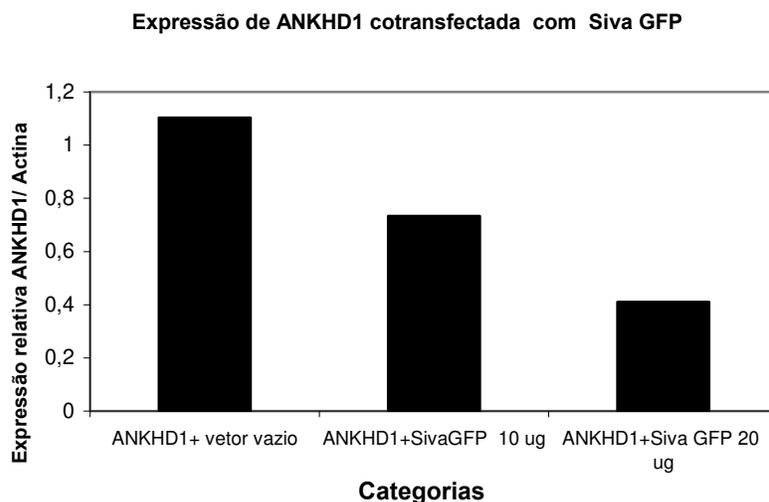
4.2.2.-:Avaliação do efeito de Siva e Vpr na expressão protéica de ANKHD1 isoforma 1

As proteínas SIVA e Vpr interagem fisicamente com as isoformas de ANKHD1 (Traina, tese de doutorado; Miles et al., 2005); nas figura 20 e 21 mostramos o resultado da cotransfecção de Siva e ANKHD1 isoforma 1 em linhagem HEK 293T

(A)



(B)



- 1) ANKHD1 isoforma 1 +20 µg pcDNA3
- 2) ANKHD1 isoforma 1 + 10 µg Siva GFP+10 µg pcDNA3
- 3) ANKHD1 isoforma 1 + 20 µg Siva GFP

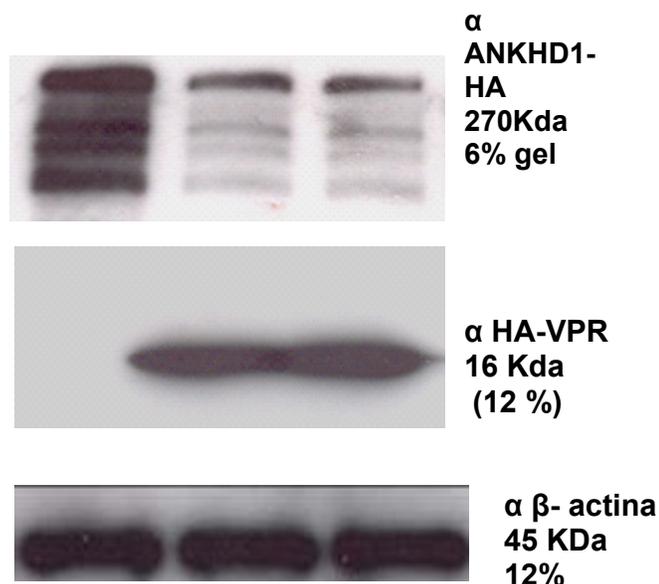
Figura 20: Western Blotting da Contransfecção de ANKHD1 e Siva em células HEK 293T. As células foram transfectadas com as seguintes construções e doses (1) 20 µg de ANKHD1 isoforma 1e 20 µg de vetor pCDNA3 (2) 20 µg de ANKHD1 isoforma 1 e 10 µg µg de Siva-GFP (3) 20 µg

ANKHD1 isoforma 1e 20 µg de Siva-GFP. **(A)** O painel mostra o anticorpo HA ligado a ANKHD1 (270 Kda), onde se vê diminuição da expressão de ANKHD1 quando transfectada com Siva GFP (50 KDa). Nota-se também que Siva transfecta mais fortemente na dosagem 20 µg e nesta concentração inibe mais fortemente ANKHD1. A actina (45 KDa) foi utilizada como controle de expressão relativa. **(B)** O gráfico mostra a quantificação das bandas do blot por densitometria.

As duas concentrações de Siva-GFP diminuíram a expressão de ANKHD1: a concentração de 10 µg diminuiu 34% e a concentração de 20 µg diminuiu em 63%.

Na **figura 21** apresentamos o resultado da cotransfecção de ANKHD1 isoforma 1 e Vpr-HA em linhagem HEK 293T, variando a concentração do agente transfectante fosfato de cálcio para averiguar se a diminuição de expressão observada não era devida a competição pelo reagentes, causando maior transfectabilidade de um dos plasmídeos.

(A)



(B)

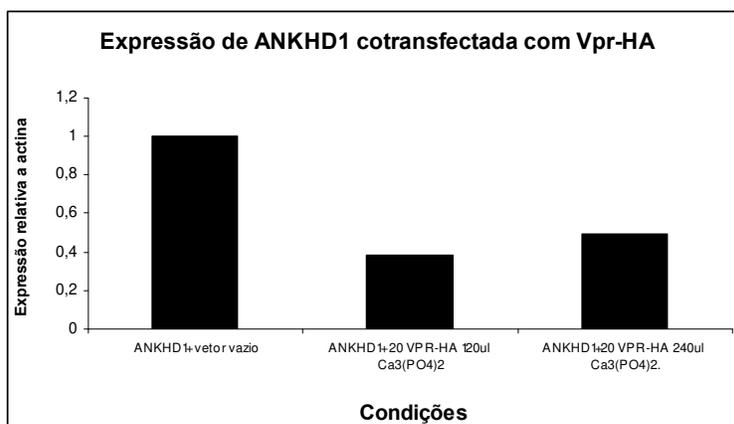


Figura 21: Western Blotting da Co-transfecção de ANKHD1 e VprHA em células HEK 293T.

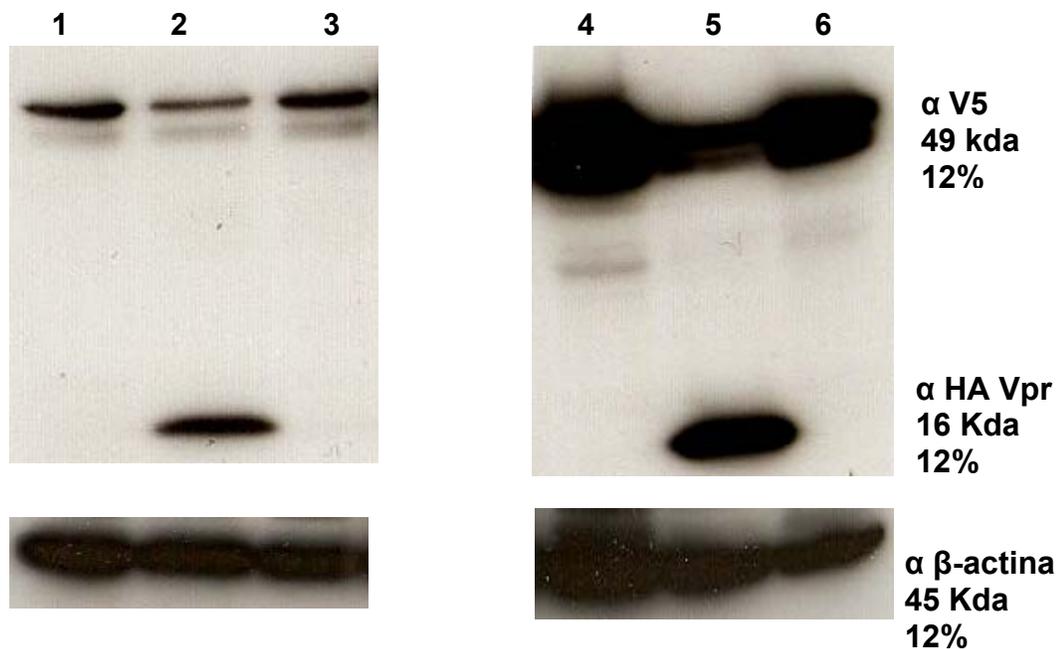
As células foram transfectadas com as seguintes construções e concentrações (1) 20 μ g de ANKHD1 isoforma 1 e 20 μ g de vetor pCDNA3 (2) 20 μ g de ANKHD1 isoforma 1 e 20 μ g de Vpr-HA 120 μ l Ca₃(PO₄)₂ 1M (3) 20 μ g de ANKHD1 isoforma 1 e 20 μ g de Vpr-HA 240 μ l Ca₃(PO₄)₂ 1M. (A) O painel mostra o anticorpo HA ligado a ANKHD1 (270 Kda), onde se vê diminuição da expressão de ANKHD1 quando transfectada com Vpr-HA (16 KDa) Nota-se também que Vpr transfectou suficientemente bem nas duas concentrações de Ca₃(PO₄)₂ e ambas as condições mostraram diminuição da expressão de ANKHD1. A actina (45 KDa) foi utilizada como

controle de expressão relativo. **(B)** O gráfico mostra a quantificação das bandas do blot por densitometria.

Observamos pela **figura 21** que Vpr-HA diminui a expressão de ANKHD1 em cerca de 50 %, independente da dose $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ usada na transfecção.

4.2.3-:Avaliação do efeito de Vpr na expressão protéica de isoforma 2 de ANKHD1

(A)



(B)

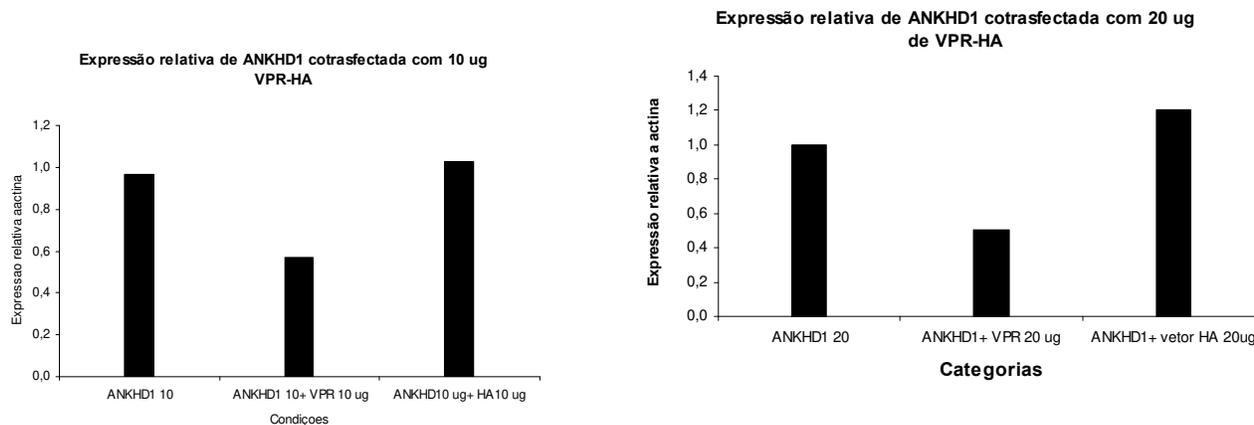


Figura 22: Western Blotting de células HEK 293T transfectadas com ANKHD1 isoforma 2 e Vpr HA (A) As células foram transfectadas com as seguintes construções e concentrações (1) 10 μ g ANKHD1 isoforma 2 (2) 10 μ g de ANKHD1 isoforma 2 e 10 μ g Vpr-HA, (3) 10 μ g de ANKHD1 isoforma 2 e 10 μ g HA, (4) 20 μ g de ANKHD1 isoforma 2, (5) 20 μ g de ANKHD1 isoforma 2 e 20 μ g Vpr-HA , (6) 20 μ g de ANKHD1 isoforma 2 (A) O painel mostra o anticorpo V5 ligado a

ANKHD1 isoforma 2 (49 Kda), onde se vê diminuição da expressão de ANKHD1 quando transfectada com Vpr-HA (16 KDa) nas colunas 2 e 5 (**B**) Os gráficos mostram a quantificação das bandas dos blots por densitometria.

Observou-se pela **figura 22 (blotts e gráficos)** que Vpr-HA também diminui a expressão da isoforma 2 de ANKHD1 As colunas 2 e 5 do blot mostram a evidente diminuição da expressão da isoforma menor quando transfectada com Vpr-HA, nas duas concentrações de plasmídeo Vpr-HA utilizadas na co-transfecção com ANKHD1, sendo que com 10 µg houve diminuição de 40 % e com 20 µg Houve diminuição de 50 % da expressão de ANKHD1.

4.2.4 Localização de ANKHD1 isoformas 1 e 2 co-transfectadas com Vpr:GFP

Ao hiperexpressar as isoformas 1 e 2 de ANKHD1 conjuntamente com Vpr-GFP, observamos frequentemente presença maior desta última no citoplasma (**Figuras 23 e 24**)

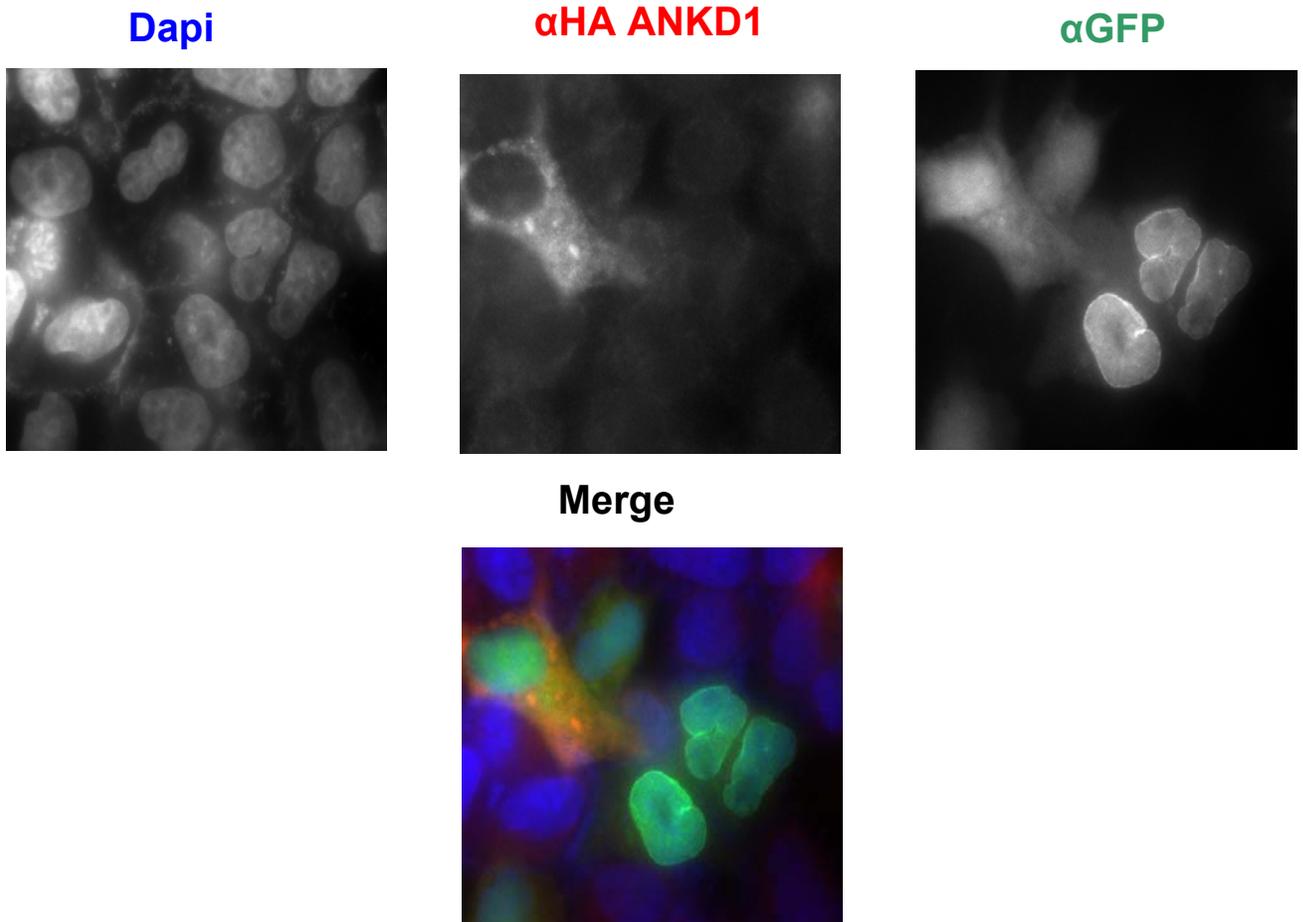


Figura 23: Imunolocalização fluorescente de Vpr em presença de ANKHD1 isoforma 1. Em células HeLa transfectadas com ANKHD1 e Vpr-GFP. A isoforma 1 é visualizada no citoplasma em vermelho (α HA, rato, vermelho A555). A Vpr (verde), característica por sua concentração nuclear, mostra-se mais citoplasmática quando co-transfectada com a isoforma 1 de ANKHD1. O núcleo é evidenciado em azul pelo marcador DAPI.

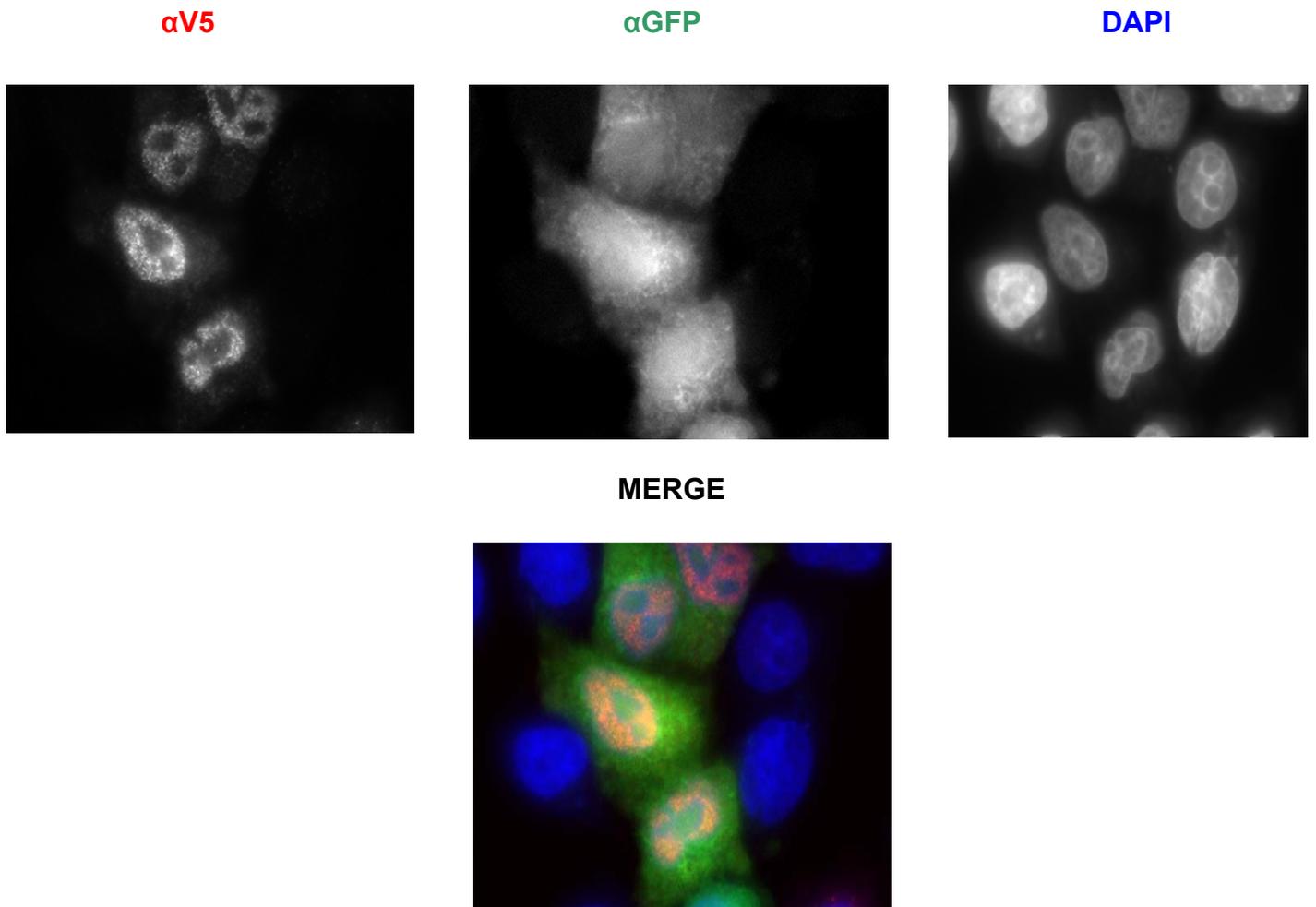


Figura 24: Imunolocalização fluorescente de Vpr em presença de ANKHD1 isoforma 2. Em células HeLa co-transfectadas com ANKHD1 e Vpr-GFP, a isoforma 2 é visualizada no núcleo em vermelho ($\alpha V5$, mouse, vermelho A555) e a Vpr (verde), caracteristicamente nuclear, como se vê na figura 23, mostra-se mais citoplasmática .

4.2.5 Ensaio funcional de apoptose.

Como explicitado anteriormente, a isoforma 1 de ANKHD1 é dificilmente transfectada, por isso a maior parte das hiperexpressões aqui apresentadas foram obtidas em células aderentes (HEK293T, HeLa) utilizando $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e lipofectamina, modelos de reconhecida transfectabilidade.

Porém células aderentes não são um bom modelo para estudo de morte celular pois a simples necessidade de tripsinização, logo antes da mensuração das taxas de apoptose, leva a aumento de apoptose.

Por isso, no experimento que se segue, transfectamos células Jurkat (**figura 26**), linhagem de células T em suspensão, utilizando tecnologia AMAXA[®] nucleofector[®] de eletroporação, com ANKHD1 Isoforma 2 (isoforma menor), afim de mensurar as taxas de apoptose associadas.

Como ANKHD1 isoforma 2 não possui epítipo GFP, esta construção foi co-transfectada com a construção pEGP-C1 numa concentração 3x menor que a construção ANKHD1 isoforma 2, para nos certificarmos que cada vez que mensuramos GFP positivo, houvesse maior chance estar mensurando células realmente ANKHD1 positivas. O controle utilizado foi a transfecção com a construção pEGP-C1 apenas.

Simultaneamente cotransfectamos também Siva1-GFP com ANKHD1, sendo que Siva é descrita como indutora de apoptose em célulasT (Py et al., 2004), usando como controle a transfecção de Siva-GFP sozinha.

Todas as transfecções foram feitas em réplicas tratadas com o indutor de apoptose em células T, Camptotecina $5\mu\text{M}$, durante 5 horas. Células Jurkat eletroporadas sem vetor foram utilizadas como controle para avaliação da viabilidade celular (**figura 25**).

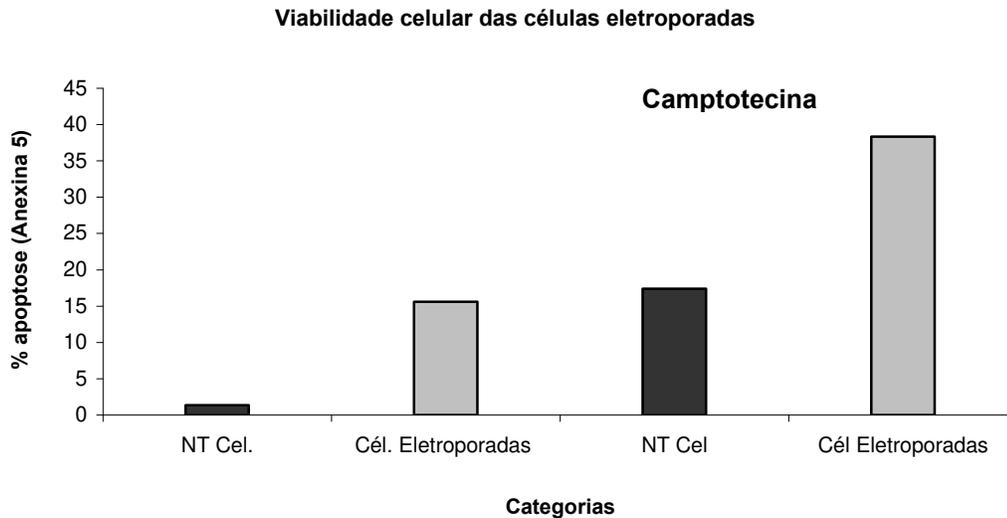


Figura 25: Taxas de apoptose celular em Jurkat após eletroporação e tratamento com camptotecina. As células foram coletadas 24 horas pós transfecção e 5 horas depois do tratamento com a droga indutora de apoptose **Camptotecina**. O eixo “y” representa a percentagem de células anexina V positivas sobre o número total de células. **NT** representam as células não eletroporadas e **Eletroporadas** as células que receberam apenas o choque da eletroporação.

A comparação da barra negra com as barra cinza sem o tratamento com camptotecina indica que a eletroporação sozinha já induz aumento considerável de morte celular (aumento de 14%).

A comparação entre as condições tratada ou não tratada com camptotecina, mostram que o tratamento aumenta as taxas de apoptose de 16% em células não transfectadas e em 23 % na células eletroporadas.

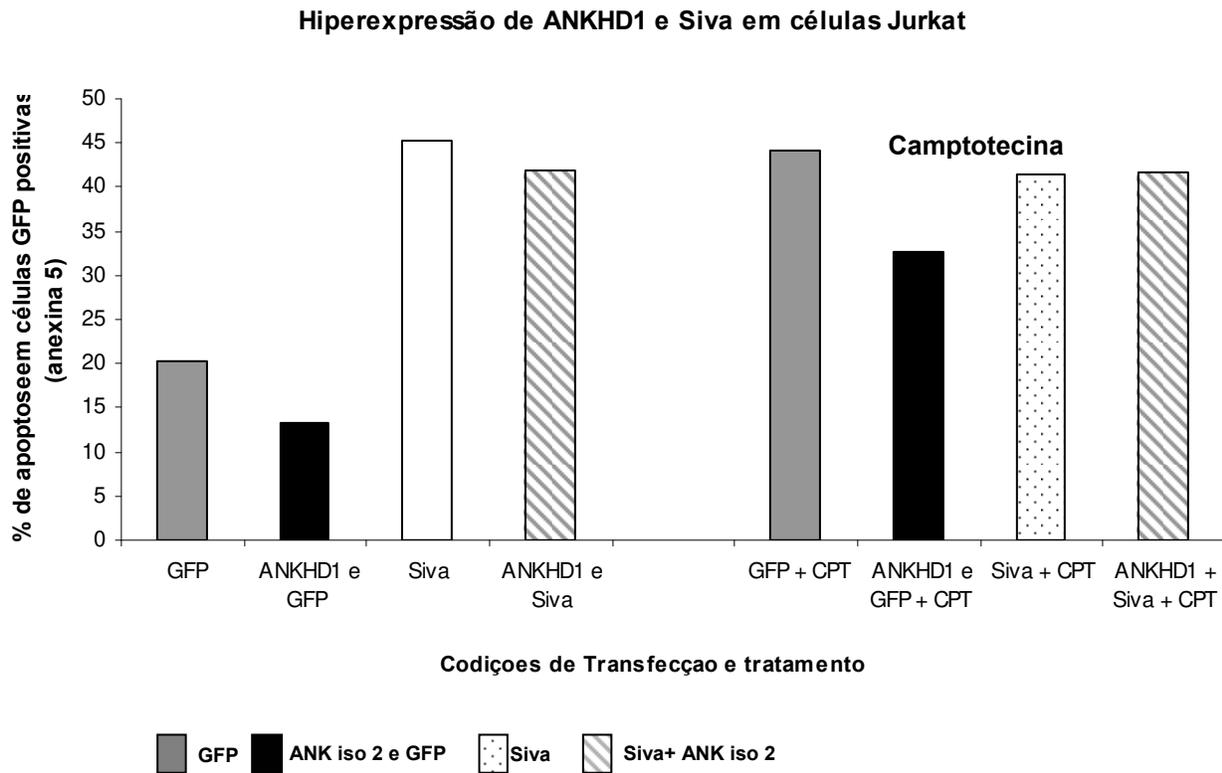


Figura 26: Taxas de apoptose celular após hiperexpressão de ANKHD1 isoforma 2 e Siva-GFP em Jurkat. As células foram coletadas 24 horas pós transfecção e 5 horas depois do tratamento com a droga indutora Camptotecina. O eixo “y” representa a percentagem de células anexina V positivas sobre o número total de células GFP positivas.

Estes resultados sugerem uma efeito anti-apoptótico nas células transfectadas com a isoforma 2 de ANKHD1 de 7 a 12 %, se compararmos as taxas de apoptose em GFP e ANKHD1 isoforma 2 e GFP e ANKHD1 isoforma 2 tratados com camptotecina respectivamente (**figura 26**).

As células T transfectadas com Siva sofreram 25% de apoptose e a camptotecina não foi capaz de aumentar estas taxas, nem ANKHD1 foi capaz de diminuir (figura 26). Se considerarmos que mesmo camptotecina sozinha consegue induzir um aumento máximo de 23% nas taxas de apoptose (figura 25), a pequena diminuição de taxas de apoptose (7 a 12%) induzidas por ANKHD1 pode ser significativa, porém faz-se necessário mais repetições e testes estatísticos para confirmar esta hipótese.

4.3 Expressão de ANKHD1 em células hematopoiéticas submetidas a agentes terapêuticos.

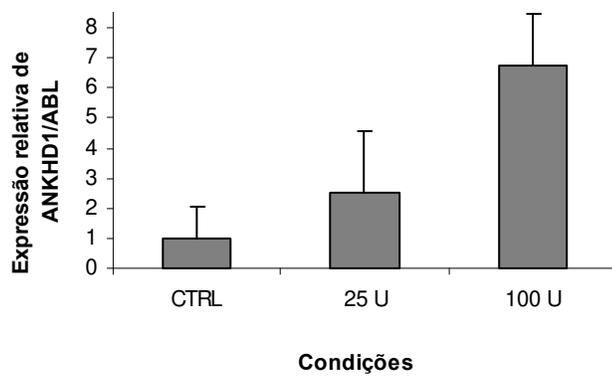
4.3.1 Tratamento com Interferon α

Interferon α (IFN α) é uma droga reconhecida pelos seus efeitos inibidores de proliferação tumoral. Os mecanismos de atividade dos IFNs tipo I, como o interferon α foram por muito tempo conhecidos principalmente pela sua capacidade de suprimir proliferação e angiogênese tumoral (Pfeffer, 1997; Sidky e Borden, 1987). Estas citocinas podem promover diretamente apoptose em células estromais e tumorais e inibir angiogênese pela diminuição da expressão de fatores pro-angiogênicos em tumores.

Para investigar se IFN α tem um efeito regulatório na expressão de ANKHD1 em linhagens leucemicas, KG1, HL60 (linhagens de origem mielóide) e Jurkat ((linhagen de origem linfóide) foram tratadas com diferentes doses de Interferon α e os níveis de expressão do RNAm de ANKHD1 foram analisados por qPCR (**figura 27**).

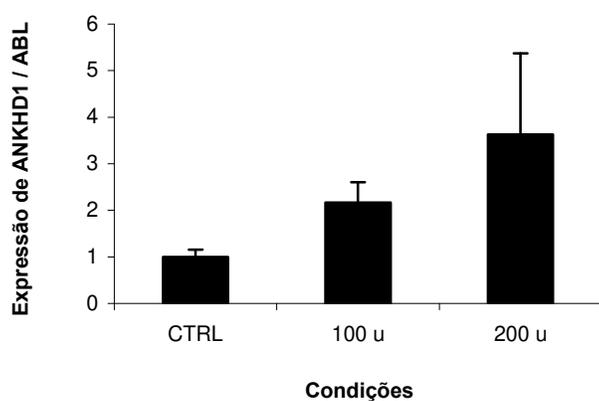
(A)

KG1 tratada com Interferon α



(B)

Jurkat com Interferon α



(C)

HL60 tratada com Interferon α

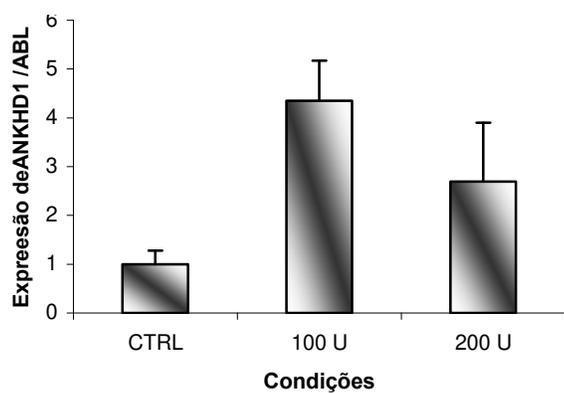


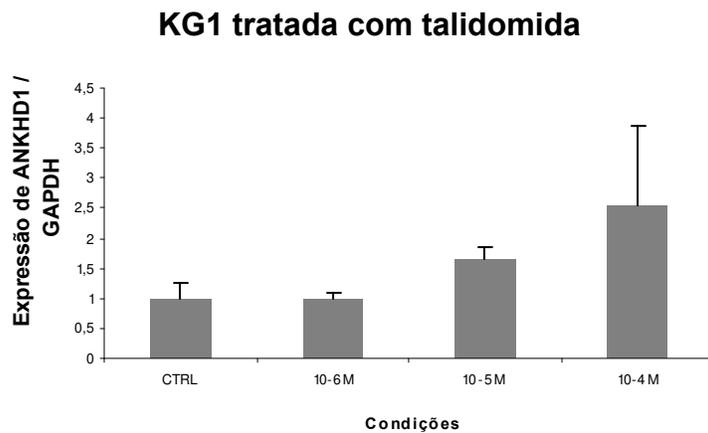
Figure 27. Efeito de Interferon α na expressão de ANKHD1 em linhagens leucêmicas. KG1 (A), Jurkat (B) or HL60 (C). As células foram cultivadas até a fase exponencial e tratadas com as doses 25, 100 or 200 U/mL de IFN α por 18 horas. Os níveis de RNA de ANKHD1 e do controle endógeno ABL gene foram quantificados por qPCR. Estes resultados mostram a expressão de ANKHD1 relativa à expressão de ABL (média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes).

Foi observado um aumento dose dependente da expressão de ANKHD1 tanto na linhagem KG1 como na linhagem Jurkat tratadas com doses crescentes de Interferon α (**figura 27 A e B**), enquanto que na linhagem HL60 observou-se uma resposta intensa na dose 100 U/mL de interferon α e um aumento intermediário na concentração de 200 U/mL. Estes resultados em conjunto indicam que IFN- α induz aumento da expressão do mRNA de ANKHD1 em linhagens leucêmicas.

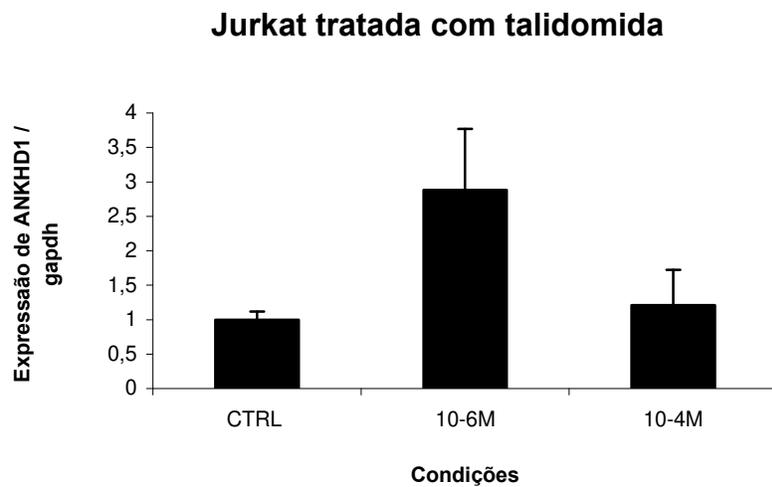
4.3.2 Tratamento com Talidomida .

A Talidomida tem muitas propriedades, mas seus mecanismos de ação não são ainda bem conhecidos. Além de sua reconhecida atividade anti-angiogênica, ela inibe também a produção de TNF- α , estimula proliferação de células T, induz secreção IFN γ e de IL-2, e é capaz de reduzir apoptose em células de síndrome mielodisplásica (SMD). (D'Amato et al., 1994; Haslett et al., 1998; Invernizzi et al., 2005; Klausner et al., 1996)). Em face destes efeitos no controle de proliferação celular, utilizamos concentrações crescentes de talidomida no tratamento de linhagens celulares leucêmicas afim de observar modulações potenciais de expressão em ANKHD1 (**figura 28**).

(A)



(B)



(C)

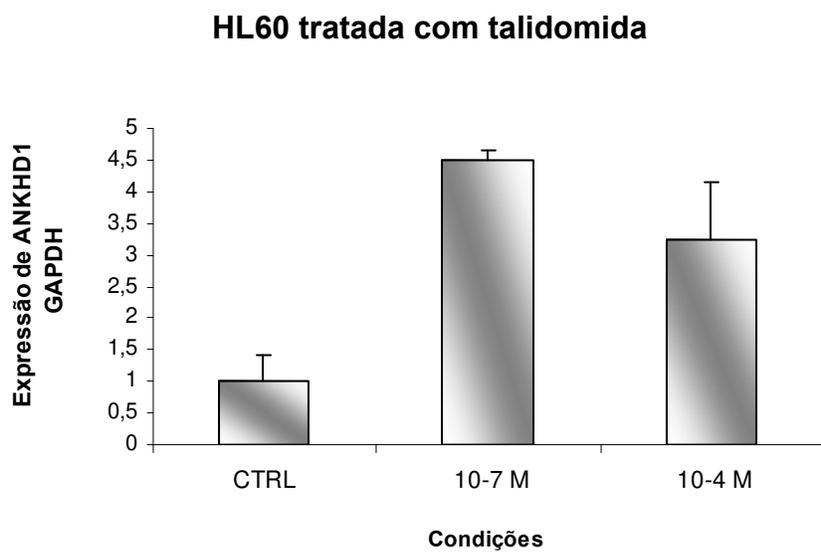


Figure 28. Efeito de talidomida na expressão de ANKHD1 em linhagens de leucêmicas KG1 (A), Jurkat (B) and HL60 (C) As células foram cultivadas até a fase exponencial e tratadas com as seguintes doses 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} or 10^{-7} M por 16 horas. Os níveis de RNA de *ANKHD1* e do controle endógeno *GAPDH* foram quantificados por qPCR. Estes resultados mostram a expressão de *ANKHD1* relativa à expressão de *GAPDH*, e correspondem à média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes.

Como se vê pela **Figura 28**, a expressão de ANKHD1 foi aumentada nas três linhagens de leucemia analisadas. O aumento induzido por talidomida foi dose dependente em KG1, com efeito máximo na concentração de 10^{-4} M (**Figura 28A**). Contudo, nesta dose, não houve efeito significativo em Jurkat (**figura 28B**) e apenas um leve aumento foi observado em células HL60 (**Figura 28C**) na concentração 10^{-4} M. Curiosamente, o efeito máximo do tratamento com talidomida foi observado nas concentrações mais baixas para Jurkat e HL60 (10^{-6} M and 10^{-7} M, respectivamente). Estes resultados podem estar associados à diferença de sensibilidade destas linhagens em relação a talidomida. Altas concentrações de talidomida como 10^{-4} M poderiam resultar em indução de morte celular para as linhagens Jurkat e HL60, o mesmo não acontecendo com KG1 devido à sua maior resistência à apoptose (Savickiene et al., 2009).

4.3.3 Células de pacientes de SMD tratadas com Decitabina

A hipermetilação é um mecanismo comum da inativação de genes supressores de tumor em malignidades hematopoiéticas (Chim et al., 2002; Rush e Plass, 2002). Muitas vias associadas ao câncer são conhecidas por serem desreguladas em leucemias e linfomas

como um resultado da hipermetilação no DNA (Galm et al., 2006).

A decitabina (DAC) é conhecida por ser um agente de desmetilação, atuando primariamente através da inibição de metiltransferases de DNA (DNMTs), enzimas que são responsáveis pelo estabelecimento e manutenção do padrão de metilação no DNA (Lubbert, 2000).

A fim de verificar se DAC tem atuação na modulação de ANKHD1 nas SMDs (síndromes mielodisplásicas) foram isoladas células mononucleares (MNCs) de 4 pacientes com SMD (**Tabela 2**). Tais células foram tratadas com DAC, nas concentrações de 1 e 5 μ M, e cultivadas por um período de 72h, em seguida as células foram coletadas para análise da expressão do gene ANKHD1 (**Figura 29**) Quando não houve células suficientes apenas a dosagem 1 μ M foi testada, como no caso do paciente 4.

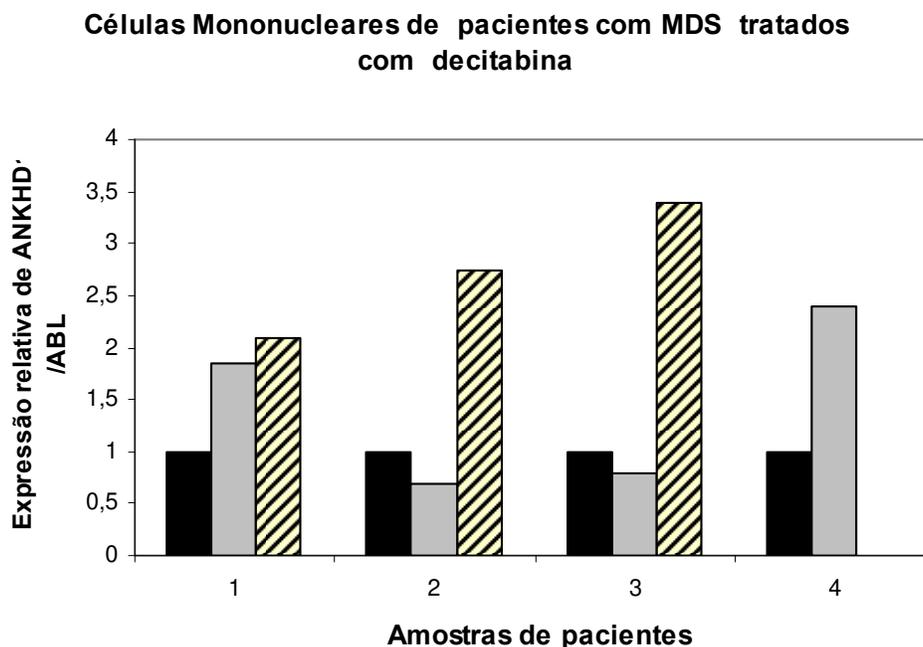


Figura 29: Análise da expressão relativa de ANKHD1 em amostras de pacientes com SMD tratados com decitabina. Células de 4 pacientes com SMD foram tratadas com Decitabina, as

condições utilizadas foram controle (das células do próprio paciente, barras pretas), células do paciente tratadas com 1 μ M de DAC (barras cinza), células do paciente tratadas com 5 μ M de DAC (barras acuradas). Estes resultados mostram a expressão de ANKHD1 relativa à expressão de ABL, e correspondem à média \pm desvio padrão de duas reações de qPCR.

Observamos que nas doses maiores utilizadas (5 μ M de DAC) todos as amostras de pacientes tiveram um aumento de expressão de ANKHD1, indicando que ANKHD1 pode estar reprimida nas mielodisplasias. Este resultado corrobora outros obtidos no nosso laboratório que mostram que a expressão de ANKHD1 em pacientes de Mielodisplasia é baixa (Santos Duarte, tese de doutorado).

4.3.4 Tratamento com drogas indutoras de apoptose: Daunorubicina e Metotrexate

Resultados previamente obtidos em nosso laboratório sugerem que ANKHD1 esteja particularmente envolvida no processo de apoptose. Na sua tese de doutorado a Dr. Fabíola Traina associou a inibição de ANKHD1 em linhagem Jurkat por RNAi a aumento do percentual de células em apoptose. Tal resultado é corroborado pelo de Miles e colaboradores (2005) que ao inibirem a nova isoforma 2 de ANKHD1 em duas linhagens celulares, observaram um aumento na atividade das caspases 3 e 7.

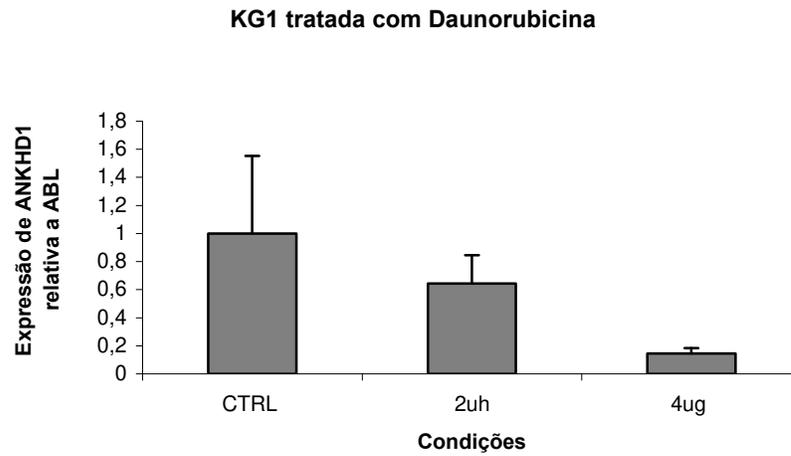
A fim de averiguar se ANKHD1 está envolvida na apoptose, utilizamos drogas indutoras de apoptose para as linhagens KG1 e Jurkat, respectivamente Daunorubicina (Quillet-Mary et al., 1996)(Quillet-Mary et al., 1996) e Metotrexato (Strauss et al., 2002)(Strauss et al., 2002).

A daunorubicina é um quimioterápico utilizado contra a leucemia, sarcoma 180, carcinoma ascítico de Ehrlich e outros tipos de carcinomas, devido a seus efeitos indutores de apoptose (Quillet-Mary et al., 1996). A Daunorubicina interage diretamente com o DNA interferindo na sobrevivência celular.

O Metotrexato é uma droga imunossupressora (ISD). ISDs como Metotrexato são usadas na prevenção da rejeição de transplantes e na terapia de desordens autoimunes. O mecanismo preciso pelo qual as ISD atuam na ativação de células T é pouco conhecido, porém sabe-se que Metotrexate exerce efeitos antiproliferativos e indutores de apoptose interferindo metabolicamente na síntese do DNA de células T (Strauss et al., 2002).

As células KG1 e Jurkat foram então submetidas à cultura, sob a ação destas drogas e posteriormente a expressão de ANKHD1 foi verificada por qPCR (**Figura 30 A e B**).

(A)



(B)

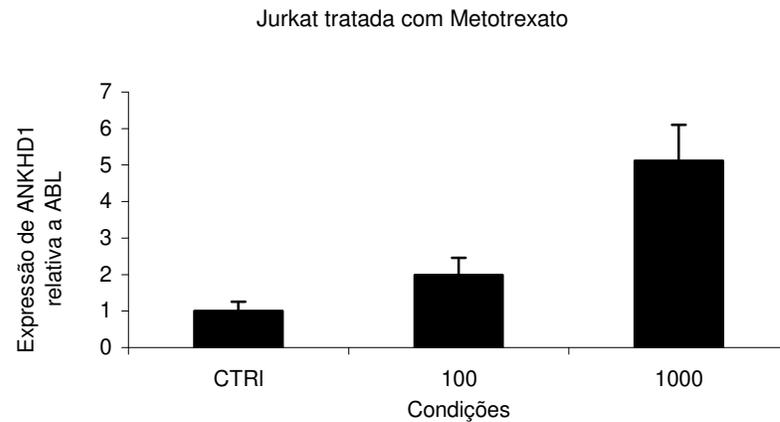


Figura 30. Expressão de ANKHD1 em linhagens leucêmicas tratadas com indutores de apoptose (A) Daunorubicina, linhagem KG1 (B) Metotrexate, linhagem Jurkat. As células foram cultivadas até a fase exponencial e tratadas com as seguintes doses: de daunorubicina 2 μ g/mL e 4 μ g/mL ou 100 ng/mL e 1000 ng/mL de metotrexate por 24 horas. Os níveis de RNA de ANKHD1 e do controle endógeno ABL foram quantificados por qPCR. Estes resultados mostram a expressão de ANKHD1 relativa à expressão de ABL, e correspondem à média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes.

A viabilidade, avaliada pelo azul de tripan, em KG1 foi de 89% no controle e cerca de 50% nas doses de 2 µg /mL e 4 µg /ml. A viabilidade das células Jurkat foi de: 91% no controle e cerca de 40% na dose 100 ng/mL e 1000 ng/ml.

Observou-se em KG1, linhagem mielóide, uma expressão de ANKHD1 5x menor sob a ação de Daunorubicina do que no controle **figura 30A**, e em Jurkat ,linhagem linfóide, observou-se um aumento de expressão de ANKHD1 de aproximadamente 5x mais sob a ação de MTX do que no controle **figura 30 B**. Este efeito contraditório pode tanto ser devido a origem das células, quanto a diferença de atuação das drogas .

DISCUSSÃO

No presente estudo buscamos identificar possíveis vias de sinalização celular que tenham a participação de ANKHD1. A análise por microarray mostrou classes funcionais mais significativas relacionadas a proliferação e controle do ciclo celular, diferenciação celular e morte celular programada, corroborando a hipótese de que ANKHD1, em humanos, exerça função semelhante à sua homóloga Mask, estudada em *Drosophila melanogaster*.

Relatamos também a diminuição da expressão das isoformas 1 e 2 de ANKHD1 em amostras de pacientes com leucemia quando comparadas a amostras de medula óssea normal, enquanto que a expressão de *BMF* esteve aumentada, confirmando a expressão antagonica encontrada na análise por microarray. Estes resultados mostram uma nova associação entre dois genes possivelmente associados a leucemogênese. A identificação de novos marcadores genéticos específicos de doenças se faz importante pois expande as opções de tratamento, aumentando as chances de sucesso no tratamento de pacientes portadores de LMA ou mielodisplasias, reduzindo as altas taxas de mortalidade associadas às doenças.

O gene *BMF* pertence à família de BCL-2. Esta família é composta por várias proteínas reguladoras de apoptose, que são agrupadas em três subfamílias baseadas no número de domínios BH (domínio de homologia com BCL-2) encontrados. A primeira subfamília inclui as proteínas anti apoptóticas BCL-2, BCL-xL, BCL-w, MCL-1 and A1/BFL-1 que possuem quatro domínios BH. As outras duas subfamílias são compostas de proteínas pró-apoptóticas que possuem múltiplos domínios BH como BAX, BAK e BOK ou possuindo apenas 3 domínios BH (BH3 only proteins) como Bim, Bad e *BMF* (Cory et al., 2003).

A família BCL forma uma complexa rede regulatória que controla o balanço entre sobrevivência e morte celular em resposta a diferentes estímulos fisiológicos ou patológicos (Lomonosova e Chinnadurai, 2008).

Curiosamente, relatamos aqui a alta expressão de *BMF* e a baixa expressão de ANKHD1 em leucemias, sendo que *BMF* é reconhecida por sua atividade pró-apoptótica e à ANKHD1 têm sido atribuídas características anti-apoptóticas. A alta expressão de *BMF* nas leucemias já foi descrita e inclusive utilizada como parâmetro prognóstico (Hess et al., 2007).

O processo de apoptose tem grande importância nas leucemias agudas e na transformação das mielodisplasias. Enquanto as mielodisplasias de baixo risco são caracterizadas por altas taxas de apoptose, nas leucemias agudas há redução da apoptose e altas taxas de proliferação celular (Jagani e Khosravi-Far, 2008) e nas mielodisplasias de alto risco, a apoptose também encontra-se reduzida (Braun et al., 2006; Yamamoto et al., 2004).

Hess e colaboradores (2007) relataram que, em leucemias, tanto expressão alta de genes pro-apoptóticos quanto de anti-apoptóticos podem levar a mau prognóstico. Neste estudo os autores observaram que a alta expressão de *BMF* ajuda, em cooperação com outros genes, a agrupar os pacientes em categorias prognósticas, e sugerem que o que fará a diferença na efetividade do processo patológico será o balanço final entre o número de genes apoptóticos e anti apoptóticos ativados (Adams e Cory, 2001; Kroemer, 1997), conforme descreve a nova teoria de morte celular programada conhecida como *primed for death* (Certo et al., 2006).

ANKHD1 associa-se com as proteínas Vpr e Siva conforme identificado por ensaio duplo híbrido e confirmado por imunoprecipitação (Traina, dados não publicados; (Miles et al., 2005)) No presente estudo relatamos também diminuição das isoformas protéicas 1e 2 de ANKHD1 quando co-expressas com Vpr e Siva .

Entre as múltiplas funções de Vpr está a capacidade de induzir bloqueio no ciclo celular na fase G2/M e induzir apoptose em células T (Le Rouzic e Benichou, 2005) porém o mecanismo exato pelo qual essa proteína atua ainda não é bem determinado.

Sabe-se que Vpr se liga ao complexo de ubiquitina ligase, DDB1-Cul4A, através da sua interação com a proteína DCAF1 (Jacquot et al., 2009), o que permite desencadear o processo de degradação de proteínas, através do proteossoma. Supõe-se que a degradação de alguma dessas proteínas terminaria por ativar a proteína quinase ATR (Ataxia-telangiectasia and rad3 protein), que está associada à via de reparo de lesões no DNA, e as consequências da ativação de ATR são hiperfosforilação de Cdc25 e em seguida hipofosforilação relativa de Cdc2, inibindo ligação com a ciclina B1 e a entrada na mitose. Além disso a proteína ATR pode provocar a hiperfosforilação de GADD45 e ativar a proteína mitocondrial BAX desencadeando apoptose. A estrutura globular de ANKHD1, conferida pelas suas repetições de anquirina, lhe atribuem características favoráveis para atuar como conectora de outras proteínas (Sedgwick e Smerdon, 1999) portanto, é possível que ANKHD1 seja parte deste complexo protéico, como propõe o modelo da **Figura 31**.

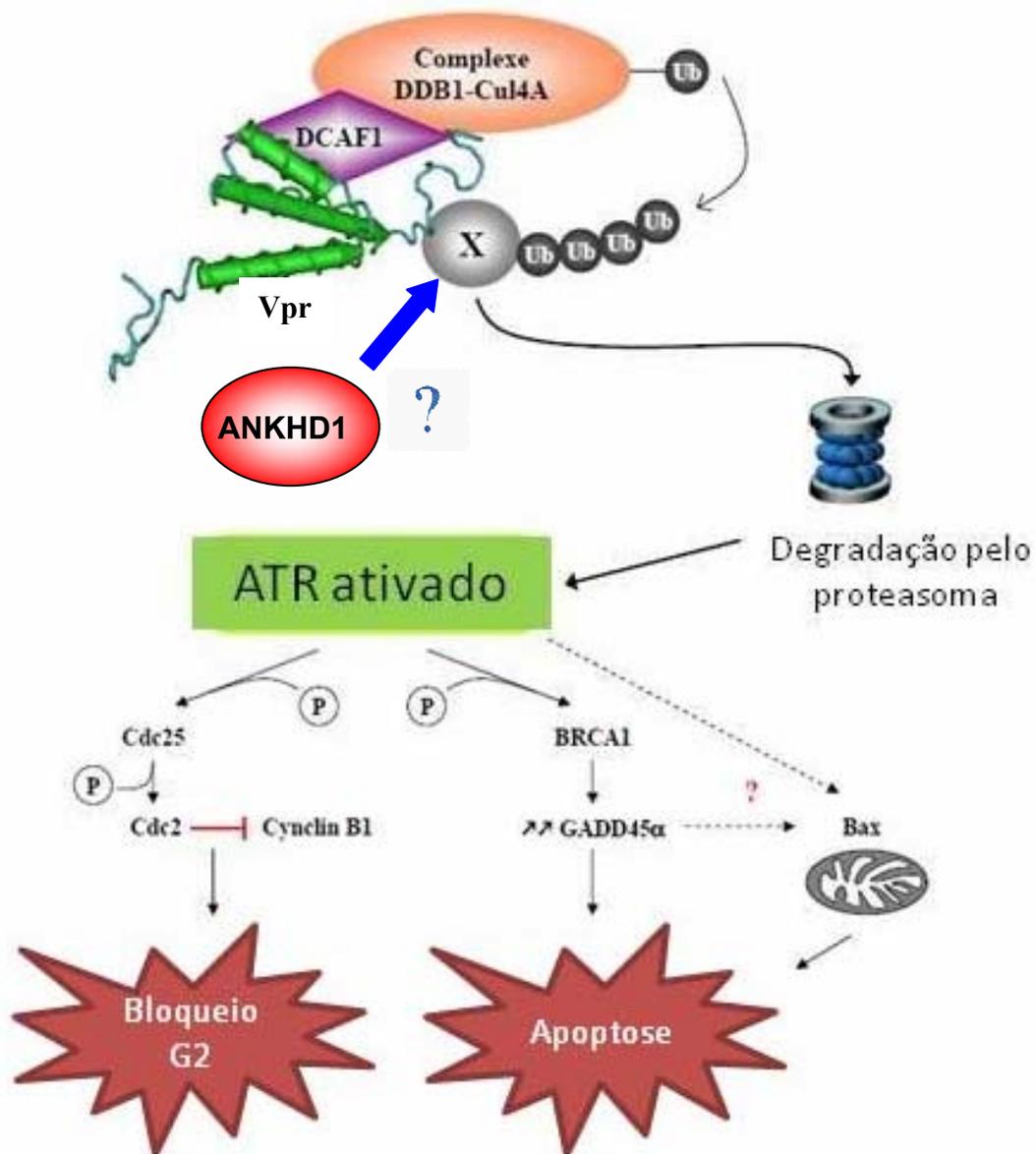


Figura 31: Modelo proposto do bloqueio da função anti-apoptótica da ANKHD1 através de sua associação com Vpr. ANKHD1 associa-se a Vpr, que ao se ligar ao complexo ubiquitina ligase DDB1-Cul4A leva a ativação do proteassoma degradando ANKHD1 e levando a ativação de ATR que resulta no bloqueio do ciclo em G2 e de indução de apoptose através da a ativação de Bax (modificado de Jacquot,et al 2009).

Resultados recentes de nosso laboratório demonstraram também interação entre ANKHD1 e SIVA (Traina et al, dados não publicados), cuja capacidade de indução de apoptose em células T é bem caracterizada (Py et al., 2004) e em nosso estudo, a hiperexpressão de SIVA também foi capaz de reduzir a expressão de ANKHD1. Dados ainda não publicados do Laboratório do Instituto Cochin, especializado em processos patológicos associados ao HIV, demonstram que Vpr e SIVA podem interagir, direta ou indiretamente. Deste modo, a comprovada associação de ANKHD1 com ambas as proteínas SIVA e Vpr, sugere atuação de ANKHD1 no controle da apoptose induzida por estas proteínas, possivelmente conectando- as, neste caso atuando como uma facilitadora do processo, sem necessariamente desencadeá-lo.

A inibição de ANKHD1 em HeLa, NT2 e Jurkat é associada a aumento nas taxas de apoptose ((Miles et al., 2005), 2005; Traina , dados não publicados), indicando o envolvimento de ANKHD1 na morte celular programada o que, juntamente à diminuição de expressão de ANKHD1, demonstrada neste trabalho, em presença de duas proteínas indutoras de apoptose reforça a idéia de que ANKHD1 seja anti-apoptótica

Neste trabalho descrevemos pela primeira vez a localização de uma isoforma de ANKHD1 no núcleo, confirmando todas as previsões *in silico* feitas sobre a localização de ANKHD1. Este resultado abre novas perspectivas funcionais para esta proteína sendo que esta localização nuclear corrobora sua interação com Vpr e Siva que são proteínas tipicamente nucleares (Jacquot et al., 2007)e (Py et al., 2004); o grande número de histonas modulados no array da inibição de ANKHD1 também reforça a hipótese de que ANKHD1 tenha uma função nuclear.

A proteína Vpr é uma proteína dinâmica móvel, sendo capaz de transitar do citoplasma para o núcleo, restando predominantemente neste último, onde esta distribuída especialmente em torno do envelope nuclear, formando um anel de concentração protéica (Jacquot et al., 2007). Porém ao contransfectarmos ANKHD1 com Vpr percebemos um deslocamento de Vpr do núcleo para o citoplasma. Este efeito precisa ser melhor quantificado e devidamente confirmado, mas evidencia uma interação funcional importante entre estas duas proteínas pouco conhecidas.

Devido à dificuldade de hiperexpressão da isoforma 1 de ANKHD1, realizamos apenas um estudo funcional de hiperexpressão de ANKHD1 da isoforma 2, em células Jurkat induzidas por camptotecina, e os resultados preliminares confirmam a hipótese que essa isoforma tenha função anti- apoptótica. ANKHD1 foi capaz de prevenir a apoptose em células eletroporadas apenas ou eletroporadas e induzidas com camptotecina. Embora os resultados tenham sido discretos (7 a 12% de redução da apoptose, respectivamente) e baseados em apenas um experimento, ressalta-se que a camptotecina e a hiperexpressão de SIVA, ambas sabidamente indutoras de apoptose, induziram apenas cerca de 25% de apoptose, sugerindo que o efeito da hiperexpressão de ANKHD1 isoforma 2, seja significativo.

Nossos resultados também demonstraram que Interferon alfa e talidomida supra-regulam ANKHD1. Resultados obtidos em nosso laboratório indicam que talidomida aumenta a expressão da citocina IL10 (Lazarini et al, submetido), e como é notório para interferon alfa (Takaoka e Yanai, 2006)), esta citocina sinaliza pela via JAK/STAT.

A via JAK/ STAT de sinalização é de grande importância na leucemogênese, visto que mutações em JAK2 e ABL conduzem à sua ativação descontrolada, induzindo

neoplasias hematológicas, como policitemia vera e leucemia mielóide crônica, (Meyer et al.); (Grosso et al., 2009)) sendo portanto alvo específico para tratamento destas doenças (Buettner et al., 2002); (Levitzki, 2002). Cabe ressaltar o grande avanço terapêutico que foi evidenciado nesta última década com o advento da utilização do inibidor tirosina quinase Imatinibe em leucemia mielóide crônica, abrindo o caminho para o tratamento de outras doenças induzidas por ativação tirosina quinase (Chen e Prchal); (Pingali et al., 2009).

A homóloga de ANKHD1, Mask, foi descoberta devido à sua participação na sinalização de um receptor tirosina quinase (Smith et al., 2002). A modulação de ANKHD1, observada quando células leucêmicas são submetidas a ativadores de vias tirosina quinase (interferon e talidomida), juntamente com a supra-modulação de vários genes importantes nesta via como IRS2, PI3KR2, STAT1 e histona-H3 observadas no microarray da inibição de ANKHD1 (**Figura 32**), sugerem que pelo menos uma das isoformas de ANKHD1 inibidas no array esteja relacionada à via de sinalização JAK/STAT.

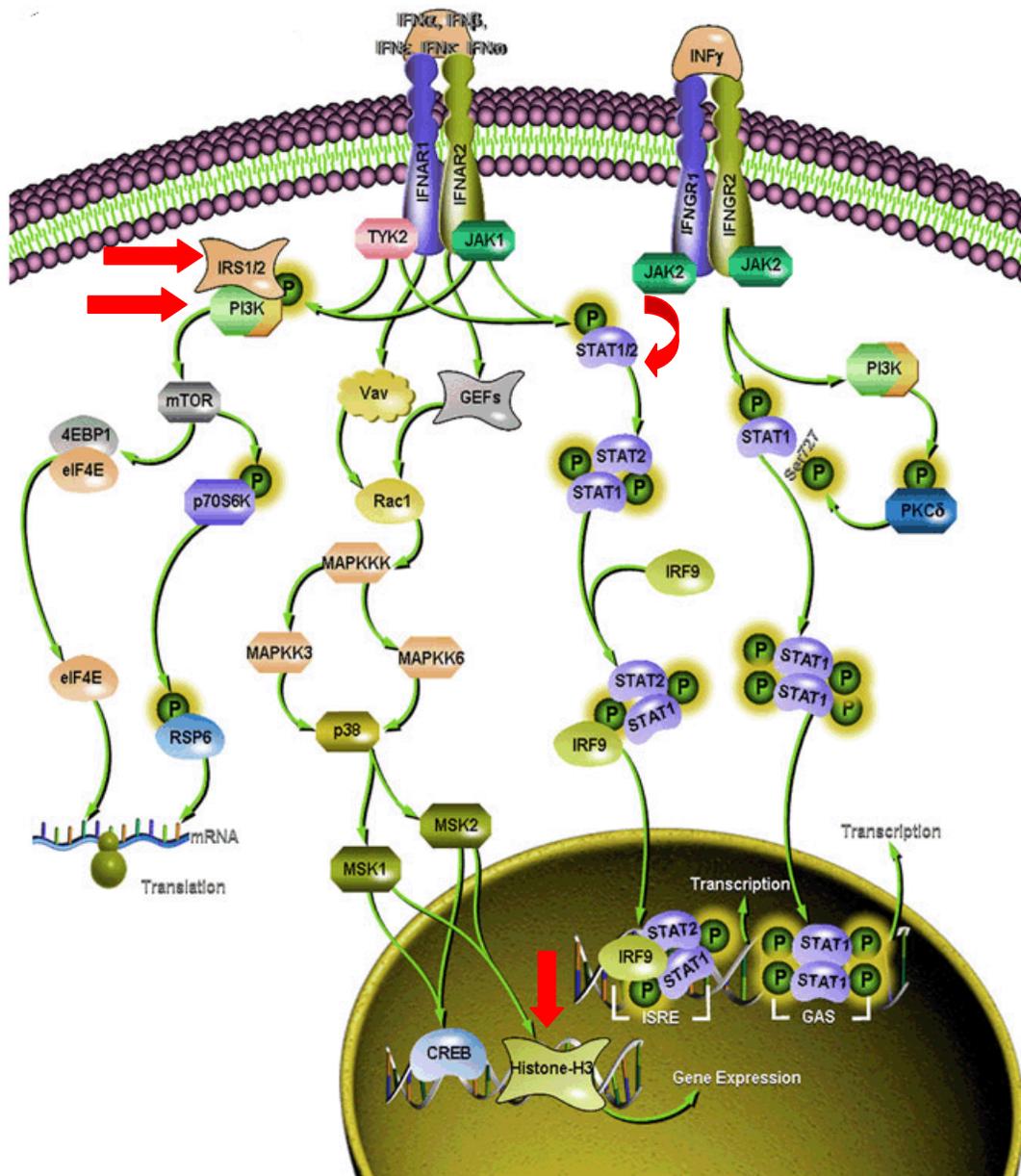


Figura 32: Genes supra-regulados no microarray de ANKHD1 contidos na via de sinalização de Interferon. Os genes identificados pelas setas vermelhas tiveram sua expressão aumentada na inibição de ANKHD1.

Aumento da expressão de ANKHD1 também foi encontrado com o tratamento de linhagens com metotrexate (MTX). Além da ação antiproliferativa e indutora da apoptose, o MTX tem importante ação imunossupressora, sendo utilizada na prevenção de rejeição de transplantes e na terapia de desordens auto-imunes (Strauss et al., 2002), a exemplo de interferon alfa e talidomida.

Neste estudo, também demonstramos que a expressão de ANKHD1 é reduzida pela ação do quimioterápico daunorrubicina, indutora de apoptose.

A Daunorrubicina é um quimioterápico muito utilizado para tratamento de leucemias agudas e, assim como a camptotecina, atua junto a Topoisomerasas, causando quebras no DNA e induzindo a ativação de P53, potente proteína pro-apoptótica. A redução da expressão de ANKHD1 poderia, portanto estar relacionada com a via de P53 uma vez que a proteína TP53INP (proteína indutora de dano dependente de p53) teve sua supra-regulação observada pelo microarray da inibição e validada por qPCR.

Os resultados conflitantes com o agente quimioterápico daunorrubicina, e o imunossupressor metotrexate sugerem que ANKHD1 possa participar da apoptose por vias diferentes, uma vez que suas isoformas têm localização e estrutura tão diferenciadas.

Os resultados da nossa análise microarray evidenciaram um grande número de Histonas cuja expressão foi supra-regulada.

Histonas são componentes críticos da cromatina que são necessárias para o empacotamento do DNA nos genomas eucarióticos. A quantidade adequada de histonas no núcleo está relacionada à eficaz duplicação do DNA, essencial para o processo de reprodução celular.

O nucleossomo, como unidade estrutural básica da cromatina, é organizado pelo envolvimento da molécula do DNA em torno de um núcleo de proteínas histônicas. Defeitos na sua organização têm mostrado impedimento no reparo de quebras na dupla fita de DNA. Quebras na dupla fita do DNA são potentes indutoras de instabilidade gênica, pois impedem o perfeito pareamento das cromátides na replicação celular (Bogenberger e Laybourn, 2008)

Proteínas que alteram a transcrição ou tradução de histonas estão relacionadas com instabilidade genômica. (Bogenberger e Laybourn, 2008). Os fatores que regulam o processamento do RNA das histonas é pouco conhecido e tem características únicas, que têm suscitado grande interesse (Ghule et al., 2009), por exemplo, não apresentam cauda de poliadenilação e utilizam complexos protéicos especiais para clivagem como a U7snRNP.

Inesperadamente, nossos resultados mostraram que o mRNA de grande número de histonas é regulada pela inibição de ANKHD1, sugerindo fortemente que ANKHD1 esteja envolvida com a repressão da transcrição de histonas.

A proteína FLASH ou CASP8AP2, ativa caspase 8 em resposta a estímulos no receptor Fas/CD95 , induzindo apoptose, e recentemente mostrou ter grande importância no processamento do mRNA de histonas, por sua ligação com LSM11, impedindo a poliadenilação dos mRNAs histônicos (Yang et al., 2009). Estes resultados obtidos com FLASH sugerem uma potencial ligação entre o processamento dos mRNAs histônicos e apoptose (Yang et al., 2009). Este elo ligando apoptose e processamento de histonas é surpreendente, embora provavelmente reflita a importância da expressão das histonas na progressão do ciclo celular e replicação do DNA.

Em conclusão os resultados obtidos em nosso estudo, conferem à ANKHD1 potencial papel na homeostase celular através de controle da apoptose, regulação do processamento do mRNA das histonas e estabilidade gênica. Estes dados abrem novas perspectivas de estudo para melhor aprofundar o conhecimento das funções de ANKHD1.

CONCLUSÕES

A inibição de ANKHD1 tem como consequência a modulação de diversos genes envolvidos em vias de sinalização celular como migração celular, diferenciação celular, proliferação e apoptose.

A expressão das isoformas 1 e 2 de *ANKHD1* está diminuída em amostras de pacientes com leucemia aguda quando comparadas a amostras de medula óssea normal.

A expressão de *BMF*, gene modulado pela inibição de ANKHD1, está aumentada em amostras de pacientes com leucemia aguda em relação a amostras de medula óssea normal, corroborando os resultados encontrados na análise do array.

A isoforma 1 de ANKHD1 está no citoplasma, porém sua sublocalização reticular precisa ser comprovada .

A isoforma 2 de ANKHD1 tem localização nuclear.

A expressão de Vpr e Siva, ambas proteínas pró apoptóticas, diminuem a expressão de ANKHD1 isoformas 1 e 2, corroborando a importância de ANKHD1 na morte celular programada.

A hiperexpressão de ANKHD1 desloca Vpr para o citoplasma.

Estudo funcional preliminar de hiperexpressão de ANKHD1 sugere que ela seja uma proteína anti- apoptótica. .

ANKHD1 está envolvida em processos epigenéticos.

Drogas usadas no combate a leucemia e SMD aumentaram a expressão de ANKHD1 em linhagens leucêmicas e em amostras de pacientes.

A indução de apoptose em linhagens leucêmicas leva à modulação de ANKHD1, sugerindo sua participação no processo de morte celular programada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. **Trends Biochem Sci** 26(1): 61-6, 2001.
- Austin J, Kimble J. Transcript analysis of *glp-1* and *lin-12*, homologous genes required for cell interactions during development of *C. elegans*. **Cell** 58(3): 565-71, 1989.
- Bain BJ **Leukaemia diagnosis**. Malden, Mass.: Blackwell Pub., 2003.
- Beck KA, Buchanan JA, Nelson WJ. Golgi membrane skeleton: identification, localization and oligomerization of a 195 kDa ankyrin isoform associated with the Golgi complex. **J Cell Sci** 110 (Pt 10)(1239-49, 1997.
- Beck KA, Nelson WJ. A spectrin membrane skeleton of the Golgi complex. **Biochim Biophys Acta** 1404(1-2): 153-60, 1998.
- Bennett V, Gilligan DM. The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. **Annu Rev Cell Biol** 9(27-66, 1993.
- Bennett V, Healy J. Organizing the fluid membrane bilayer: diseases linked to spectrin and ankyrin. **Trends Mol Med** 14(1): 28-36, 2008.
- Blank V, Kourilsky P, Israel A. NF-kappa B and related proteins: Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. **Trends Biochem Sci** 17(4): 135-40, 1992.
- Bogenberger JM, Laybourn PJ. Human T Lymphotropic Virus Type 1 protein Tax reduces histone levels. **Retrovirology** 5(9, 2008.
- Braun T, Carvalho G, Coquelle A, Vozenin MC, Lepelley P, Hirsch F, et al. NF-kappaB constitutes a potential therapeutic target in high-risk myelodysplastic syndrome. **Blood** 107(3): 1156-65, 2006.
- Breedon L, Nasmyth K. Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the Notch gene of *Drosophila*. **Nature** 329(6140): 651-4, 1987.

- Brentani H, Caballero OL, Camargo AA, da Silva AM, da Silva WA, Jr., Dias Neto E, et al. The generation and utilization of a cancer-oriented representation of the human transcriptome by using expressed sequence tags. **Proc Natl Acad Sci U S A** 100(23): 13418-23, 2003.
- Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. **Clin Cancer Res** 8(4): 945-54, 2002.
- Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M, Wei G, Korsmeyer S, Armstrong SA, et al. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. **Cancer Cell** 9(5): 351-65, 2006.
- Chen AT, Prchal JT. JAK2 kinase inhibitors and myeloproliferative disorders. **Curr Opin Hematol** 17(2): 110-6,
- Chim CS, Liang R, Kwong YL. Hypermethylation of gene promoters in hematological neoplasia. **Hematol Oncol** 20(4): 167-76, 2002.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem** 162(1): 156-9, 1987.
- Claessens YE, Bouscary D, Dupont JM, Picard F, Melle J, Gisselbrecht S, et al. In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors from patients with myelodysplastic syndromes: evidence for Fas-dependent apoptosis. **Blood** 99(5): 1594-601, 2002.
- Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. **Oncogene** 22(53): 8590-607, 2003.
- Cui J, Tungaturthi PK, Ayyavoo V, Ghafouri M, Ariga H, Khalili K, et al. The role of Vpr in the regulation of HIV-1 gene expression. **Cell Cycle** 5(22): 2626-38, 2006.

- D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 91(9): 4082-5, 1994.
- D. Gary Gilliland and Alan F. List . Síndrome Mielodisplásica, pag 1593 – 1598)
Em Cecil Medicina 23a edição, 2009, ed por Lee Goldman e Dennis Ausiello,
Elsevier .Editora LTDA, Rio de Janeiro, São Paulo
- Dash A, Gilliland DG. Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. **Best Pract Res Clin Haematol** 14(1): 49-64, 2001.
- Feng GS. Shp-2 tyrosine phosphatase: signaling one cell or many. **Exp Cell Res** 253(1): 47-54, 1999.
- Galm O, Herman JG, Baylin SB. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. **Blood Rev** 20(1): 1-13, 2006.
- Gascard P, Mohandas N. New insights into functions of erythroid proteins in nonerythroid cells. **Curr Opin Hematol** 7(2): 123-9, 2000.
- Ghule PN, Dominski Z, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS. The subnuclear organization of histone gene regulatory proteins and 3' end processing factors of normal somatic and embryonic stem cells is compromised in selected human cancer cell types. **J Cell Physiol** 220(1): 129-35, 2009.
- Gorina S, Pavletich NP. Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. **Science** 274(5289): 1001-5, 1996.
- Grosso S, Puissant A, Dufies M, Colosetti P, Jacquet A, Lebrigand K, et al. Gene expression profiling of imatinib and PD166326-resistant CML cell lines identifies Fyn as a gene associated with resistance to BCR-ABL inhibitors. **Mol Cancer Ther** 8(7): 1924-33, 2009.

- Haslett PA, Corral LG, Albert M, Kaplan G. Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset. **J Exp Med** 187(11): 1885-92, 1998.
- Hellstrom-Lindberg E, Malcovati L. Supportive care, growth factors, and new therapies in myelodysplastic syndromes. **Blood Rev** 22(2): 75-91, 2008.
- Hess CJ, Berkhof J, Denkers F, Ossenkoppele GJ, Schouten JP, Oudejans JJ, et al. Activated intrinsic apoptosis pathway is a key related prognostic parameter in acute myeloid leukemia. **J Clin Oncol** 25(10): 1209-15, 2007.
- Higashitsuji H, Itoh K, Nagao T, Dawson S, Nonoguchi K, Kido T, et al. Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. **Nat Med** 6(1): 96-9, 2000.
- Hopfer O, Komor M, Koehler IS, Schulze M, Hoelzer D, Thiel E, et al. DNA methylation profiling of myelodysplastic syndrome hematopoietic progenitor cells during in vitro lineage-specific differentiation. **Exp Hematol** 35(5): 712-23, 2007.
- Invernizzi R, Travaglino E, De Amici M, Brugnatelli S, Ramajoli I, Rovati B, et al. Thalidomide treatment reduces apoptosis levels in bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes. **Leuk Res** 29(6): 641-7, 2005.
- Jacobs MD, Harrison SC. Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. **Cell** 95(6): 749-58, 1998.
- Jacquot G, Le Rouzic E, David A, Mazzolini J, Bouchet J, Bouaziz S, et al. Localization of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope: impact on Vpr functions and virus replication in macrophages. **Retrovirology** 4(84), 2007.
- Jacquot G, Le Rouzic E, Maidou-Peindara P, Maizy M, Lefrere JJ, Daneluzzi V, et al. Characterization of the molecular determinants of primary HIV-1 Vpr proteins:

- impact of the Q65R and R77Q substitutions on Vpr functions. **PLoS One** 4(10): e7514, 2009.
- Jadersten M, Hellstrom-Lindberg E. Myelodysplastic syndromes: biology and treatment. **J Intern Med** 265(3): 307-28, 2009.
- Jagani Z, Khosravi-Far R. Cancer stem cells and impaired apoptosis. **Adv Exp Med Biol** 615(331-44, 2008.
- Klausner JD, Freedman VH, Kaplan G. Thalidomide as an anti-TNF-alpha inhibitor: implications for clinical use. **Clin Immunol Immunopathol** 81(3): 219-23, 1996.
- Kordeli E, Lambert S, Bennett V. AnkyrinG. A new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of Ranvier. **J Biol Chem** 270(5): 2352-9, 1995.
- Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. **Nat Med** 3(6): 614-20, 1997.
- Kunimoto M, Otto E, Bennett V. A new 440-kD isoform is the major ankyrin in neonatal rat brain. **J Cell Biol** 115(5): 1319-31, 1991.
- Lambert S, Yu H, Prchal JT, Lawler J, Ruff P, Speicher D, et al. cDNA sequence for human erythrocyte ankyrin. **Proc Natl Acad Sci U S A** 87(5): 1730-4, 1990.
- Lazarini M, Traina F, Winnischofer SM, Queiroz ML, Costa FF, Saad STO. Thalidomide effects on long term bone marrow cultures from patients with myelodysplastic syndromes: induction of IL-10 expression on stromal cells. Submetido
- Le Rouzic E, Benichou S. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. **Retrovirology** 2(11), 2005.
- Levitzki A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. **Eur J Cancer** 38 Suppl 5(S11-8, 2002.

- Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. **Oncogene** 27 Suppl 1(S2-19), 2008.
- Lux SE, John KM, Bennett V. Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins. **Nature** 344(6261): 36-42, 1990.
- Margalit O, Somech R, Amariglio N, Rechavi G. Microarray-based gene expression profiling of hematologic malignancies: basic concepts and clinical applications. **Blood Rev** 19(4): 223-34, 2005.
- Martinez-Climent JA, Andreu EJ, Prosper F. Somatic stem cells and the origin of cancer. **Clin Transl Oncol** 8(9): 647-63, 2006.
- Metze, I.L, Magalhaes, S.M.M. Síndromes mielodisplásicas – Protocolo de exclusão. **Rev. bras. hematol. hemoter.** 26(4): 263-267, 2004.
- Meyer T, Ruppert V, Gorg C, Neubauer A. Activated STAT1 and STAT5 transcription factors in extramedullary hematopoietic tissue in a polycythemia vera patient carrying the JAK2 V617F mutation. **Int J Hematol** 91(1): 117-20,
- Miles MC, Janket ML, Wheeler ED, Chattopadhyay A, Majumder B, Dericco J, et al. Molecular and functional characterization of a novel splice variant of ANKHD1 that lacks the KH domain and its role in cell survival and apoptosis. **Febs J** 272(16): 4091-102, 2005.
- Neel BG, Gu H, Pao L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. **Trends Biochem Sci** 28(6): 284-93, 2003.
- Nolte F, Hofmann WK. Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes. **Ann Hematol** 87(10): 777-95, 2008.

- Otto E, Kunimoto M, McLaughlin T, Bennett V. Isolation and characterization of cDNAs encoding human brain ankyrins reveal a family of alternatively spliced genes. **J Cell Biol** 114(2): 241-53, 1991.
- Pascual J, Castresana J, Saraste M. Evolution of the spectrin repeat. **Bioessays** 19(9): 811-7, 1997.
- Peters LL, Lux SE. Ankyrins: structure and function in normal cells and hereditary spherocytes. **Semin Hematol** 30(2): 85-118, 1993.
- Pfeffer LM. Biologic activities of natural and synthetic type I interferons. **Semin Oncol** 24(3 Suppl 9): S9-63-S9-9, 1997.
- Pingali SR, Mathiason MA, Lovrich SD, Go RS. Emergence of chronic myelogenous leukemia from a background of myeloproliferative disorder: JAK2V617F as a potential risk factor for BCR-ABL translocation. **Clin Lymphoma Myeloma** 9(5): E25-9, 2009.
- Planelles V, Jowett JB, Li QX, Xie Y, Hahn B, Chen IS. Vpr-induced cell cycle arrest is conserved among primate lentiviruses. **J Virol** 70(4): 2516-24, 1996.
- Poulin F, Brueschke A, Sonenberg N. Gene fusion and overlapping reading frames in the mammalian genes for 4E-BP3 and Mask. **J Biol Chem** 278(52): 52290-7, 2003.
- Prasad KV, Ao Z, Yoon Y, Wu MX, Rizk M, Jacquot S, et al. CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. **Proc Natl Acad Sci U S A** 94(12): 6346-51, 1997.
- Py B, Slomianny C, Auberger P, Petit PX, Benichou S. Siva-1 and an alternative splice form lacking the death domain, Siva-2, similarly induce apoptosis in T lymphocytes via a caspase-dependent mitochondrial pathway. **J Immunol** 172(7): 4008-17, 2004.

- Quillet-Mary A, Mansat V, Duchayne E, Come MG, Allouche M, Bailly JD, et al. Daunorubicin-induced internucleosomal DNA fragmentation in acute myeloid cell lines. **Leukemia** 10(3): 417-25, 1996.
- Rush LJ, Plass C. Alterations of DNA methylation in hematologic malignancies. **Cancer Lett** 185(1): 1-12, 2002.
- Santos Duarte Ada S, Traina F, Favaro PM, Basseres DS, de Carvalho IC, Medina Sde S, et al. Characterisation of a new splice variant of Mask-BP3(ARF) and Mask human genes, and their expression patterns during haematopoietic cell differentiation. **Gene** 363(113-22, 2005.
- Savickiene J, Treigyte G, Magnusson KE, Navakauskiene R. Response of retinoic acid-resistant KG1 cells to combination of retinoic acid with diverse histone deacetylase inhibitors. **Ann N Y Acad Sci** 1171(321-33, 2009.
- Sedgwick SG, Smerdon SJ. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. **Trends Biochem Sci** 24(8): 311-6, 1999.
- Sidky YA, Borden EC. Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor- and lymphocyte-induced vascular responses. **Cancer Res** 47(19): 5155-61, 1987.
- Smith RK, Carroll PM, Allard JD, Simon MA. Mask, a large ankyrin repeat and KH domain-containing protein involved in Drosophila receptor tyrosine kinase signaling. **Development** 129(1): 71-82, 2002.
- Strauss G, Osen W, Debatin KM. Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs. **Clin Exp Immunol** 128(2): 255-66, 2002.

- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proc Natl Acad Sci U S A** 102(43): 15545-50, 2005.
- Takaoka A, Yanai H. Interferon signalling network in innate defence. **Cell Microbiol** 8(6): 907-22, 2006.
- Tartaglia M, Niemeyer CM, Fragale A, Song X, Buechner J, Jung A, et al. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. **Nat Genet** 34(2): 148-50, 2003.
- Testa U, Riccioni R. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. **Haematologica** 92(1): 81-94, 2007.
- Traina F, Favaro PM, Medina Sde S, Duarte Ada S, Winnischofer SM, Costa FF, et al. ANKHD1, ankyrin repeat and KH domain containing 1, is overexpressed in acute leukemias and is associated with SHP2 in K562 cells. **Biochim Biophys Acta** 1762(9): 828-34, 2006.
- Valverde R, Edwards L, Regan L. Structure and function of KH domains. **Febs J** 275(11): 2712-26, 2008.
- Vencio RZ, Koide T. HTself: self-self based statistical test for low replication microarray studies. **DNA Res** 12(3): 211-4, 2005.
- Xu R, Yu Y, Zheng S, Zhao X, Dong Q, He Z, et al. Overexpression of Shp2 tyrosine phosphatase is implicated in leukemogenesis in adult human leukemia. **Blood** 106(9): 3142-9, 2005.
- Yamamoto K, Abe S, Nakagawa Y, Suzuki K, Hasegawa M, Inoue M, et al. Expression of IAP family proteins in myelodysplastic syndromes transforming to overt leukemia. **Leuk Res** 28(11): 1203-11, 2004.

Yang XC, Burch BD, Yan Y, Marzluff WF, Dominski Z. FLASH, a proapoptotic protein involved in activation of caspase-8, is essential for 3' end processing of histone pre-mRNAs. **Mol Cell** 36(2): 267-78, 2009.

ANEXOS

Anexo I



CEP, 19/11/02
(Grupo III)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas, SP
(0__19) 3788-8936
fax (0__19) 3788-8925

cep@heam.fcm.unicamp.br

PARECER PROJETO: Nº 458/2002

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS GENES HUMANOS RELACIONADOS AOS GENES DAS PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO DE ESPECTRINA"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sara Teresinha Olalla Saad

INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 21/10/2002

II - OBJETIVOS

A pesquisa visa verificar a função de novas proteínas em diferentes tipos de células. Trata-se de um estudo comparativo para: a) determinar os diferentes tecidos humanos em que os genes codificam as ESTs homólogas às proteínas citoesqueléticas são expressos através da utilização da técnica de Northern Blotting multi-tecidual; b) obter a seqüência completa do cDNA correspondente a cada uma das diferentes ESTs estudadas a partir de ESTs depositadas em banco de dados, através de bio-informática e/ou através do método de RACE ou PVR de bibliotecas de cDNA com o objetivo de se ter acesso à estrutura primária da proteína codificada por estes genes; c) produzir "macroarrays" de ESTs homólogas a genes do citoesqueleto para verificar a expressão diferencial destes genes em tecidos normais e tumores; d) identificar proteínas de ligação do domínio SH3 da alfa-espectrina em células hematopoéticas usando um ensaio "in vivo" baseado em levedura; e) identificar proteínas de ligação do domínio de cauda e do domínio rico em serina e treonina das anquirinas gigantes m tecido cerebral, usando um ensaio "in vivo" baseado em levedura; f) após a caracterização da seqüência de aminoácidos dos novos genes clonados, determinar a localização celular destas proteínas, através da técnica de imunolocalização fluorescente; g) em camundongos, obter a seqüência do cDNA das proteínas de maior interesse com o objetivo de se realizar estudos funcionais; h) dependendo da localização das proteínas, realizar estudos funcionais para avaliar o papel destas proteínas nos tecidos encontrados e i) avaliar a expressão do mRNA e da proteína em células de pacientes portadores de neoplasias, cardiopatias, doenças neurológicas e renais e comparar com células normais.

III - SUMÁRIO

Serão estudados cerca de 50 pacientes adultos, maiores de 18 anos de idade, de ambos os sexos, atendidos no complexo hospitalar da UNICAMP, com doenças neoplásicas, como por exemplo leucemias agudas e crônicas, linfomas e mieloma múltiplo, assim como pacientes portadores de cardiopatia, doenças neurológicas, doenças renais. Dependendo da função e localização das proteínas identificadas, será verificado se estas apresentam alteração da expressão em tecido normais e anormais. Para tanto serão analisados 20 ml de sangue periférico, ou 2 ml de medula óssea ou fragmentos de tecido submetidos à biópsia a serem analisados por imunohistoquímica, imunocitoquímica, western blotting ou quantificação mRNA. Exceto sangue periférico e medula óssea não será coletado material especificamente para este projeto, mas serão utilizados material de arquivo ou fragmento de material coletado para biópsia com fins diagnósticos. O estudo não explicita critérios de exclusão. Os resultados obtidos serão comparados com o de controles não portadores das doenças em questão. Como controle periférico serão utilizados glóbulos brancos obtidos em bolsas de sangue de doadores voluntários e normais. Deleucocitadas pelo sistema top-bottom no Hemocentro da UNICAMP. Como controle de medula óssea será utilizado material de medula óssea obtido de pacientes portadores de púrpura trombocitopênica idiopática. A coleta de material de medula é rotina nestes casos. A metodologia a ser seguida é compatível com as questões que o estudo formula e as condições para sua realização, adequadas.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Não há riscos envolvidos no estudo, o termo de consentimento está formulado de maneira clara e objetiva, tematizando os principais pontos sob exame: anonimato garantido, liberdade para retirada do estudo independente do manutenção do atendimento, sigilo.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

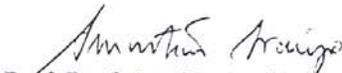
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Atenção: Projetos de Grupo I serão encaminhados à CONEP e só poderão ser iniciados após Parecer aprovatório desta.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 19 de novembro de 2002.


Prof. Dr. Sebastião Araújo
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo II



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 183/2003

Registro CONEP: 7011 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 458/2002

Processo nº 25000.149169/2002-39

Projeto de Pesquisa : "Clonagem e caracterização de novos genes humanos relacionados aos genes das proteínas do citoesqueleto de espectrina".

Pesquisador Responsável : Dr. Sara Terezinha Olalla Saad

Instituição: Faculdade de Ciências Médicas / UNICAMP

Área Temática Especial : (...) testes diagnósticos (área II.3)
Genética Humana

Descrição do Estudo:

O estudo pretende caracterizar genes humanos responsáveis pela expressão de proteínas componentes do citoesqueleto de espectrina, correlacionando os achados em cerca de 50 pacientes atendidos no complexo hospitalar da UNICAMP, dentre pacientes portadores de doenças neoplásicas, cardíacas, renais, neurológicas, etc. Tal pesquisa será efetuada em sangue periférico, material de medula óssea ou ainda em tecidos humanos previamente biopsiados para outros fins diagnósticos. Excetuando-se sangue periférico, não haverá coleta de nenhum material especificamente para este estudo (medula óssea e outros tecidos serão obtidos de material previamente coletado e armazenados). Os achados neste grupo de pacientes serão comparados com os achados de glóbulos brancos de indivíduos supostamente sãos (doadores de sangue). Para esta finalidade utilizar-se-á da fração de glóbulos brancos das bolsas de sangue, normalmente desprezada. Cerca de 50 sujeitos portadores de alguma doença serão incluídos nesse estudo.

Considerações

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada.

As informações enviadas atendem, de modo geral, aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96 sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

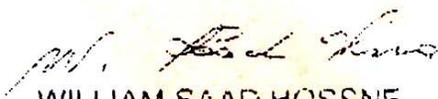
Entretanto, solicita-se que :

1. o consentimento informado e o formulário de consentimento sejam acoplados em um só documento. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme a Resolução CNS 196/96.
2. seja acrescentado no TCLE, o compromisso de que os sujeitos de pesquisa serão contatados em caso de resultado que possa ser de interesse clínico para os mesmos e quanto a eventual indicação de aconselhamento genético

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, com a recomendação de que o CEP acompanhe o atendimento aos itens acima.

Situação : Projeto aprovado com recomendação

Brasília, 05 de fevereiro de 2003


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

APÊNDICES

Apêndice I

Tabela 7 :Dados clínicos dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda.

Indicador do paciente	Diagnóstico (FAB)	Idade ao diagnóstico	sexo	%Blastos na MO	Leuco /mm ³	Hb g/dl	Plt /mm ³
1	LMA-M0	40	F	90	132000	10,9	21000
2	LMA-M1	34	F	91	8000	7,0	45000
3	LMA-M1	35	M	96	30000	8,0	90000
4	LMA-M1	76	F	98	127000	4,8	28000
5	LMA-M1	41	F	92	2800	10,2	93000
6	LMA-M1	45	M	94	10000	8,3	24000
7	LMA-M2	44	M	73	89670	5,4	37000
8	LMA-M2	53	F	79	22000	8,0	17000
9	LMA-M2	49	M	70	46320	6,6	11000
10	LMA-M2	24	M	87	24800	9,5	57000
11	LMA-M2	70	M	59	112100	8,0	169000
12	LMA-M2	74	F	94	1350	3,3	22000
13	LMA-M3	81	F	68	4230	8,7	51000
14	LMA-M3	40	F	41	11190	8,8	36000
15	LMA-M3	18	M	86	46620	5,1	21000
16	LMA-M4	57	M	92,5	183800	9,0	28000
17	LMA-M4	59	M	41	3980	6,7	26000
18	LMA-M4	52	M	91	26760	8,6	50000
19	LMA-M4	71	F	81	121900	9,3	56000
20	LMA-M4	83	F	28	8240	9,7	19000
21	LMA-M4	66	M	73	115300	7,9	91000
22	LMA-M4	67	F	87	123000	8,1	89000
23	LMA-M4	76	M	85	47290	7,7	153000
24	LMA-M4	43	M	77	35270	9,7	36000
25	LMA-M4eos	51	M	33	7260	5,2	17000
26	LMA-M5A	44	M	89	66100	13,0	223000
27	LMA-M5B	61	M	87	212800	8,6	83000
28	LMA-M5B	31	M	94	44040	11,8	66000
29	LMA-M6	42	M	35	1760	8,0	271000
30	LMA-M7	47	M	31	740	5,3	63000
31	LLA - pré B	42	M	92	93470	5,9	37000
32	LLA - pré B	31	F	77	1910	9,3	80000
33	LLA-T	20	M	80	68000	7,7	37000
34	LLA-T	39	F	81,5	146000	8,4	87000
35	LLA-T	37	M	93	46000	13,1	51000
36	LLA-T	56	M	90	45000	12,6	189000
37	LLA-T	21	M	70	59300	7,8	285000
38	Bifenotípica	39	M	94	58900	12,5	43000

Indicador do paciente	Diagnóstico (FAB)	Cariótipo	PCR
1	LMA-M0	46, XY	NA
2	LMA-M1	46, XX	NA
3	LMA-M1	ausente mitose	NA
4	LMA-M1	47, XX, +21	NA
5	LMA-M1	46, XX	NA
6	LMA-M1	ausente mitose	t(15;17) –
7	LMA-M2	ausente mitose	NA
8	LMA-M2	46, XY	t(15;17) –
9	LMA-M2	45, X-Y, t(8;21)(q22;q22)	NA
10	LMA-M2	46, XY	t(15;17) –
11	LMA-M2	47, XY, +11	NA
12	LMA-M2	46, XX	t(15;17) –
13	LMA-M3	45, XX, t(4;6)(q35;q22), del(5)(q31), del(10)(p11), t(15;17)(q22;q11), -18, del(22)(q11)	NR
14	LMA-M3	46, XX	t(15;17) +
15	LMA-M3	ausente mitose	t(15;17) +
16	LMA-M4	46, XY	NA
17	LMA-M4	NR	NA
18	LMA-M4	46, XY	NA
19	LMA-M4	46, XX	NA
20	LMA-M4	46, XX	NA
21	LMA-M4	47, XY, der(11)t(1;11)(q22;p15)	NA
22	LMA-M4	ausente mitose	NA
23	LMA-M4	ausente mitose	NA
24	LMA-M4	46, XY	NA
25	LMA-M4eos	46, XY	NA
26	LMA-M5A	46, XY	NA
27	LMA-M5B	ausente mitose	NA
28	LMA-M5B	46, XY	NA
29	LMA-M6	46, XY	NA
30	LMA-M7	46, XY	NA
31	LLA - pré B	46, XY	t(9;22) –
32	LLA - pré B	46, XX	t(9;22) –
33	LLA-T	ausente mitose	NR
34	LLA-T	ausente mitose	t(9;22)–
35	LLA-T	46, XY	NR
36	LLA-T	46, XY	t(9;22)–
37	LLA-T	46, XY	NR
38	Bifenotípica	46, XY	NA

Abreviações. FAB: French-American-British; LMA: Leucemia Mielóide Aguda; LLA: Leucemia Linfóide Aguda; eos: eosinofílica; MO: Medula Óssea; Leuco: Leucócitos; Hb: Hemoglobina; Plt: Plaquetas; F: Feminino; M: Masculino; NA: Não Aplicável; NR: Não Realizado; ND: Não Disponível; RC: Remissão Completa.

Apêndice II

Tabela 8 : Primers utilizados na validação do array

Gene	Seqüência NCBI	Nome do Primer	Seqüência do Primer	Amplicon
MX1	<u>NM_002462</u>	<i>MX1f</i>	acctgatggcctatcaccag	154
		<i>MX1r</i>	ttcaggagccagctgtaggt	
CEBPG	<u>NM_001806</u>	<i>CEBPGf</i>	gagaatgaacggttggaagc	100
		<i>CEBPGr</i>	cgttgtctgaaggttgtgt	
GLO1	<u>NM_006708</u>	<i>GLO1f</i>	tgaattgctgtcctgatg	104
		<i>GLO1r</i>	atgccaggccttcattta	
FOXO1A	<u>NM_002015</u>	<i>FOXO1Af</i>	aagagcgtgccctactca	118
		<i>FOXO1Ar</i>	ttccttcattctgcacacga	
NPM1	<u>NM_002520</u> <u>NM_199185</u>	<i>NPM1f</i>	ttgtgaagcagaggcaatg	158
		<i>NPM1r</i>	aatatgcactggccctgaac	
AMIGO 2	<u>NM_001806</u>	<i>AMIGO2f</i>	atgccattcatcgattctc	104
		<i>AMIGO2r</i>	cttcaggggttccaaaaaca	
BMF	<u>NM_001003940</u>	<i>BMFf</i>	gaaccccagcgactcttta	137
	<u>NM_001003942</u>	<i>BMFr2</i>	ttcgggcaatctgtacctc	
	<u>NM_001003943</u>	<i>BMFr3</i>	ccccgttctgttctctc	
STAT1	<u>NM_007315</u>	<i>STAT1f</i>	caccagagccaatggaactt	111
	<u>NM_139266</u>	<i>STAT1r</i>	gcaggttgtctgtggtctga	
MALT1	<u>NM_006785</u>	<i>MALT1f</i>	gggtgaaaaagggtgcacag	132
	<u>NM_173844</u>	<i>MALT1r</i>	gccaagactgccttgactc	
PTEN	<u>NM_000314</u>	<i>PTENf</i>	gctacctgttaaagaatcatctgg	182
		<i>PTENr</i>	catgaactgtcttccgt	
SIAH1	<u>NM_003031</u>	<i>SIAH1fiso1</i>	cagactgctacagcattacctacc	103
		<i>SIAH1r</i>	gactcgccaagtcattgttg	
	<u>NM_001006610</u>	<i>SIAH1fiso2</i>	tggaggggagtctgttcac	
PI3KR2		<i>PIK3R2f</i>	gtacgtgggcaagatcaacc	148
		<i>PIK3R2r</i>	gtagatgacgcagtgcttg	
BCL2	<u>NM_000657</u>	<i>BCL2f</i>	atgtgtgtggagagcgtaa	136
	<u>NM_000633</u>	<i>BCL2r</i>	acagttccacaaaggcatcc	
SEMAD4	<u>NM_006378</u>	<i>SEMA4Df</i>	aatgtgcagaaaaggggaaa	100
		<i>SEMA4Dr</i>	ttgtcccacacagtaaag	
FOXO3A	<u>NM_001455</u>	<i>FOXO3Af</i>	acaaacggctcactctgtcc	168
	<u>NM_201559</u>	<i>FOXO3Ar</i>	tcttgccagttccctcattc	
SOCS3	<u>NM_003955</u>	<i>SOCS3f</i>	ggcactctcagcatctct	150
		<i>SOCS3r</i>	gtccaggaactcccgaatg	
		<i>SOCS3rg</i>	ttctgtgctgtgcatgt	
TP53INP	<u>NM_033285</u>	<i>TP53INP1f</i>	cctccaaccaagaaccagaa	147
		<i>TP53INP1r</i>	ctgaaggggtgctcagtagtg	
NFKB	<u>NM_001077494</u>	<i>NFKB1f</i>	cacctagctgccaagaagg	139
	<u>NM_002502</u>	<i>NFKB1r</i>	atggcaggctattgctcatc	
ZDHHC16	<u>NM_198044</u>	<i>ZDHHC16f</i>	acgactctgtggcatttct	126
		<i>ZDHHC16fiso4f</i>	gctccctgcttacaactcct	130
		<i>ZDHHC16r</i>	gagacggtggcgatatcatt	

GADD45B	<u>NM_015675.</u>	GADD45B	acagtgggggtgtacgagtc	
	-	GADD45B	ggatgagcgtgaagtggatt	127
TRAF3	<u>NM_003300.2 ?</u>	TRAF3	taatgctgggacatctgctg	
	<u>NM_145725.1</u>	TRAF3	ctcgcaggtctttcctcaag	108
PHF17	<u>NM_199320</u>	PHF17f	cctgggatcgaatgatg	
	<u>NM_024900</u>	PHF17r	cagcagacatttgctgaa	196
BNIP2	<u>NM_004330</u>	BNIP2f	gggatattatgggatgga	
	-	BNIP2r	ggcattttctcgagtg	194
IHPK2	<u>NP_001005909.1</u>	IHPK2f	gtcctctggagcccttgt	143
	<u>NP_057375.2</u>	IHPK2r	ggagtgaattgcgcatctc	
SGPL1	<u>NM_003901</u>	SGPL1f	aagcgaagaccacaggaatg	
	-	SGPL1r	tcggtgctgtacaagctgctc	112
ING4	<u>NM_016162.2</u>	ING4f	atccaacgaaccacctat	
	-	ING4r	aggcaaatggaaccactca	102

Seqüência referência e primers dos genes escolhidos para serem validados no microarray.

Primeira coluna, nome do gene, **segunda coluna** seqüência referencia das isoformas

NCBI, **terceira coluna** nome dados aos primers sendo “**f**” para primer sense e “**r**” para

primer sense **Quarta Coluna**: seqüência do primer propriamente dita. **Quinta coluna**:

Tamanho do amplicon em pares de bases. Os primers foram desenhados no software Primer

3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).