

FLÁVIA OLIVEIRA PINHO

**ASPECTOS DE ALTERAÇÕES CELULARES E
MOLECULARES INDUZIDAS PELA REDUÇÃO NA
PRODUÇÃO DE AHSP (ALPHA HEMOGLOBIN
STABILIZING PROTEIN) PELA INTERFERÊNCIA DE RNA
EM CÉLULAS K562**

CAMPINAS

2007

FLÁVIA OLIVEIRA PINHO

**ASPECTOS DE ALTERAÇÕES CELULARES E
MOLECULARES INDUZIDAS PELA REDUÇÃO NA
PRODUÇÃO DE AHSP (ALPHA HEMOGLOBIN
STABILIZING PROTEIN) PELA INTERFERÊNCIA DE RNA
EM CÉLULAS K562**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia
Médica, área de concentração em Medicina Experimental.*

ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO FERREIRA COSTA

CAMPINAS

2007

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

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

P655a Pinho, Flávia Oliveira
Aspectos de alterações celulares e moleculares induzidas pela
redução na produção de AHSP (Alpha hemoglobin stabilizing protein)
pela interferência de RNA em células K562 / Flávia Oliveira Pinho.
Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Fernando Ferreira Costa
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. RNA interferência. 2. Hemoglobinas. 3. Expressão gênica.
4. Talassemia. I. Costa, Fernando Ferreira. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Cellular and molecular implications induced by AHSP
knockdown in K562 cells**

Keywords: • RNA Interference
• Hemoglobins
• Gene Expression
• Thalassemia

Titulação: Mestrado Fisiopatologia Médica
Área de concentração: Medicina Experimental

Banca examinadora: Prof Dr Fernando Ferreira Costa
Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati
Prof Dr José Orlando Bordin

Data da defesa: 29-03-2007

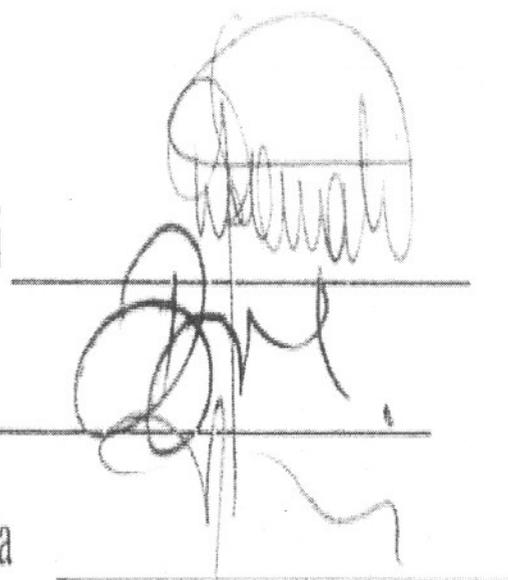
Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Fernando Ferreira Costa

Professor (a) Doutor (a) Maria de Fátima Sonati

Professor (a) Doutor (a) José Orlando Bordin

Professor (a) Doutor (a) Fernando Ferreira Costa

Handwritten signatures of the examiners and advisor, written over horizontal lines. The signatures are in black ink and appear to be cursive or semi-cursive.

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

Data: 29/03/2007

200740198

Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Membros Titulares:

1. Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

2. Prof. Dr. José Orlando Bordin

Membros Suplentes:

1. Profa. Dra. Joyce Maria Annichino Bizzacchi

2. Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego

Curso de Pós-graduação em Fisiopatologia Médica, Área de Medicina Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29.03.2007

DEDICATÓRIA

*A minha Madrinha, Tio Pedro,
meu Papai, minha Mamãe,
Vinícius, Felipe e Fabiana.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer profundamente ao Prof. Fernando F. Costa por ter confiado em mim em todos os momentos nestes últimos anos e por ter orientado-me em minha iniciação científica e agora em meu Mestrado.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por ter concedido-me financiamento durante todo o Mestrado.

Aos membros da banca examinadora por gentilmente terem aceitado nosso convite.

Ao Prof. Sérgio F. dos Reis e ao Prof. Arnaldo R. dos Santos Jr. pela amizade e orientação em todos os momentos desde quando ingressante do Curso de Ciências Biológicas na Unicamp.

À Dulcinéia por ter ensinado-me como entender os estudos de Biologia Molecular, a proceder nos experimentos laboratoriais; e dedicado a mim e a todos ao seu redor grande amizade e companheirismo.

Aos companheiros de laboratório Lúcia (Ucha), Sheila, Renata, Magnum, Ângela, Nicola, Fernanda, Alan, Suelen, Anderson, Camila Oresco, Luciana Hollanda, Flávia Costa, Carol, Adriana, Heloisa, Dênis, Silvia, Fabíola, Andréia, Flávia Leonardo, Sheley, Babi, Camila Almeida, Tiago, Luciana Moreira, Marcos, Gustavo, Carla, Manoela, Helvia, Mariana, Marcelo, Mariana Lazarini, Patrícia Rodrigues, Maria Tereza, Carol Bigarella, Luciene, Ana Flávia, Regiane, Lena, Simone, Patrícia Favaro, Letícia, Paula, Samuel e Deva por todos os momentos de aprendizado.

À minha Madrinha e Tio Pedro por todas as valiosas lições, todo carinho e apoio desde quando estava ainda por ser gerada.

Aos meus pais por terem sido meu alicerce durante todos estes anos e por terem me ensinado aos poucos a germinar o meu próprio.

Ao Vinícius simplesmente por todos os momentos que vivemos juntos desde o dia em que o conheci.

Aos meus queridos irmãos, Lipe e Bia, pela amizade, carinho, companheirismo e principalmente por sempre terem entendido meus momentos de ausência.

À Karen pela inestimável amizade e companheirismo durante todos estes anos.

À Dôra por todo carinho e preocupação comigo desde o dia em que a conheci.

À Tau, Jesser e Tio Thêo por todo apoio e preocupação durante todos estes anos de estudo.

	PÁG.
RESUMO	xii
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO	18
Hemoglobinas normais humanas.....	19
A síndrome β -talassêmica.....	22
<i>Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein (AHSP)</i>	23
Interferência de RNA (RNAi).....	28
OBJETIVOS	30
MATERIAIS E MÉTODOS	32
Desenho de <i>short hairpin</i> RNA (shRNA) para AHSP.....	33
Clonagem e Transformação de Bactéria.....	34
Sequenciamento.....	35
Produção do Vetor em Larga Escala.....	35
Padronização dos Métodos de Transfecção.....	35
Padronização da concentração de Neomicina.....	38
Cultura de Células.....	38
<i>Real Time</i> PCR e Análise da Expressão Gênica.....	39
Citometria de Fluxo e Imunofluorescência.....	40
Análise Estatística.....	42
RESULTADOS	43
DISCUSSÃO	61
CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE ABREVIATURAS

AHSP	<i>Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein</i>
α Hb	Cadeias alfa da hemoglobina
β Hb	Cadeias beta da hemoglobina
β -talassemia	Beta-talassemia
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RNA	Ácido ribonucléico
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
PCR	<i>Polimerization Chain Reaction</i>
PI	<i>Propidium iodide</i>
O ₂	Oxigênio
CO ₂	Dióxido de Carbono
LCR	<i>Locus control region</i>
HbF	Hemoglobina Fetal
HbA	Hemoglobina A
HbA ₂	Hemoglobina A ₂
TSE	<i>Transmissible Spongiform Encephalopathies</i>
EDRF	<i>Erythroid Differentiation-Related Factor</i>
BFU-E	<i>Burst Forming Unit Erythroid</i>
CFU-E	<i>Colony-Forming Units Erythroid</i>
RNAi	<i>RNA interference</i>
dsRNA	<i>Double strand RNA</i>
siRNA	<i>Short interfering RNA</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
mRNA	RNA mensageiro
shRNAs	<i>short hairpin RNAs</i>

LISTA DE TABELAS

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1- Nove padronizações realizadas embasadas na proporção de DNA e Effectene.....	37
Tabela 2- Relação de <i>primers</i> utilizados para o <i>Real Time PCR</i>	39
Tabela 3 - Padronização da concentração de G418. A concentração escolhida está em negrito.....	45

		PÁG.
Figura 1-	Desenvolvimento ontogenético normal das cadeias globínicas.....	21
Figura 2-	Mecanismo molecular desempenhado pela AHSP que estabiliza as cadeias alfa da hemoglobina.....	26
Figura 3-	Importância do íon ferro presente nas cadeias alfa da hemoglobina na produção de ROS.....	27
Figura 4-	Mecanismo de ligação da AHSP com α Hb.....	27
Figura 5-	Mecanismo de ação da interferência de RNA a partir de shRNAs....	29
Figura 6-	Esquema de construção e expressão das moléculas de shRNA para AHSP.....	33
Figura 7-	Esquema do vetor de expressão de moléculas shRNAs, p <i>Silencer</i> 2.1-U6 neo, utilizado neste estudo.....	34
Figura 8-	Esquema do procedimento de eletroporação.....	36
Figura 9-	Esquema do procedimento e atuação do Effectene.....	37
Figura 10-	Representação do ciclo de amplificação em que a reação de PCR para cada gene está na sua faixa exponencial.....	40
Figura 11-	A molécula 2,7-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (H2DCFDA) (reativa ao H2O2) são usados como marcadores oxidativos.....	41
Figura 12-	Exemplo de resultado do sequenciamento (cromatograma) de colônias transformadas.....	44
Figura 13-	Perfil de expressão do gene AHSP quantificada por Real Time PCR (Padronização dos métodos de transfecção).....	47
Figura 14-	Eficiência do silenciamento gênico e morte celular.....	48

Figura 15-	Imunofluorescência de células induzidas por Hemina com marcação para os antígenos da AHSP e β -actina.....	50
Figura 16-	Perfil de expressão do gene AHSP quantificada por <i>Real Time</i> PCR.....	51
Figura 17-	Perfil de expressão do gene α -globina quantificada por <i>Real Time</i> PCR.....	53
Figura 18-	Perfil de expressão do gene γ -globina quantificada por <i>Real Time</i> PCR.....	54
Figura 19-	Perfil de expressão do gene GATA-1 quantificada por <i>Real Time</i> PCR.....	55
Figura 20-	Imunofluorescência de células induzidas por Hemina com marcação para os antígenos da α -globina e β -actina.....	56
Figura 21-	Imunofluorescência de células induzidas por Hemina com marcação para os antígenos da HbF e β -actina.....	57
Figura 22-	Identificação da hemoglobina fetal por citometria de fluxo.....	58
Figura 23-	Identificação de ROS por citometria de fluxo.....	59
Figura 24-	Porcentagem de células marcadas positivamente para Anexina e PI.....	60

RESUMO



A AHSP é uma proteína que se liga à α Hb, prevenindo a precipitação e a atividade pró-oxidante da mesma. Na presença de β Hb, o complexo protéico α Hb-AHSP é desmembrado e a β Hb desloca a AHSP para formar a estrutura quaternária da hemoglobina. Em estudo com camundongos portadores de β -talassemia com deleção do gene AHSP, foi demonstrado que estes camundongos apresentaram maior precipitação de α Hb em seus eritrócitos e níveis acentuados de anemia. Adicionalmente, estudos *in vitro*, utilizando proteína recombinante, mostraram que quando as α Hbs encontram-se estabilizadas pela AHSP, há menor produção de ROS em solução fisiológica. Desta forma, têm sido proposto que a AHSP talvez desempenhe um importante papel como modulador da gravidade clínica nas síndromes β -talassêmicas. A relação entre a formação da hemoglobina e alterações na expressão do gene AHSP ainda é desconhecida em humanos. O estudo de tal relação molecular seria fundamental para que o papel da AHSP na eritropoese humana fosse melhor entendido, bem como embasaria futuros estudos sobre a gravidade clínica nas síndromes β -talassêmicas em humanos. Diante disso, a relação entre a formação da hemoglobina e a diminuição da expressão do gene AHSP foi investigada neste estudo. Este trabalho teve como objetivos: induzir o silenciamento estável do gene AHSP em células humanas de linhagem eritróide, identificar possível precipitação de α Hbs em células com redução na expressão do gene AHSP e investigar implicações no metabolismo celular decorrentes da diminuição significativa da expressão deste gene. Desta forma, células K562 foram transfectadas sem vetor, com vetor de expressão de *short hairpin RNAs* (shRNAs) para o gene AHSP e com vetor de expressão de shRNAs para uma seqüência de DNA controle não homóloga ao genoma humano através de eletroporação e de um reagente lipídico não lipossômico (Effectene[®]). Após a transfecção, as células passaram por um período de seleção com Neomicina. Terminado este período, o substrato Hemina foi acrescentado ao meio de cultura das células transfectadas e controle, para que a expressão de genes da linhagem eritróide fosse ativada. Amostras das culturas com Hemina foram coletadas e a expressão dos genes AHSP, α -globina, γ -globina e GATA-1 foi quantificada por *real-time PCR*. O silenciamento do gene AHSP, em ambos os processos de transfecção, foi significativo e acima de 70%, propiciando considerável precipitação de α Hb evidenciada por imunofluorescência, bem como acentuada diminuição na produção de

hemoglobina identificada através de citometria de fluxo. Além disso, por meio desta última metodologia, evidenciou-se que as células silenciadas para AHSP tiveram maior produção de ROS e maior porcentagem de marcação celular para Anexina e PI. Adicionalmente, a análise dos dados obtidos por *real-time PCR* demonstrou que não houve alteração significativa na expressão dos genes α -globina e γ -globina, e apenas GATA-1 apresentou expressão tardia significativa nas células silenciadas para AHSP. Finalmente, estes dados indicam que a expressão do AHSP está fortemente relacionada com a formação da hemoglobina e sugerem, pela primeira vez, que este gene codifica uma proteína de função crucial durante a eritropoese humana. Ainda, estes resultados reforçam a função da AHSP descrita previamente em modelos animais.

ABSTRACT



Alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) is a chaperone protein that binds alpha hemoglobin chain (α Hb), avoiding its precipitation and its pro-oxidant activity. In the presence of beta hemoglobin chain (β Hb), the α Hb-AHSP complex is dismembered, β Hb displaces AHSP to generate the quaternary structure of hemoglobin. A study demonstrated that loss of AHSP exacerbates α Hb precipitation and anemia in β -thalassemic mice. Additionally, studies *in vitro* showed that recombinant AHSP inhibits the production of reactive oxygen species caused by α Hb precipitation. Hence, it has been proposed that AHSP may perform an important role as a genetic modifier in β -thalassemia disease. The relationship between hemoglobin formation and alterations in AHSP expression has not yet been described in human cells. Studying this relationship would be strongly important for a better understanding of the AHSP role performed in human erythropoiesis, as well as would support future studies about the possibility of AHSP acts as a genetic modifier in human β -thalassemia syndromes. Faced with the situation described above, we investigated the relationship between hemoglobin formation and reduction in AHSP expression. Our study aimed to induce the stable AHSP knockdown in erythroid human cells, identify possible α Hb precipitation in cells with reduction of AHSP expression and analyze the cellular and molecular aspects resulted from AHSP knockdown in erythroid human cells. Hence, to address this goals short hairpin RNA (shRNA) expression vectors aimed at AHSP mRNA target sequence and at no-human mRNA target sequence were cloned and transfected into K562 cells using eletroporation and a non-liposomal lipid reagent. After transfection, K562 cells were cultured with neomycin which was added to select a population of cells that stably express the AHSP-shRNA. Then, K562 cells were induced to express erythroid genes by hemin addition in cell culture medium. Hemin-induced K562 cell samples were collected and AHSP, alpha-globin, gamma-globin and GATA-1 expressions were quantified by real-time PCR. The RNAi-mediated knockdown of AHSP expression was statistically significant above of 70% in both used ways for cell transfection. Further, AHSP knockdown resulted in a considerable alpha hemoglobin chain precipitation observed through immunofluorescence, as well as in a significant decrease of hemoglobin production identified through flow cytometry. Besides this, AHSP knockdown cells demonstrated an increased reactive oxygen species (ROS) production and were more positive for Annexin and Propidium Iodide (PI) than control cells in flow cytometry assays.

Alpha-globin and gamma-globin expressions did not differ in control, negative and AHSP-shRNA cells. However, GATA-1 had late expression evaluated in hemin- induced AHSP-shRNA cells in relation to control and negative control cells. Finally, these data indicate that AHSP is strongly significant in hemoglobin formation and suggest that AHSP is a key chaperone protein during the human erythropoiesis. Moreover, these data strengthen the fact that AHSP stabilizes the alpha hemoglobin chain to avoid its precipitation and its ability to generate ROS which implicates in cell death as was previously described in a murine model and *in vitro* approaches.

INTRODUÇÃO



Hemoglobinas normais humanas

As hemoglobinas humanas são proteínas de estrutura quaternária formadas por duas cadeias polipeptídicas do grupo da alfa globina (α e ζ) e duas cadeias do grupo da beta globina (β , δ , γ e ϵ), cada uma contém um grupo prostético heme e um derivado porfirínico contendo radical Fe^{2+} . Este radical liga-se reversivelmente à molécula de oxigênio (O_2), formando a oxihemoglobina que é responsável pelo transporte e transferência da mesmo para os tecidos. A ligação reversível da hemoglobina com o dióxido de carbono (CO_2), produzido nos tecidos, resulta na formação da carboxihemoglobina. Estas ligações entre O_2 e CO_2 com o grupo heme da hemoglobina ocorre em células específicas denominadas eritrócitos (Hoffman et al., 1991).

Nos eritrócitos, os genes que codificam as cadeias polipeptídicas do grupo da alfa globina estão localizados no cromossomo 16 na seguinte ordem 5'- $\zeta 2$ - $\psi \zeta 1$ - $\psi \alpha 2$ - $\psi \alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 1$ - θ -3' (Fig. 1A). Entretanto, os genes que codificam as cadeias polipeptídicas do grupo da beta globina estão localizados no cromossomo 11 na seguinte ordem 5'- ϵ - γ - γ - β - δ - β -3' (Fig. 1A). Os dois grupos de genes codificantes das cadeias globínicas possuem similaridades como: uma importante região reguladora da expressão gênica nas seqüências promotoras dos mesmos que possui sítios de ligação para fatores de transcrição eritróide. A região reguladora no promotor dos genes do grupo da alfa globina recebe o nome de HS-40 e a no promotor dos genes do grupo da beta globina é nomeada LCR (*locus control region*) (Fig. 1A) (Weatherall e Clegg, 2001).

A ativação das regiões reguladoras de ambos os grupos de genes codificantes das cadeias globínicas segue a orientação 5' \Rightarrow 3'. Além disso, tal ativação está sincronizada de acordo com os estágios do desenvolvimento humano (Fig. 1B). No embrião são produzidas, no saco embrionário, as seguintes hemoglobinas: Portland ($\zeta 2 \epsilon 2$), Gower I ($\zeta 2 \epsilon 2$) e Gower II ($\alpha 2 \epsilon 2$). No feto, até pouco antes do nascimento, a hemoglobina sintetizada é a Fetal ($\alpha 2 \gamma 2$). Após o nascimento, a hemoglobina fetal (HbF) é substituída pela HbA ($\alpha 2 \beta 2$) e HbA2 ($\alpha 2 \delta 2$) durante o primeiro ano de vida, contudo a HbF permanece sendo produzida em adultos normais em pequenas quantidades, aproximadamente 1% da produção total de hemoglobinas (Stamatoyannopoulos e Grosfeld, 2001).

Mutações nos genes responsáveis pela produção das cadeias globínicas causam distúrbios hereditários associados à hemoglobina. Estes distúrbios caracterizam as hemoglobinopatias que podem ser divididas em três grandes grupos: as relacionadas com alterações estruturais na hemoglobina, as com alterações que resultam na persistência da produção de HbF durante a vida adulta e as com alterações na síntese da hemoglobina (Weatherall, 2001).

As talassemias compreendem as hemoglobinopatias relacionadas com alterações na síntese da hemoglobina. Estas alterações caracterizam-se por ineficiência na produção de um dos pares de cadeias da hemoglobina. Assim, cada Talassemia é classificada pelo tipo de cadeia da hemoglobina que ineficientemente é produzida como, por exemplo, a β -talassemia na qual a síntese da cadeia beta da hemoglobina é insuficiente ou nula (Weatherall, 2004).

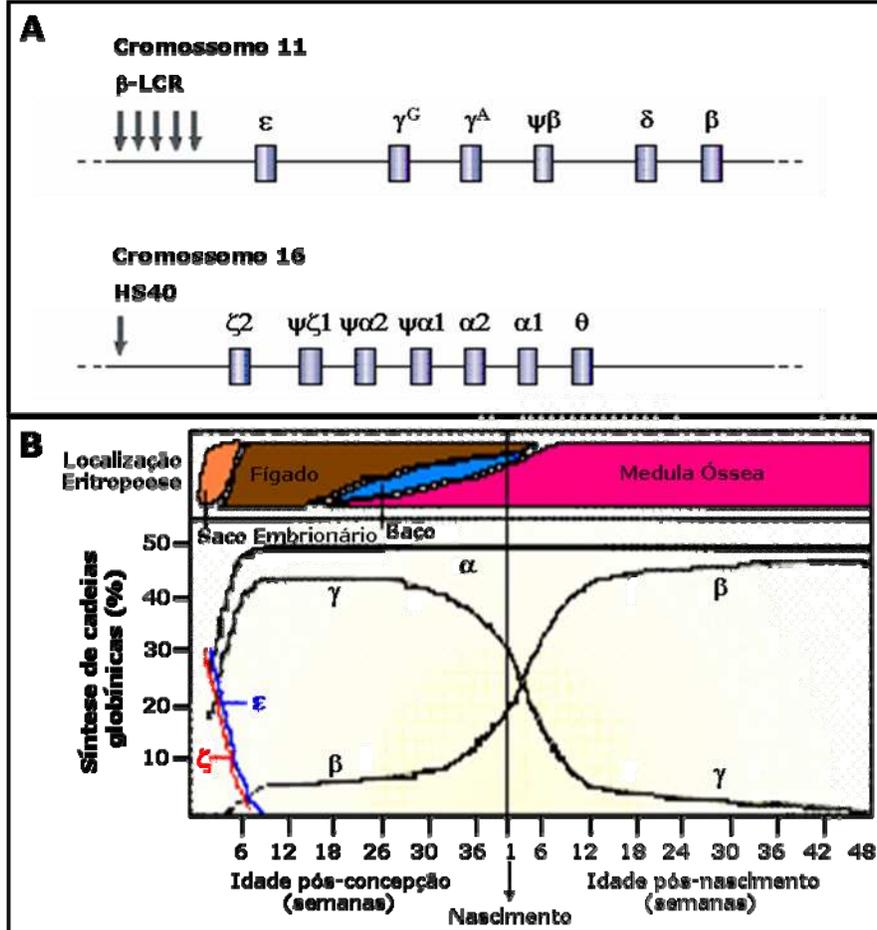


Figura 1- Desenvolvimento ontogenético normal das cadeias globínicas. **A.** Genes que codificam as cadeias globínicas do grupo da β -globina no cromossomo 11 e genes que codificam as do grupo da α -globina no cromossomo 16. **B.** Produção das cadeias globínicas de acordo com o desenvolvimento humano. As setas indicam os sítios sensíveis à DNase I que acredita-se estar envolvida na regulação da expressão dos genes das cadeias globínicas (Weatherall, 2001).

A síndrome β -talassêmica

A característica principal da β -talassemia é a deficiência na síntese da β -globina, a qual leva a um desequilíbrio na produção das cadeias beta da hemoglobina e, conseqüentemente a um excesso de cadeias alfa da hemoglobina. As cadeias alfa em excesso se agregam e precipitam nos precursores eritróides, causando maturação célula anormal, bem como destruição prematura destas células na medula óssea (Weatherall, 1998).

As evidências são muitas na literatura que mostram que a severidade β -talassêmica está associada ao grau de desequilíbrio entre a produção das cadeias globínicas. Uma vez que a produção das cadeias beta da hemoglobina está reduzida ou nula nos eritrócitos β -talassêmicos, a precipitação de cadeias alfa no citoplasma dos mesmos ocorre e conseqüentemente gera a produção de ROS que promove danos irreversíveis à membrana dos eritrócitos β -talassêmicos. Assim, estes são destruídos no baço em grande quantidade, levando a um aumento anormal do volume deste órgão. Além disso, o desequilíbrio na síntese das cadeias globínicas resulta em um grau variável de anemia, o qual estimula a produção de eritropoetina. Tal composto promove a proliferação e expansão da medula óssea, gerando deformidades ósseas (Scott et al., 2006)

Desta forma, fica evidente que as principais complicações na β -talassemia são a esplenomegalia, anormalidades no desenvolvimento ósseo e danos no sistema endócrino e cardíaco. Este quadro clínico observado nos pacientes β -talassêmico pode estar relacionado ao grau de anemia associado à quantidade de ferro no organismo, originada pela elevada absorção de ferro presente no eritrócitos destruídos no baço e por repetidas transfusões de sangue recebidas como uma das formas de tratamento da doença (Weatherall et al, 2001).

Apesar das conseqüências da precipitação das cadeias alfa da hemoglobina nos precursores eritróides serem bem definidas, a caracterização do fenótipo clínico da β -talassemia é extremamente diversificada. Os homozigotos β -talassêmicos são profundamente anêmicos desde o segundo ou terceiro mês de vida e se não são tratados

com transfusões de sangue regularmente, morrem nos primeiros dois anos de vida, tal condição conhecida como talassemia maior. Por outro lado, alguns pacientes também homocigotos para β -talassemia possuem um fenótipo clínico que pode variar entre menos severo que a talassemia maior por possuírem maior concentração de hemoglobina funcional e assintomático. Esta diversidade fenotípica encontrada em homocigotos é conhecida como as talassemias intermediárias (Stamatoyannopoulos e Grosveld, 2001).

Ainda reforçando a variabilidade fenotípica encontrada na β -talassemia, está o heterocigoto β -talassêmico, conhecido como traço talassêmico que possui apenas um alelo para β -talassemia. Este pode apresentar uma anemia quase tão severa quanto a talassemia maior, expressar uma anemia moderada e algumas mudanças morfológicas em seus eritrócitos ou, interessantemente, não apresentar anemia nem mesmo anormalidades hematológicas (Stamatoyannopoulos e Grosveld, 2001).

Assim, apesar da β -talassemia ser considerada uma doença de hereditariedade monogênica clássica, os pacientes que possuem mutações idênticas herdadas no gene da β -globina, que deveriam expressar o mesmo fenótipo, apresentam variabilidade clínica considerável (Rund e Rachmilewitz, 2005). Desta forma, tem sido proposto que muitos outros genes podem estar associados à expressão do fenótipo clínico diversificado presente em pacientes β -talassêmicos (Weatherall, 2004).

Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein (AHSP)

O gene da *Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein* (AHSP) está localizado no cromossomo 16 humano e é composto de aproximadamente 1,8kb de DNA com estrutura genômica organizada em três éxons e dois íntrons (NCBI *on-line*, 2007). O RNA mensageiro do AHSP apresenta aproximadamente 600pb e codifica uma proteína de 102 aminoácidos (NCBI *on-line*, 2007).

Inicialmente, o gene AHSP foi nomeado como EDRF (*Erythroid Differentiation-Related Factor*) e identificado pela primeira vez por Miele et al. (2001) em estudo delineado para encontrar marcadores moleculares de TSE (*Transmissible Spongiform Encephalopathies*). Neste trabalho, a diferença de expressão de inúmeros

genes foi avaliada em baço de camundongos diagnosticados com TSE e em baço de camundongos controle. Adicionalmente, observaram menor expressão do gene EDRF em camundongos com TSE em fase terminal do que em animais controle, que apresentaram maior nível de expressão do EDRF na medula óssea (Miele et al., 2001). Além disso, nestes animais a expressão deste gene também foi detectada no baço e no sangue. Por outro lado, ensaios de *Northern blotting* com tecidos humanos revelaram que o EDRF teve expressão detectada apenas no sangue e na medula óssea e não no baço. Além disso, a expressão do EDRF mostrou-se restrita à linhagem eritróide, sendo evidenciada em altos níveis em células BFU-E (*Burst Forming Unit Erythroid*), CFU-E (*Colony-Forming Units Erythroid*) e eritróides maduras positivas para TER-119 (Miele et al., 2001).

Um estudo de genes induzidos pelo fator de transcrição essencialmente eritróide, GATA-1, identificou a proteína EDRF como sendo eritróide específica (Kihm et al., 2002). Adicionalmente, Kihm et al. (2002) descreveu que a proteína EDRF possuía a função de evitar a precipitação das cadeias alfa da hemoglobina livres em solução fisiológica, uma vez que formava um complexo solúvel e estável com as mesmas (Fig. 2). Contudo, a EDRF não possuía afinidade em ligar-se às cadeias beta da hemoglobina ou ao tetrâmero da hemoglobina (Kihm et al., 2002). Assim, com base na função do gene EDRF identificada por Kihm et al. (2002), o mesmo foi renomeado para AHSP. Além disso, neste estudo de Kihm et al. (2002), camundongos deficientes de AHSP foram gerados e apresentaram crescimento e desenvolvimento normal. Embora estes camundongos apresentassem níveis de hemoglobina e hematócrito normais, possuíam níveis elevados de reticulócitos, caracterizando uma diminuição no tempo normal de vida dos eritrócitos. Ainda, os eritrócitos destes camundongos apresentaram morfologia anormal, como corpos de inclusão (corpos de Heinz), o que caracteriza a precipitação de cadeias alfa da hemoglobina (Kihm et al., 2002). Segundo Kihm et al. (2002), o fenótipo encontrado nos eritrócitos dos camundongos deficientes de AHSP poderia ser associado ao fenótipo freqüentemente encontrado em eritrócitos de pacientes β -talassêmicos.

Em outro estudo também realizado com camundongos deficientes para AHSP, ensaios bioquímicos demonstraram que os eritrócitos destes camundongos apresentavam maior expressão de espécies reativas de oxigênio (ROS) com evidência de dano celular causado por radicais livres (Kong et al., 2004). Estes camundongos deficientes de AHSP

também tiveram aumento no número de reticulócitos, como encontrado por Kihm et al. (2002), porém, seus reticulócitos possuíam características apoptóticas. Além disso, Kong et al. (2004) mostraram que a AHSP recombinante purificada inibia a produção de ROS gerada por cadeias alfa da hemoglobina livres em solução (Fig. 3). Ainda, Kong et al. (2004) mostraram que embriões β -talassêmicos deficientes de AHSP tiveram seu fenótipo β -talassêmico agravado. Desta forma, tem sido proposto que diferenças alélicas ou variações na seqüência do gene AHSP poderiam, possivelmente, atuar como moduladores da gravidade β -talassêmica (Viprakasit et al., 2004; Lai et al., 2006).

Uma vez que o gene AHSP poderia possivelmente estar relacionado com a variabilidade fenotípica encontrada nos pacientes β -talassêmicos, estudos focados na interação molecular entre AHSP e alfa-globina têm sido realizados com o intuito de esclarecer esta interação. Assim, a primeira informação estrutural sobre a interação entre AHSP e cadeias alfa da hemoglobina foi demonstrada em estudo bioquímico com AHSP recombinante, no qual a AHSP foi descrita como uma proteína predominantemente globular formada por alfa-hélices que se liga à alfa-globina em uma relação estequiométrica de 1:1 (Gell et al., 2002). Em seguida, foi demonstrado que a razão entre a expressão do gene AHSP e a expressão do gene alfa-globina permanece constante durante a eritropoese humana (dos Santos et al., 2004). Além disso, durante a eritropoese humana, o perfil de expressão gênica do AHSP e da alfa-globina seguem o mesmo padrão, o qual caracteriza-se por aumento no nível de expressão de ambos os genes durante a diferenciação eritróide, por ambos atingirem o pico de expressão no momento em que a síntese de hemoglobina é mais intensa e por redução no nível de expressão de ambos quando o núcleo das células eritróides perde sua função e a síntese de hemoglobina é reduzida (dos Santos et al., 2004). Posteriormente, a interação química da ligação da AHSP com a alfa-globina foi descrita como extensa, porém não ótima, o que justifica o fato da β -globina poder competitivamente desmembrar o complexo AHSP/alfa-globina para formar o tetrâmero da hemoglobina ($\alpha_2\beta_2$) (Feng et al., 2004).

Estudos bioquímicos *in vitro* mais aprofundados na interação química da ligação da AHSP com a alfa-globina demonstraram que tal ligação resulta em diminuição da reatividade da Fe^{2+} -alfa-globina oxigenada e na rápida formação do complexo

AHSP/Fe³⁺-alfa-globina desoxigenado, o qual exibe menor reatividade com as espécies reativas de oxigênio como o peróxido de hidrogênio (Fig. 4) (Feng et al., 2005). A formação do complexo AHSP/Fe³⁺-alfa-globina ocorre através da auto-oxidação da alfa-globina oxigenada ligada a AHSP e este processo é extremamente acelerado em condições fisiológicas de temperatura e pressão de oxigênio (Feng et al., 2005). Ao contrário das cadeias de Fe³⁺-alfa-globina livres, o complexo AHSP/Fe³⁺-alfa-globina não precipita em solução fisiológica e permite que, através de uma redução enzimática, a cadeia de Fe³⁺-alfa-globina seja reciclada formando hemoglobina funcional (Feng et al., 2005). Por outro lado, a reação do complexo AHSP/Fe²⁺-alfa-globina com β -globina, para a formação da hemoglobina, é instantânea e não necessita de ação enzimática para ocorrer (Zhou et al., 2006). Desta forma, Feng et al. (2005) e Zhou et al. (2006) mostraram que a ligação da AHSP às cadeias alfa da hemoglobina livres em solução inibe a atividade pró-oxidante das mesmas.

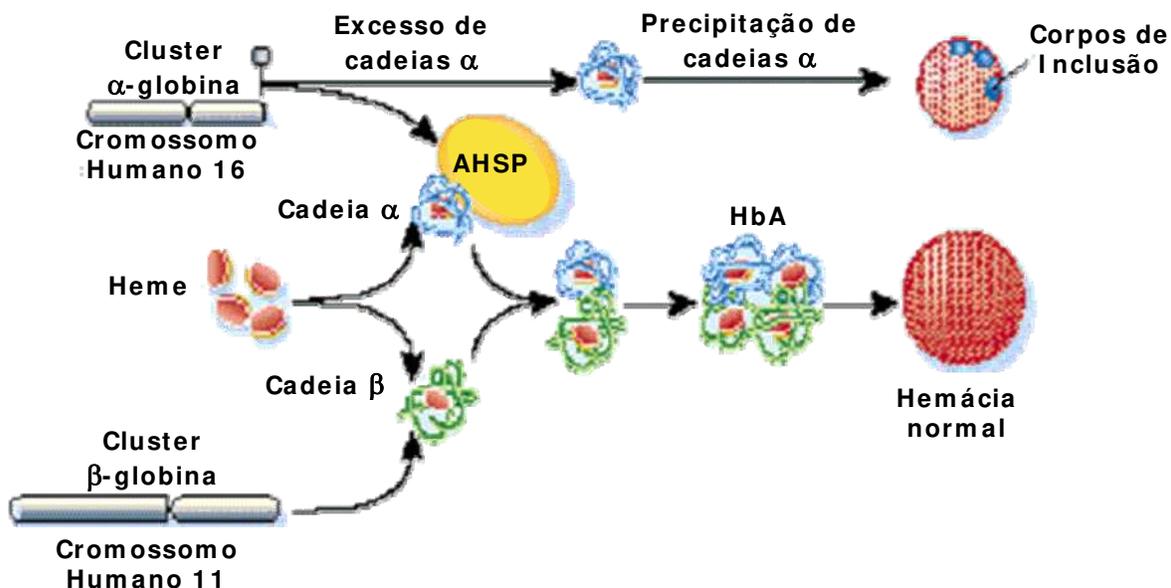


Figura 2- Mecanismo molecular desempenhado pela AHSP que estabiliza as cadeias alfa da hemoglobina (Kihm et al., 2002)

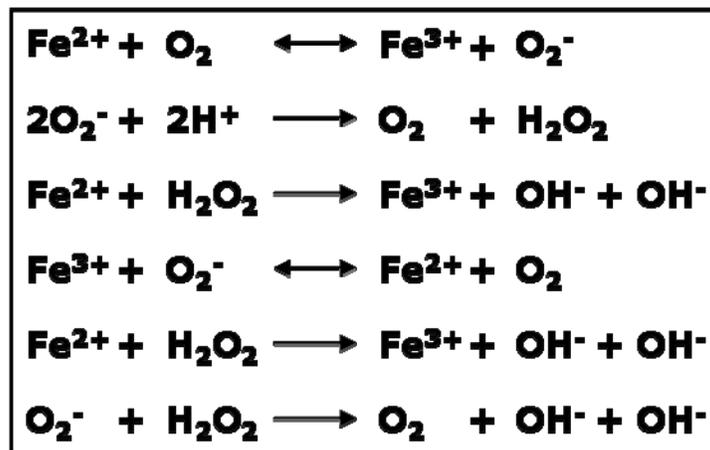


Figura 3- Importância do íon ferro presente nas cadeias alfa da hemoglobina na produção de ROS. Como pode ser observado o Fe²⁺ ele reage com peróxido de hidrogênio produzindo radicais livres hidroxila muito reativo e danosos para a célula. Apesar do Fe³⁺ não reagir diretamente com H₂O₂, formando radicais livres. Este serve de substrato para formar Fe²⁺, contribuindo de modo indireto na formação de radicais livres.

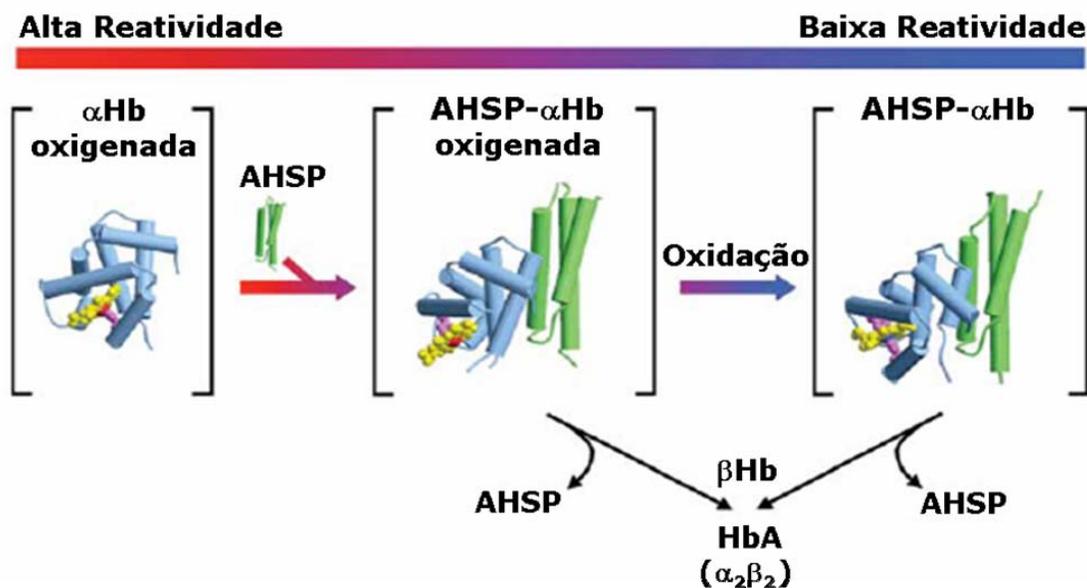


Figura 4- Mecanismo de ligação da AHSP com α Hb que reduz reatividade do grupo heme presente na α -globina. Cadeias alfa da hemoglobina oxigenadas e livres em solução possuem reatividade química alta, porém esta reatividade diminui quando a mesma se liga à AHSP e permanece muito baixa quando o complexo AHSP- α Hb é desoxigenado por oxidação (Feng et al., 2005).

Interferência de RNA (RNAi)

Uma forma muito robusta de causar alterações na expressão gênica, em células de linhagem estabelecida ou primária, é a indução da interferência de RNA de um determinado gene. A interferência de RNA (RNAi) é um mecanismo genético de vigilância conservado durante a evolução que permite reduzir de forma específica a expressão pós-transcricional dos genes alvo (Rana, 2007).

A descoberta de que a RNAi é uma resposta biológica às moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) foi realizada, primeiramente, em um nematódeo conhecido como *Caenorhabditis elegans*. Fire et al. (1998) injetaram dsRNAs na porção ventral de tal nematódeo e descobriram que os genes, que tinham seqüências complementares às dos dsRNAs, foram silenciados, ou seja, tiveram a expressão reduzida. Desde o estudo de Fire et al. (1998), o mecanismo da RNAi tem sido descrito em quase todos os eucariotos (Hannon, 2002). Além disso, tem sido demonstrado na literatura que a RNAi desempenha importantes papéis em diversos processos biológicos como a regulação do desenvolvimento, resposta anti-viral e remodelação da cromatina (Rana, 2007).

O mecanismo da RNAi, em mamíferos, inicia-se com o processamento dos dsRNAs pela Dicer, uma enzima RNase III, em pequenas moléculas interferentes, os *short interfering RNAs* (siRNAs), de aproximadamente 22 nucleotídeos em extensão. Os siRNAs são incorporados em um complexo protéico, o *RNA-induced silencing complex* (RISC), que identifica e quebra o mRNA que é complementar à seqüência anti-sense dos siRNAs. Finalmente, endonucleases degradam o mRNA danificado pela RISC, iniciando o silenciamento gênico deste mRNA alvo (Fig. 5). O mecanismo da RNAi permanece ativo enquanto os dsRNAs estiverem presentes (Leung e Whittaker, 2005).

No *C. elegans*, o efeito do silenciamento gênico pela RNAi é estável, duradouro e hereditário, contudo o silenciamento, nas células de mamíferos pela transfecção de dsRNAs, é transiente. Isto acontece devido ao fato das células de mamíferos terem perdido, ao longo da evolução, a RNA polimerase dependente de RNA que amplifica os siRNAs nos nematódeos e permite a perpetuação dos mesmos por várias gerações. Desta forma, o silenciamento gênico, em células de mamíferos, é dependente do número de moléculas de siRNA transfetadas. Assim, conforme as células se dividem, mais

ineficiente torna-se o silenciamento gênico em mamíferos, pois mais diluída fica a concentração dos siRNAs nas células filhas (Grishok e Mello, 2002; Omi et al., 2004).

Com o objetivo de produzir siRNAs de maneira estável em células de mamífero, sistemas baseados em vetores estão sendo desenvolvidos. Estes vetores contêm promotores para a RNA polimerase III que promovem a expressão dos *short hairpin RNAs* (shRNAs), os quais são posteriormente clivados pela Dicer, produzindo os siRNAs (Fig. 5). Células com expressão estável de siRNAs podem ser selecionadas por meio de antibióticos, pois muitos vetores estão sendo desenvolvidos com marcadores de resistência aos mesmos. (Tuschl, 2002 e Mittal, 2004). Ainda, em trabalhos recentes, tem sido descrito que vetores que expressam shRNAs são indutores mais potentes de RNAi do que moléculas de siRNAs sintetizadas quimicamente (Siolas et al., 2005).

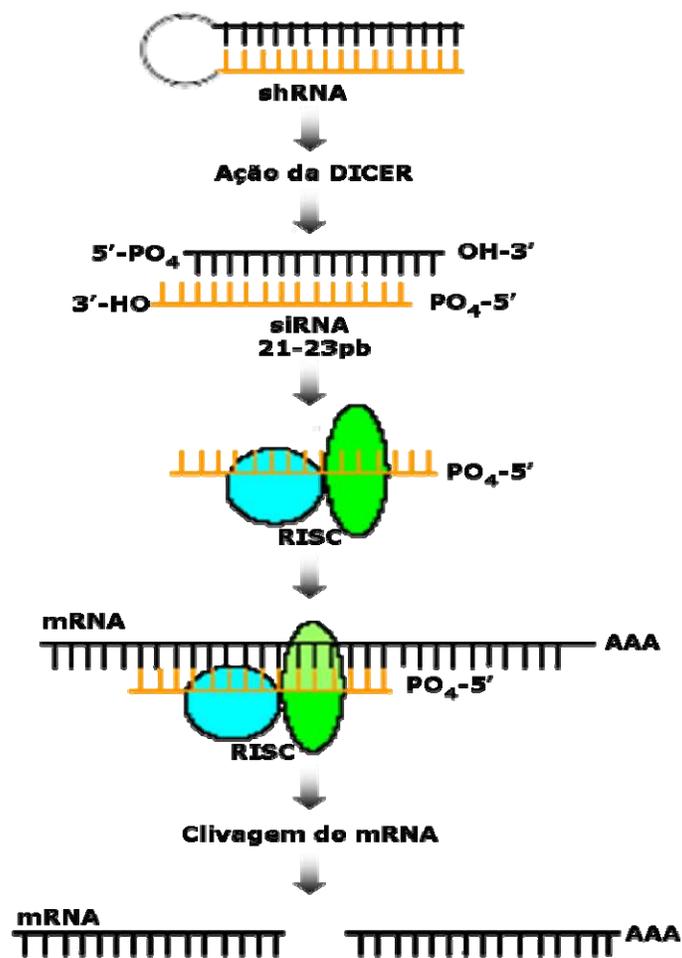


Figura 5- Mecanismo de ação da interferência de RNA a partir de shRNAs.

OBJETIVOS



Que seja de nosso conhecimento não existem relatos dos mecanismos de ação da AHSP em células humanas. Adicionalmente, a relação entre a síntese da hemoglobina humana e alterações na expressão do gene AHSP ainda é desconhecida em humanos. Esta relação, uma vez conhecida, poderia contribuir para esclarecer o papel da proteína AHSP na eritropoese humana. Desta forma, os objetivos deste estudo foram:

- Induzir o silenciamento estável do gene AHSP em células K562 de linhagem eritroleucêmica humana.
- Identificar possível precipitação de cadeias alfa da hemoglobina em células com redução na expressão do gene AHSP.
- Identificar implicações no metabolismo celular frente a redução da expressão do gene AHSP esteja reduzida.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho de *short hairpin* RNA (shRNA) para AHSP

Moléculas de shRNA para AHSP foram desenhadas seguindo o protocolo do fabricante do vetor p*Silencer* 2.1-U6 neo (Ambion) de expressão de moléculas shRNAs. As moléculas de shRNA para AHSP foram geradas através da hibridização de oligonucleotídeos de DNA (IDT) com seqüência sense 5'-GATCCCGAGCGAGACAAGGCTCTGCTCTCAAGAGAGCAGAGCCTTGTCTCGCTCTTTTTTGGAA-3' e anti-sense 5'-AGCTTTCCAAAAAAGAGCGAGACAAGGCTCTGCTCTCTTGAAGCAGAGCCTTGCTCGCTCGG-3' por aquecimento a 90°C por 3min e resfriamento dos mesmos a 37°C por 1h (Fig. 6).

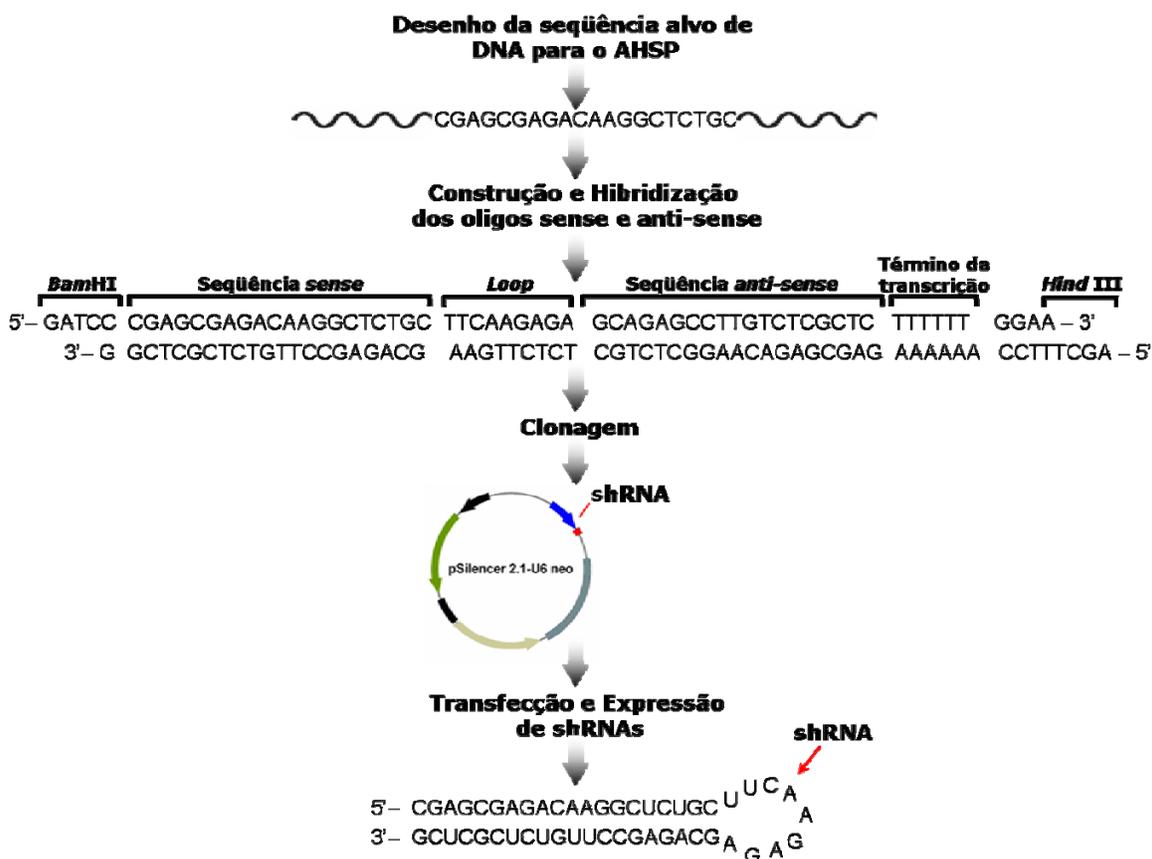


Figura 6- Esquema de construção e expressão das moléculas de shRNA para AHSP.

Clonagem e Transformação de Bactéria

Os oligonucleotídeos hibridizados, que codificam a molécula interferente para AHSP, foram clonados no vetor *pSilencer 2.1-U6 neo* (Fig. 6,7) na presença da enzima T4 ligase a 25°C por 1h. Após clonagem, bactérias DH5 α foram transformadas com 10 μ L do material clonado. A transformação seguiu-se primeiramente a 0°C por 20min, depois a 42°C por 90s e novamente a 0°C por 2min. As bactérias transformadas foram cultivadas em meio líquido *Soc* (10mM de cloreto de magnésio e de sulfato de magnésio, 20mM de glicose, triptona, extrato de levedura, cloreto de sódio e cloreto de potássio) a 37°C, 220rpm por 1h. Após este período, foram plaqueadas em meio sólido LB com 100 μ g/mL de Ampicilina e incubadas em estufa 37°C por 12h. Em seguida, colônias foram selecionadas, cultivadas em meio líquido *Circle Grow*, e tiveram seu DNA seqüenciado para que possíveis mutações existentes fossem verificadas na seqüência codificadora da molécula interferente para AHSP no DNA plasmidial. Um vetor controle negativo, *pSilencer 2.1-U6 neo* com expressão de molécula interferente não-homóloga ao genoma humano ou ao genoma de camundongo nem ao de rato, também foi amplificado em bactérias transformadas.

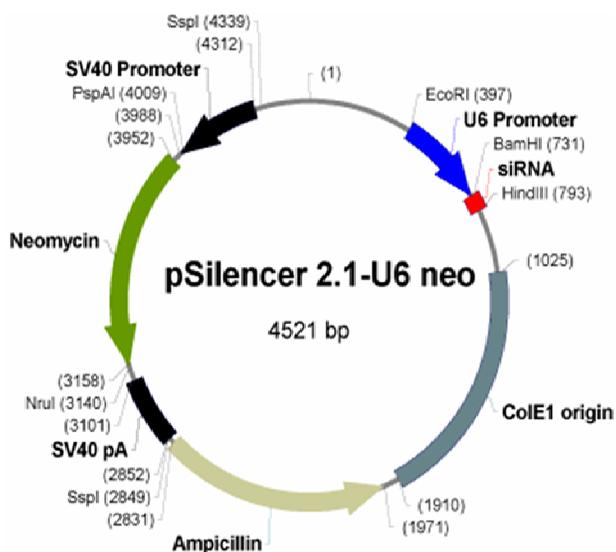


Figura 7- Esquema do vetor de expressão de moléculas shRNAs, *pSilencer 2.1-U6 neo*, utilizado neste estudo.

Sequenciamento

As reações de sequenciamento do DNA plasmidial das colônias selecionadas foram compostas de 1µL de *Big-Dye*TM (*Applied Biosystems*), 2µL do sobrenadante da cultura em meio LB das colônias selecionadas, 1µL do *primer sense* (5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3') a 5µM, 1µL do *primer anti-sense* (5' TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC 3') a 5µM e 6,8 µL de água. A purificação do sequenciamento foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante da *Big-Dye*TM. As amostras foram seqüenciadas no *ABI PRISM*TM 377 DNA Sequencer (*Applied Biosystems*). A leitura do cromatograma foi realizada através do *software ChromasPro*[®].

Produção do Vetor em Larga Escala

Após confirmação no cromatograma da integridade da seqüência codificadora da molécula interferente, um clone bacteriano para o plasmídeo contendo a seqüência da molécula interferente para AHSP e um contendo o plasmídeo controle negativo foram selecionados e crescidos em 500mL de meio LB com ampicilina à concentração de 100mg/mL por 16h. Depois, a extração do DNA bacteriano foi realizada utilizando-se o *QIAGEN Plasmid Mega kit* (*QIAGEN*), seguindo as recombinações do fabricante. Novamente, o DNA produtos destas purificações foi seqüenciado para verificar a integridade da seqüência codificadora interferente para AHSP. Então, os DNAs foram quantificados no *ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer* (*NanoDrop*).

Padronização dos Métodos de Transfecção

1. Eletroporação:

A eletroporação foi realizada em equipamento *Eletro Square Porator* ECM830 (BTX) nos seguintes parâmetros: modo LV, 230V, 15ms, 1 pulso. A quantidade de plasmídeo eletroporada passou pela padronização entre as seguintes concentrações 15, 30 e

60µg. A concentração escolhida foi aquela que propiciou um silenciamento gênico mais eficiente do AHSP. Assim, 1×10^7 células ressuspensas em 500µL de meio Optimem (GIBCO) foram adicionadas ao volume de plasmídeo a ser eletroporado e esta mistura foi colocada no interior de uma cubeta e submetida aos parâmetros de eletroporação (Fig. 8).

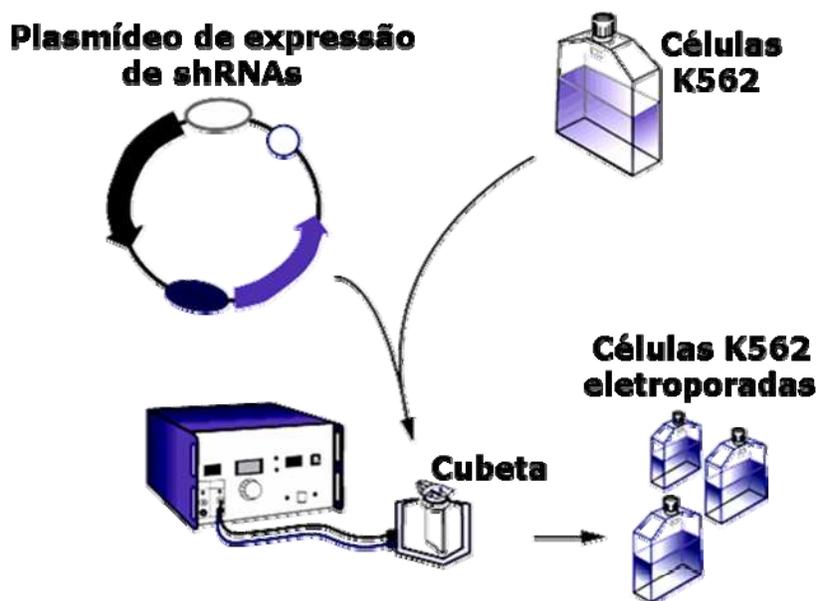


Figura 8- Esquema do procedimento de eletroporação.

2. Effectene:

Effectene (QIAGEN) é um reagente não lipídico não lipossomal que envolve o DNA compactado pelo *Enhancer* com sua monocamada lipídica conhecida como micélios (Fig. 9). Padronizações entre a concentração de DNA plasmidial e a concentração do Effectene foram necessárias para otimizar o silenciamento gênico do AHSP (Tab. 1). A proporção entre *Enhancer* e DNA já havia sido padronizada pelo fabricante, mantendo-se sempre 1:8.

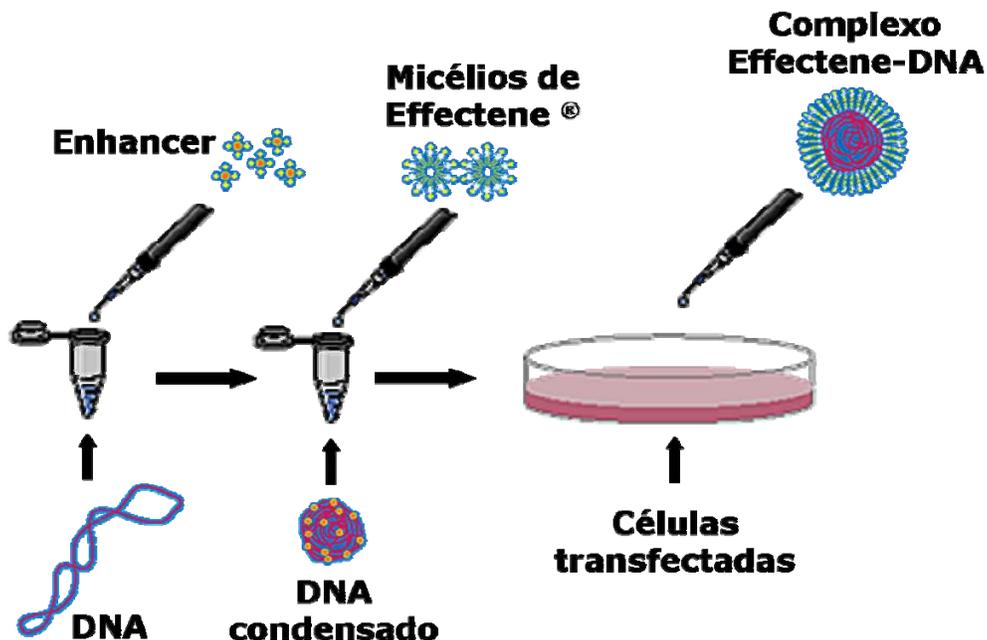


Figura 9- Esquema do procedimento e atuação do Effectene.

Tabela 1- Nove padronizações realizadas embasadas na proporção de DNA e Effectene.

DNA (ug)	Proporção de DNA para Effectene®		
	1:10	1:25	1:50
0,5	0,5ug DNA	0,5ug DNA	0,5ug DNA
	4,0uL Enhancer	4,0uL Enhancer	4,0uL Enhancer
	5,0 Effectene	12,5 Effectene	25,0 Effectene
1,0	1,0ug DNA	1,0ug DNA	1,0ug DNA
	8,0uL Enhancer	8,0uL Enhancer	8,0uL Enhancer
	10,0 Effectene	25,0 Effectene	50,0 Effectene
2,0	2,0ug DNA	2,0ug DNA	2,0ug DNA
	16uL Enhancer	16uL Enhancer	16uL Enhancer
	20,0 Effectene	50,0 Effectene	100,0 Effectene

Padronização da concentração de Neomicina

A concentração de Neomicina ou G418 foi padronizada de acordo com o protocolo do p*Silencer* neo (Ambion) para que células K562 que receberam o plasmídeo após transfecção pudessem ser selecionadas. Concentrações de G418 que variaram de 0 a 3000ug/mL foram testadas em culturas de células K562.

Cultura de Células

Células K562 foram mantidas em DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL), 100U/mL Penicilina (Gibco), e 100µg/mL Estreptomicina (Gibco) em uma atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C. Transfecções de DNA foram realizadas através da eletroporação e do Effectene (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. Depois da transfecção por eletroporação ou pelo Effectene, as células K562 foram divididas em 4 grupos, cada um avaliado em 4 experimentos independentes executados em duplicata. O grupo 1 e 2 são representados pelas células transfectadas sem o vetor p*Silencer* neo (células controle), o 3 e 4 são respectivamente representados por células transfectadas com o p*Silencer* neo controle negativo (células controle negativo) e células transfectadas com o vetor p*Silencer* neo que expressam shRNAs para AHSP (células AHSP-shRNA). Após a transfecção, 600µg/mL de Neomicina foram adicionados ao meio de cultura dos grupos 1, 3 e 4. Depois da morte total do grupo 1, avaliada por Azul de Trypan (0.4% w/v, Gibco), 30µM do substrato Hemina (Sigma) foram adicionados ao meio de cultura dos grupos 2, 3 e 4 para induzir a expressão de genes da linhagem eritróide. Durante a cultura destes grupos celulares, amostras foram coletadas em 7 pontos específicos: antes da transfecção, 0h sem Hemina, 0h com Hemina, 24h, 48h, 72h e 96h após a adição de Hemina. Entre o ponto 0h sem Hemina e o ponto 0h com Hemina há um período de 72h considerado, pois é o período de indução mais crítico da Hemina para a expressão dos genes da linhagem eritróide (Testa et al., 1982).

Real Time PCR e Análise da Expressão Gênica

O RNA total das amostras de células K562 foi extraído pelo com a utilização do reagente *TRIZol* (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Amostras de cDNA foram obtidas a partir do RNA total com o uso da *SuperScript III* (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante e quantificadas foram quantificados no *ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer* (NanoDrop).

Os genes AHSP, GATA-1, α -globin, γ -globin, BAC, GAPDH e BCR tiveram sua expressão quantificada por *Real Time PCR* (Tab. 2 e Fig. 10) A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento *ABI 5700 Sequence Detector System*® (*Applied Biosystems*) utilizando o reagente *SYBRGreen PCR Master Mix*™ (*Applied Biosystems*). Os genes BAC, GAPDH and BCR foram utilizados como controle endógeno para a normalização dos dados. A análise da expressão gênica, bem como a normalização dos dados foi realizada programa *geNorm* (Vandesompele et al., 2002).

Tabela 2- Relação de *primers* utilizados para o *Real Time PCR*.

Nome	Sequência dos <i>Primers</i> (5' → 3')
AHSP-F	GTGCGTGAGACATATACAGCCTGTTA
AHSP-R	TCCTGCGGAAATGAGATCCTTA
α -Globin-F	TGGTCCCCACAGACTCAGAGA
α -Globin-R	CGGCCTTGACGTTGGTCTT
γ -Globin-F	CCAGCTGAGTGAAGTCACTGT
γ -Globin-R	ACGGTCACCAGCACATTTCC
GATA-1-F	CTACTACAGGGACGCTGAGG
GATA-1-R	CCCCGTCTTGCCGTAGG
BAC-F	TCACCGAGCGCGGCT
BAC-R	TAATGTCACGCACGATTTCCC
GAPDH-F	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
GAPDH-R	CCACTTGATTTTGGAGGGATCT
BCR-F	CCTTCGACGTCAATAACAAGGAT
BCR-R	CCTGCGATGGCGTTCAC

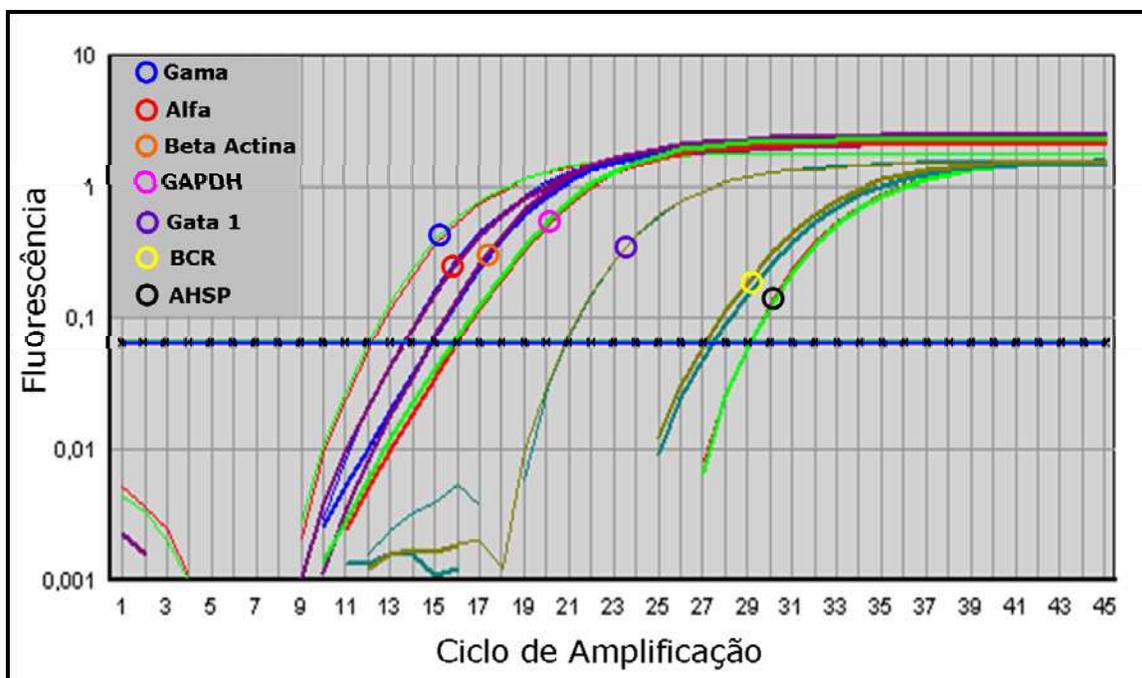


Figura 10- Representação do ciclo de amplificação em que a reação de PCR para cada gene está na sua faixa exponencial. Neste ponto, observa-se qual gene é mais expresso nas amostras analisadas. O mais expresso atinge a faixa de amplificação exponencial antes que os demais, ou melhor, em menos número de ciclos. A legenda está organizada do gene mais expresso para o menos expresso.

Citometria de Fluxo e Imunofluorescência

Os ensaios de citometria mediram, com a utilização do citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson), a expressão de DCF (2,7-diclorodihidrofluoresceína) a partir de DCFH-DA –um método indireto de quantificar espécies reativas de oxigênio (Eros ou ROS) (Hsiao et al., 2006) (Fig. 11)–, Annexina e PI (Iyamu et al., 2000) e hemoglobina fetal (Ghosh et al., 2006) em células K562 coletadas antes da transfecção, 0h sem Hemina, 0h com Hemina, 48h e 96h após a adição de Hemina.

Os ensaios de imunofluorescência foram desempenhados em células coletadas após 168h de cultura com hemina, fixadas em 4% de paraformaldeído e aderidas às lamínulas tratadas com poli-L-lisina. As lamínulas foram incubadas com solução

bloqueadora de leite 3% por 1h. Então, foram incubadas com o anticorpo primário anti- α -globina, anti-AHSP e o fluorescente anti-HbF (1:100) por 12h. Após este período, as células que receberam os anticorpos primários foram incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho IgG-FITC (1:500) e com o anticorpo fluorescente anti- β -actina-PE por 2h incluindo as células com o anti-HbF. As lamínulas foram montadas em meio VECTASHIELD-DAPI[®] que permite a visualização do núcleo em azul. As aquisições das imagens foram feitas através *Carl Zeiss Laser Scanning Systems LSM 510*, usando a objetiva C-Apochromat 63X/1.2W e o *software Zeiss LSM Image Examiner* a 25°C.

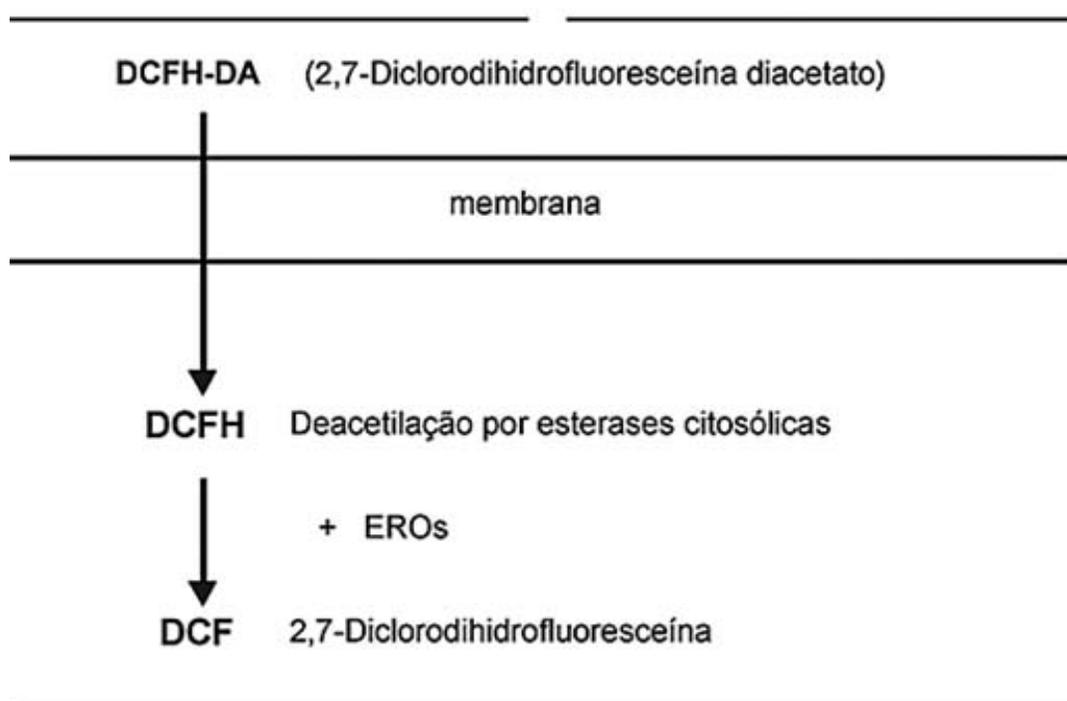
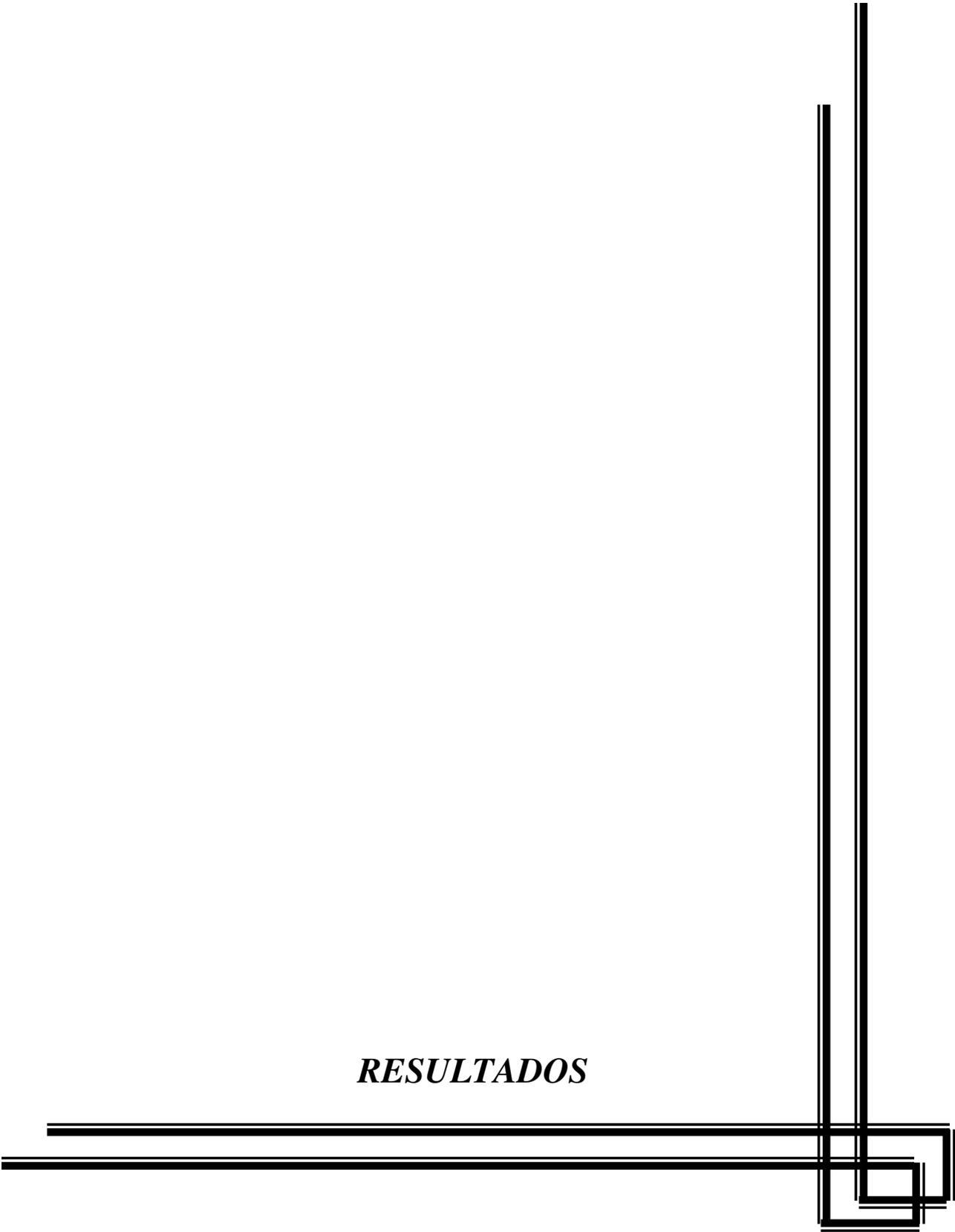


Figura 11- A molécula 2,7-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (H_2DCFDA) (reativa ao H_2O_2) são usados como marcadores oxidativos. Por ter um grupo diacetato apolar, essas sondas difundem-se facilmente através da membrana celular em diferentes tecidos. Dentro das células, o grupo diacetato é facilmente hidrolizado por esterases citosólicas, deixando livres as moléculas de DCFH. Por serem, agora, polares, essas moléculas proporcionam um excelente substrato ao peróxido de hidrogênio. Ao reagir com H_2O_2 , a molécula DCFH torna-se um composto fluorescente (DCF) que pode ser medido através citometria de fluxo.

Análise Estatística

Comparações entre os grupos controle, controle negativo e células AHSP-shRNA foram feitas usando a análise de variância (*one-way ANOVA*). Diferenças significantivas indicadas pelas ANOVAs foram submetidas à comparação para a par do teste de *Tukey's Honestly Significant Difference*.

RESULTADOS



Sequenciamento

Após a clonagem dos oligos hibridizados no vetor *pSilencer neo*. O seqüenciamento das colônias selecionadas foi realizado. Ao final dos seqüenciamentos cromatogramas (Fig. 12) foram analisados para verificar possíveis alterações na seqüência codificante da molécula shRNA para AHSP.

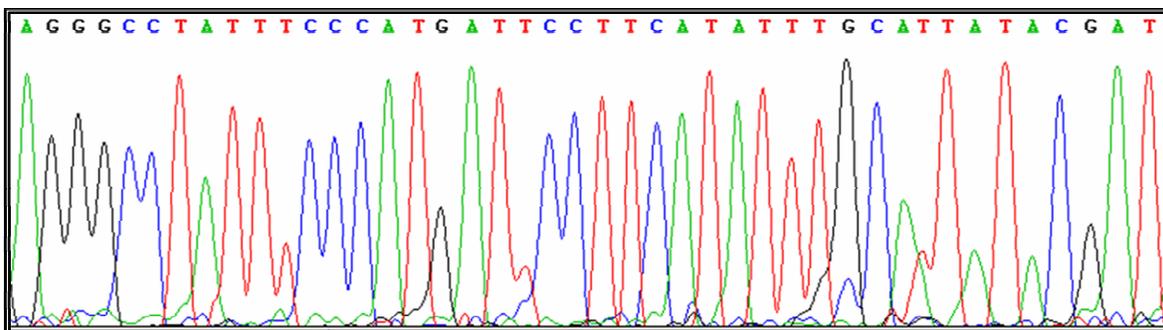


Figura 12- Exemplo de resultado do seqüenciamento (cromatograma) de colônias transformadas.

Padronização da concentração de Neomicina

A menor concentração de Neomicina ou G418, que permitiu morte celular após 9 dias de cultura e morte de todas as células K562 após 14 dias de cultura, foi a de 600ug/mL (Tab. 3). Desta forma, tal concentração foi escolhida como ótima para selecionar as células transfectadas com o vetor *pSilencer neo*.

Tabela 3- Padronização da concentração de G418. A concentração escolhida está em negrito.

[] de G418	[]X10 ⁴ céls. vivas			
	6º dia	9º dia	12º dia	14º dia
0ug/mL	450	212,5	87,5	30,7
50ug/mL	412,5	162	212,5	215,9
75ug/mL	410	387,5	475	663,4
100ug/mL	487,5	162,5	137,5	186,9
150ug/mL	612,5	375	137,5	16,6
200ug/mL	412,5	425	275	89,2
250ug/mL	737	425	325	309,6
300ug/mL	537,5	362,5	175	50,9
350ug/mL	575	412,5	300	221,1
400ug/mL	375	337,5	175	24,0
450ug/mL	475	275	262,5	349,2
500ug/mL	437,5	287,5	162,5	76,9
550ug/mL	512,5	262,5	162,5	118,0
600ug/mL	237,5	162,5	25	0,0
650ug/mL	275	162,5	25	0,0
700ug/mL	112,5	125	25	0,0
750ug/mL	187,5	87,5	0	0,0
800ug/mL	87,5	62,5	0	0,0
850ug/mL	87,5	0	0	0,0
900ug/mL	62,5	12,5	0	0,0
950ug/mL	50	0	0	0,0
1000ug/mL	12,5	0	0	0,0
2000ug/mL	0	0	0	0,0
3000ug/mL	0	0	0	0,0

Padronização dos Métodos de Transfecção

As concentrações de plasmídeo, 30 e 60ug, utilizadas na padronização da eletroporação geraram níveis de interferência para o gene AHSP no controle negativo (Fig. 13A). Este fenômeno pode ser explicado pelo fato destas quantidades de plasmídeo serem superiores ao limiar de tolerância na célula para presença de ácido nucléico exógeno, o que leva a uma resposta celular de alteração na expressão gênica como um todo, podendo incluir a expressão do gene de interesse do estudo (Siolas et al., 2005).

A eletroporação foi mais eficiente para o silenciamento gênico do AHSP, pois atingiu 85,6% de interferência na concentração ótima de 15µg de plasmídeo (Fig. 14A), porém este método gerou aproximadamente 60% de morte celular após transfecção (Fig. 14B). Entretanto o effectene alcançou 70,6% de interferência na concentração ótima de 2µg de DNA para 100µL de Effectene (Fig. 13B, 14A), porém mostrou-se um método de transfecção mais eficiente e de alta viabilidade celular, causando, aproximadamente, apenas 1% de morte celular (Fig.14B).

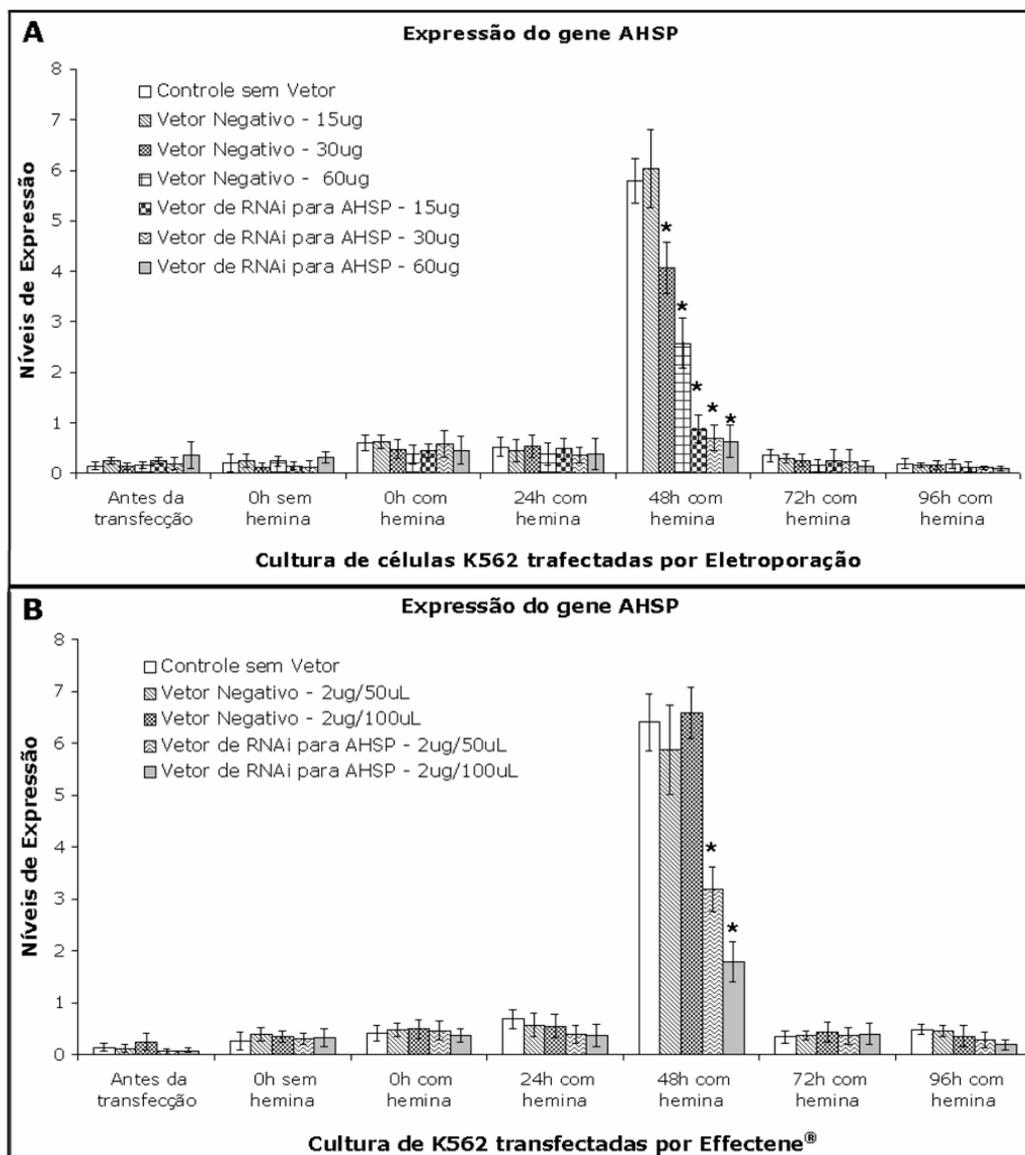


Figura 13- Perfil de expressão do gene AHSP quantificada por *Real Time* PCR. **A.** Em culturas de células K562 controle e transfectadas com concentrações diferentes (15, 30, 60ug) do plasmídeo *pSilencer* neo para AHSP e *pSilencer* neo negativo. **B.** Em culturas de células K562 controle e transfectadas com concentrações diferentes do plasmídeo *pSilencer* neo para AHSP e *pSilencer* neo negativo em relação a quantidade de Effectene (2ug de DNA/50uL de Effectene e 2ug de DNA/100uL de Effectene). .* Resultados encontrados foram estatisticamente significativos usando ANOVA ($p < 0.004$) e o teste de comparação par a par Tukey's HSD ($p < 0.05$).

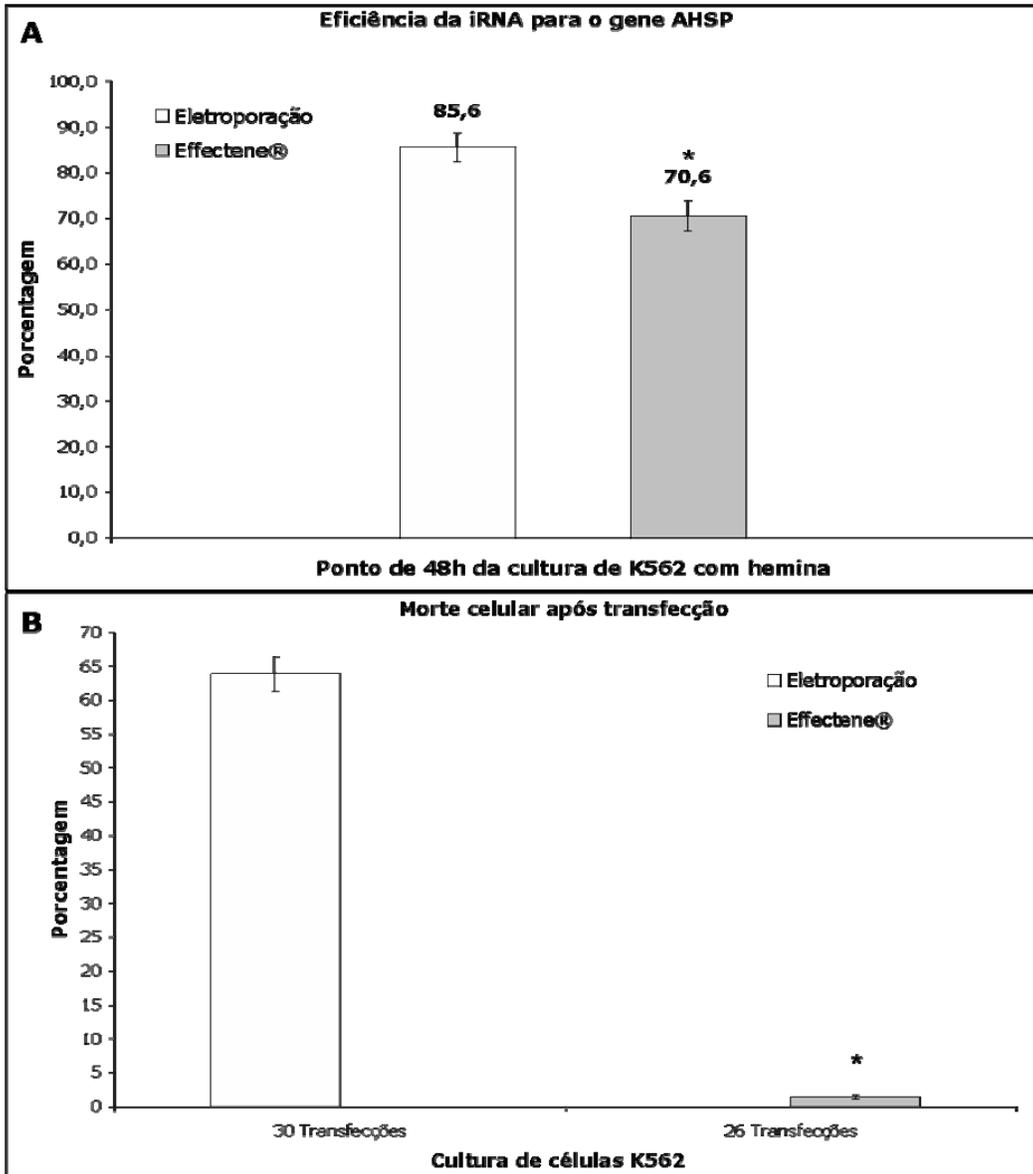


Figura 14- **A.** Diferença na eficiência do silenciamento gênico para o gene AHSP nos dois métodos de transfecção. **B.** Porcentagem de morte celular nos dois métodos de transfecção utilizados neste estudo.* Resultados encontrados foram estatisticamente significativos usando ANOVA ($p < 0.006$) e o teste de comparação par a par Tukey's HSD ($p < 0.05$).

Silenciamento do gene AHSP

Com sucesso, linhagens de células K562 eritroleucêmica com silenciamento estável para o gene AHSP foi obtida para ambos os procedimentos de transfecção. O silenciamento gênico para AHSP foi primeiramente identificado em imunofluorescência em ambos os métodos de transfecção (Fig. 15). As células silenciadas para o gene AHSP apresentaram marcação menos intensa do anticorpo para AHSP em relação ao controle negativo. Posteriormente, tal silenciamento foi confirmado por meio da quantificação da expressão do gene AHSP por *Real Time PCR* em ambos os métodos de transfecção (Fig. 16). As células silenciadas para o gene AHSP apresentaram redução significativa de expressão deste gene em relação aos controles no ponto de 48h após a adição de hemina (pico da expressão do gene AHSP).

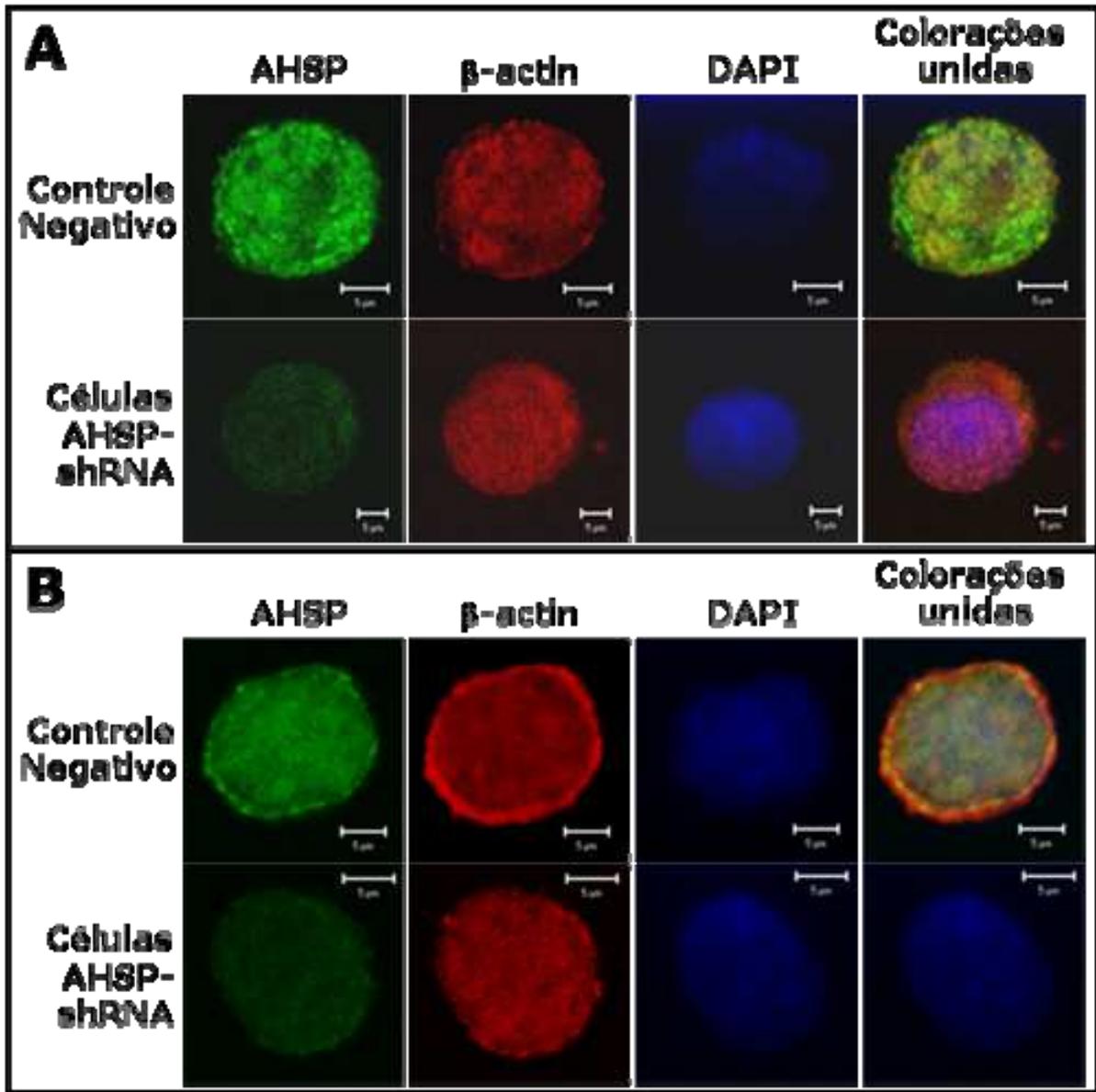


Figura 15- Imunofluorescência de células induzidas por Hemina com marcação para os antígenos da AHSP e β -actina. O núcleo celular foi corado com DAPI. As barras significam 5 μ m. **A.** Células transfectadas por eletroporação. **B.** Células transfectadas por Effectene.

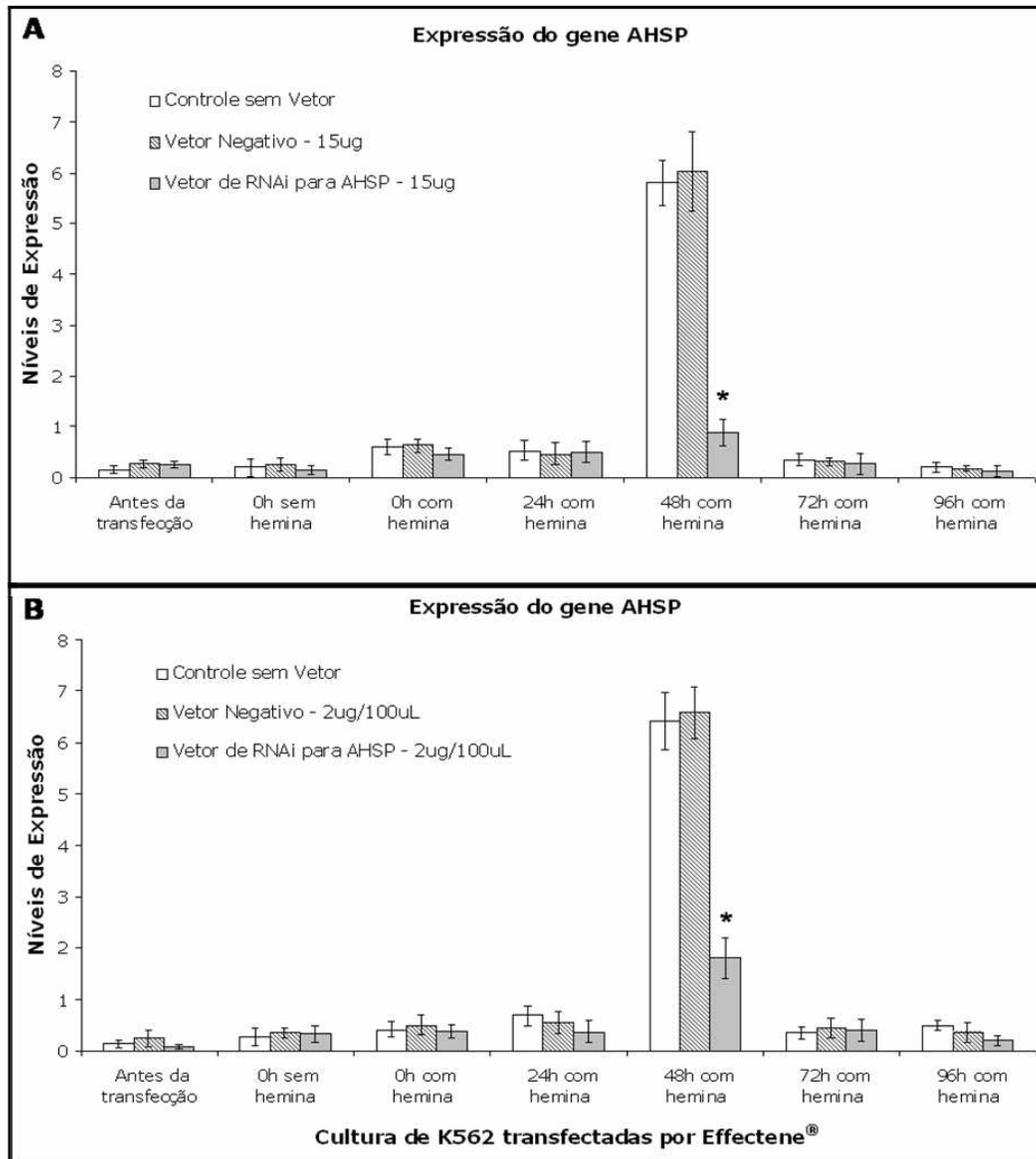


Figura 16- Perfil de expressão do gene AHSP quantificada por *Real Time* PCR. **A.** Em culturas de células K562 controle e transfectadas com 15ug do plasmídeo *pSilencer* neo para AHSP e *pSilencer* neo negativo. **B.** Em culturas de células K562 controle e transfectadas com 2ug de DNA/100uL de Effectene.* Resultados encontrados foram estatisticamente significativos usando ANOVA ($p < 0.005$) e o teste de comparação par a par Tukey's HSD ($p < 0.05$).

Perfil da Expressão dos Genes α -globina, γ -globina e GATA-1

Os perfis de expressão da α -globina, γ -globina e GATA-1 foram os mesmos para ambos os métodos de transfecção (Fig. 17-19). O pico de expressão destes genes foi coincidente em 0h com Hemina (Fig. 17-19). Entretanto, não houve diferença no perfil de expressão dos genes α -globina e γ -globina nas células silenciadas para AHSP em relação aos controles. Apenas o gene GATA-1 apresentou expressão aumentada nas células silenciadas para AHSP, imediatamente, após seu pico de expressão no ponto de 0h após a adição de hemina (Fig. 19).

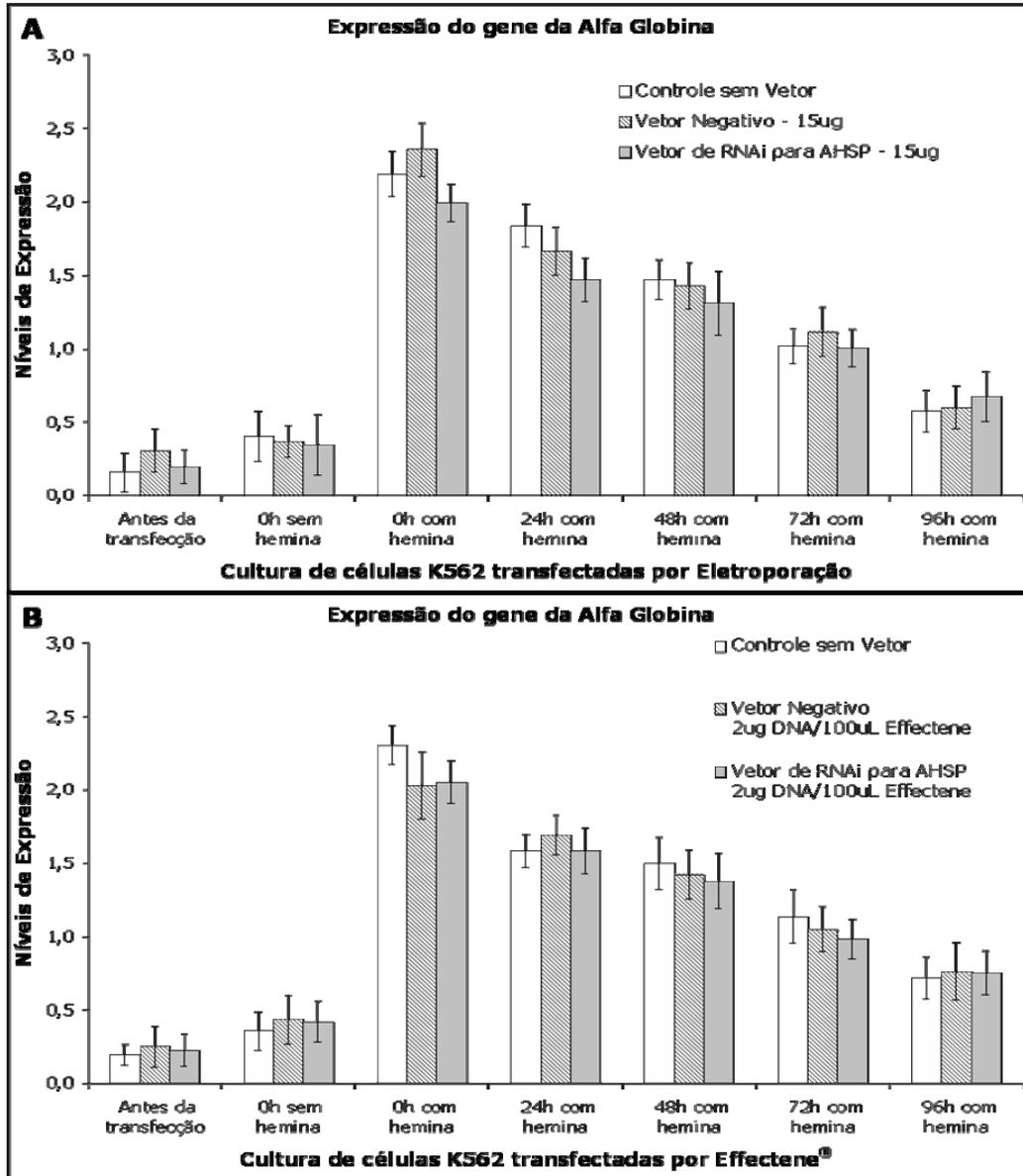


Figura 17- Perfil de expressão do gene α -globina quantificada por *Real Time* PCR. **A.** Em culturas de células K562 controle e transfectadas com 15ug do plasmídeo p*Silencer* neo para AHSP e p*Silencer* neo negativo. **B.** Em culturas de células K562 controle e transfectadas com 2ug de DNA/100uL de Effectene.* Resultados encontrados foram estatisticamente significativos usando ANOVA ($p < 0.005$) e o teste de comparação par a par Tukey's HSD ($p < 0.05$).

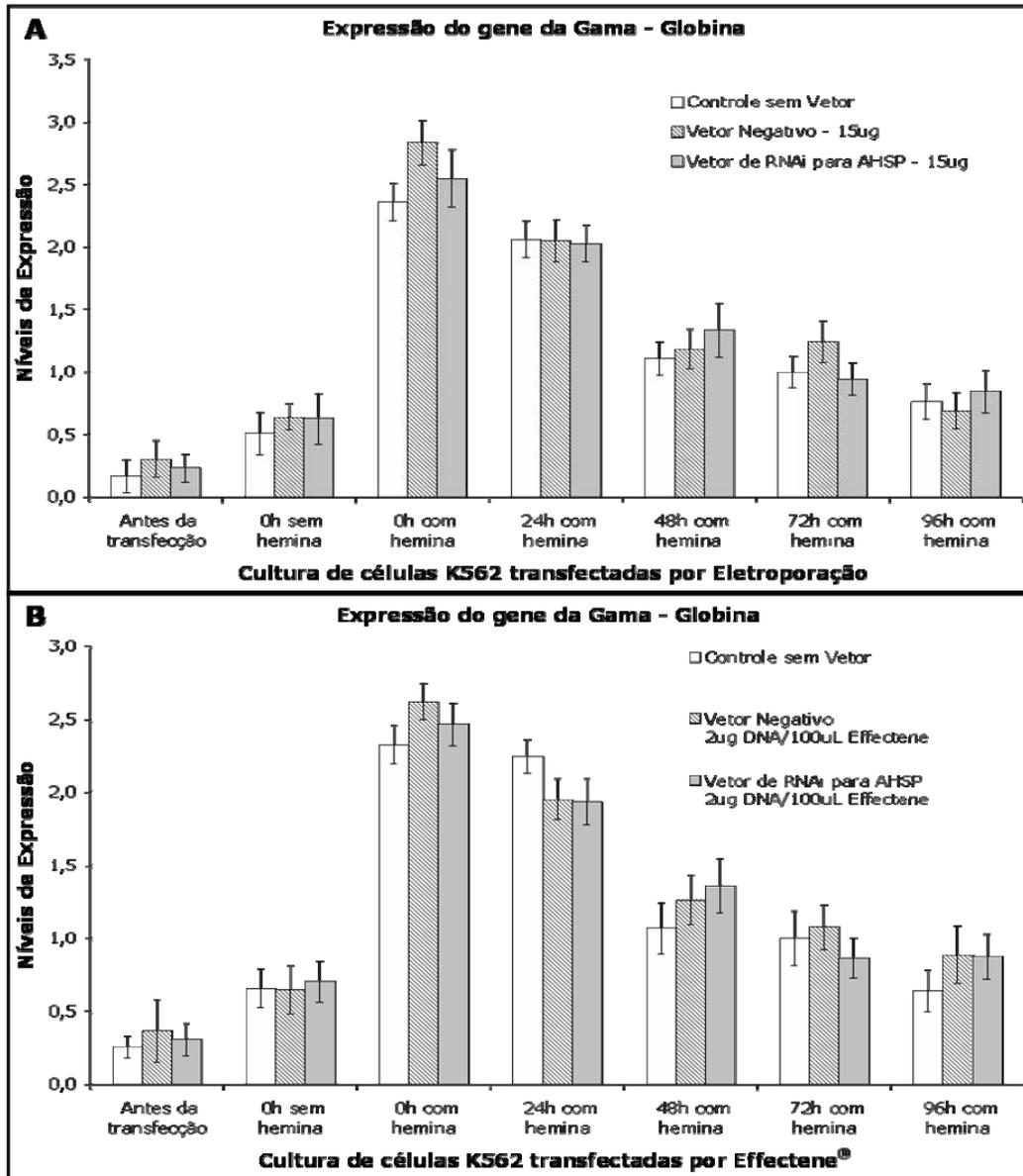


Figura 18- Perfil de expressão do gene γ -globina quantificada por *Real Time* PCR. **A.** Em culturas de células K562 controle e transfectadas com 15ug do plasmídeo *pSilencer* neo para AHSP e *pSilencer* neo negativo. **B.** Em culturas de células K562 controle e transfectadas com 2ug de DNA/100uL de Effectene.* Resultados encontrados foram estatisticamente significativos usando ANOVA ($p < 0.005$) e o teste de comparação par a par Tukey's HSD ($p < 0.05$).

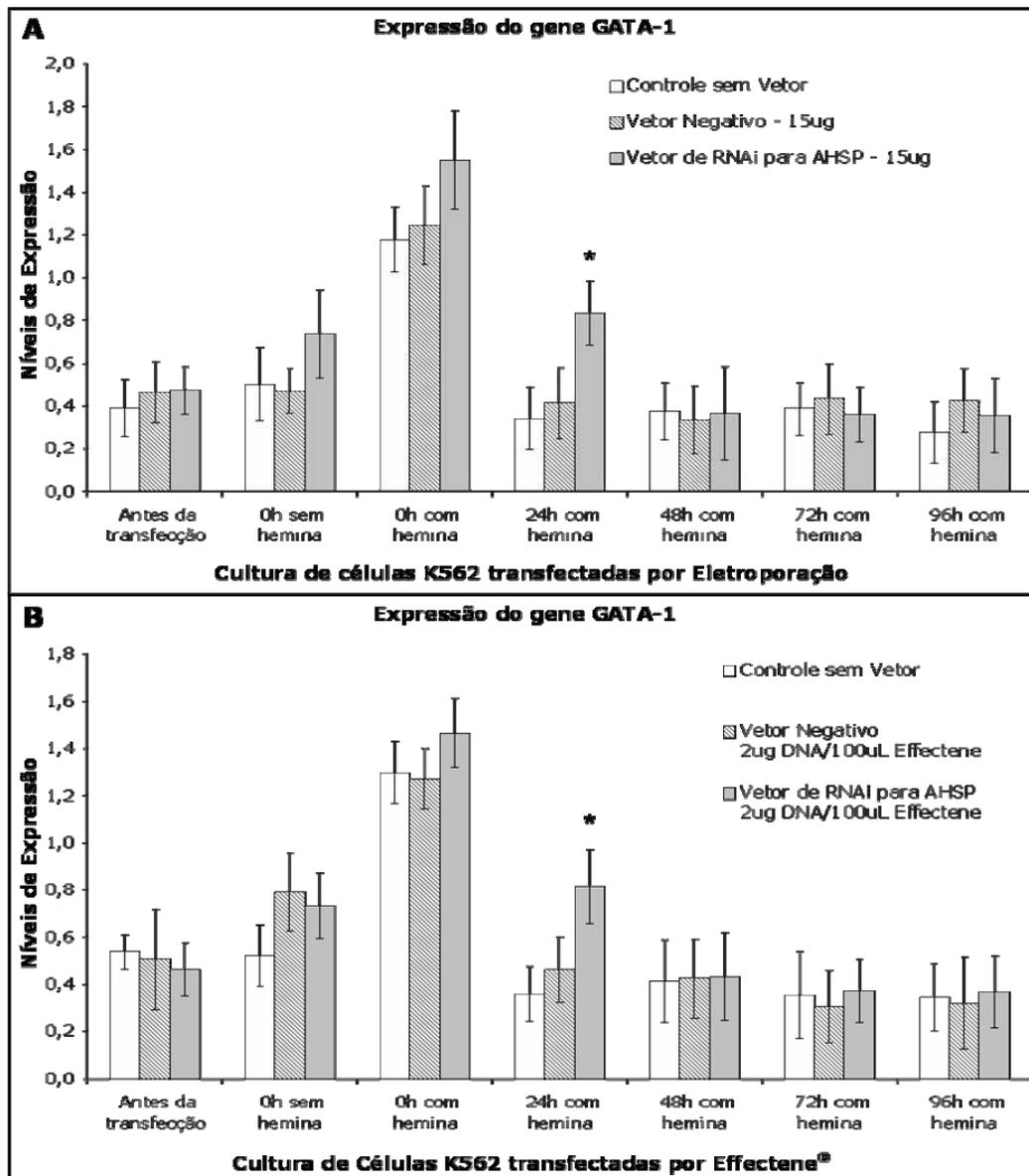


Figura 19- Perfil de expressão do gene GATA-1 quantificada por *Real Time* PCR. **A.** Em culturas de células K562 controle e transfectadas com 15ug do plasmídeo *pSilencer* neo para AHSP e *pSilencer* neo negativo. **B.** Em culturas de células K562 controle e transfectadas com 2ug de DNA/100uL de Effectene.* Resultados encontrados foram estatisticamente significativos usando ANOVA ($p < 0.005$) e o teste de comparação par a par Tukey's HSD ($p < 0.05$).

Precipitação de Cadeias Alfa da Hemoglobina

Células silenciadas para o gene AHSP apresentaram considerável precipitação de cadeias alfa da hemoglobina em ambos os processos de transfecção. Tal precipitação foi evidenciada por imunofluorescência (Fig. 20).

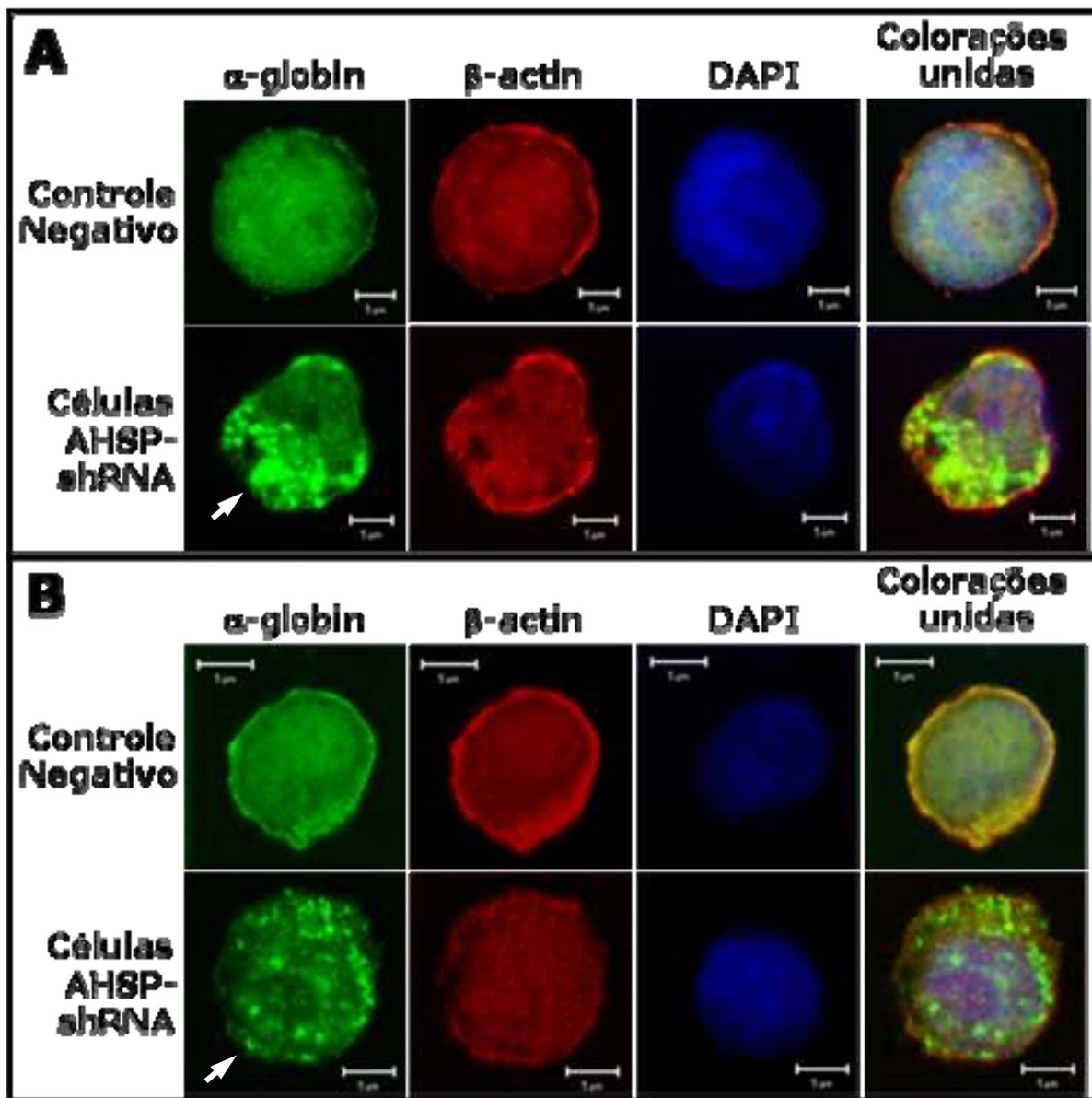


Figura 20- Imunofluorescência de células induzidas por Hemina com marcação para os antígenos da α -globina e β -actina. O núcleo celular foi corado com DAPI. As barras significam 5 μ m. **A.** Células transfectadas por eletroporação. **B.** Células transfectadas por Effectene.

Identificação de HbF

As células com o AHSP silenciado apresentaram diminuição na produção de hemoglobina fetal (HbF) em os métodos de transfecção. Esta diminuição foi, primeiramente, identificada em ensaio de imunofluorescência (Fig. 21) e, posteriormente, confirmada por meio de citometria de citometria de fluxo (Fig. 22).

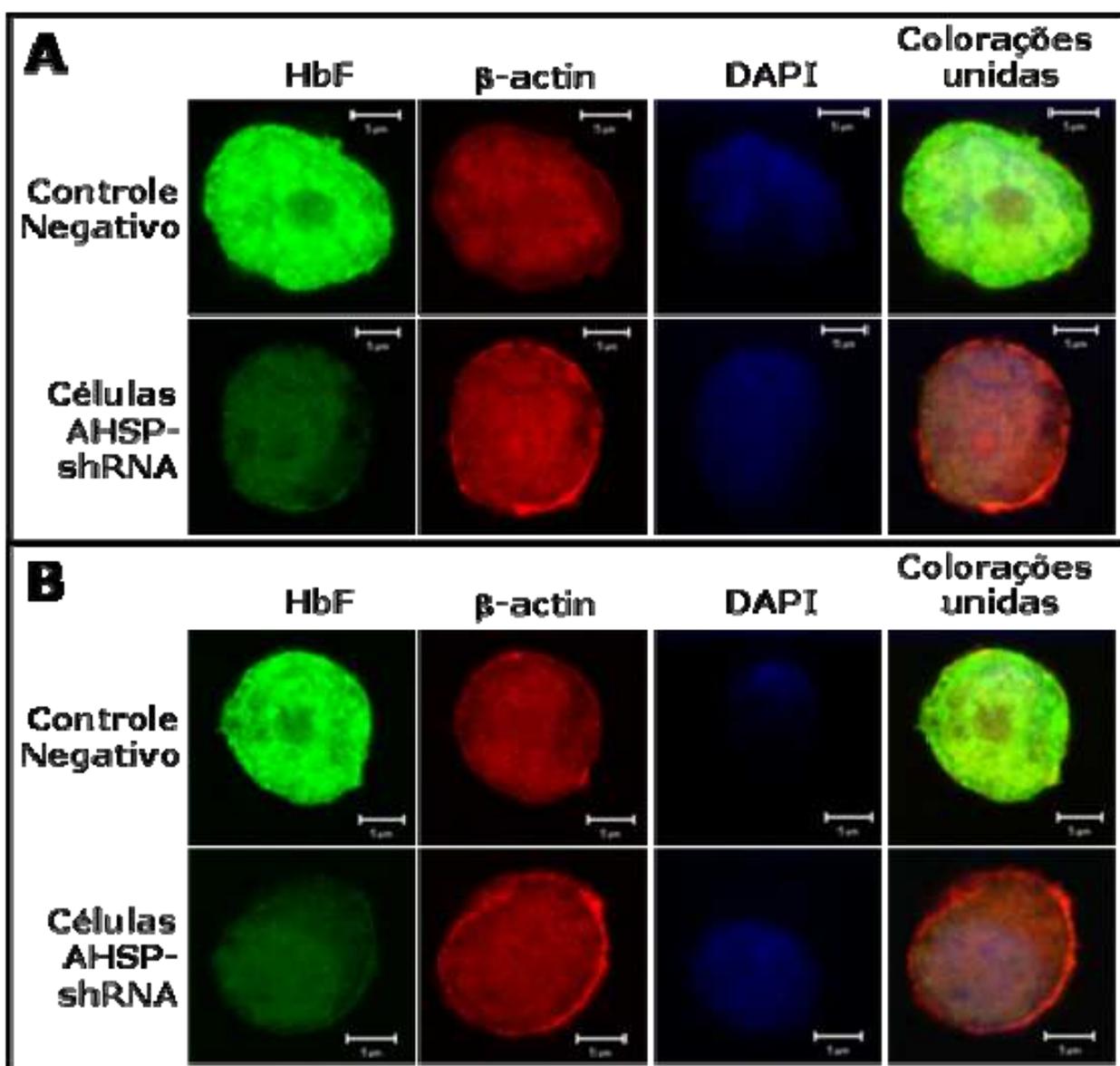


Figura 21- Imunofluorescência de células induzidas por Hemina com marcação para os antígenos da HbF e β -actina. O núcleo celular foi corado com DAPI. As barras significam 5 μ m. **A.** Células transfectadas por eletroporação. **B.** Células transfectadas por Effectene.

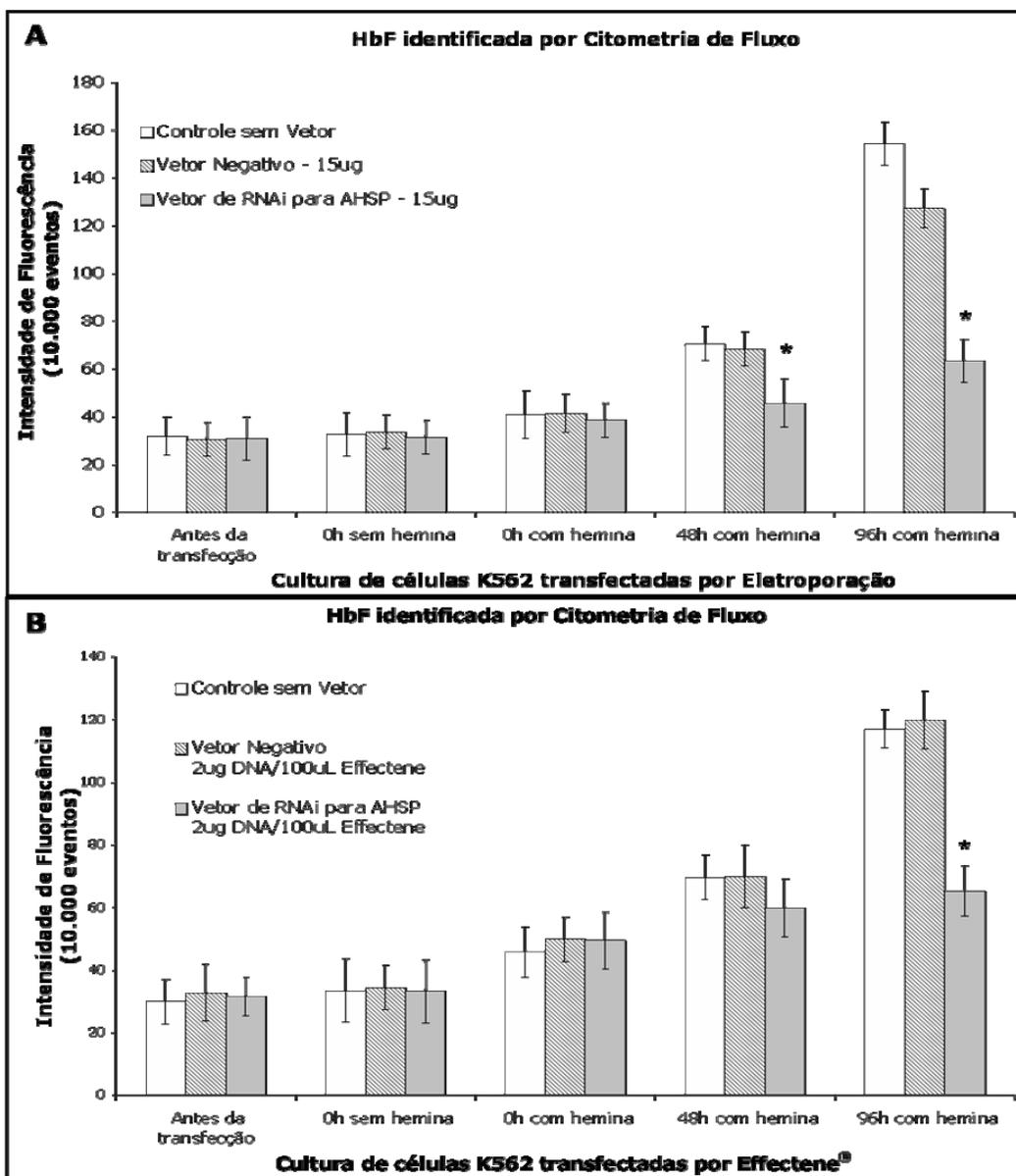


Figura 22- Identificação da hemoglobina fetal por citometria de fluxo. **A.** Em células transfectadas por eletroporação. **B.** Em células transfectadas por Effectene. * Resultados encontrados foram estatisticamente significativos usando ANOVA ($p < 0.01$) e o teste de comparação par a par Tukey's HSD ($p < 0.05$).

Identificação de ROS e Morte Celular

Células silenciadas para o gene AHSP apresentaram, em ambos os métodos de transfecção, maior expressão de espécies reativas de oxigênio (Fig. 23) e mais marcação positiva para Anexina V e PI (Fig. 24) em relação aos controles. A marcação de Anexina e PI indica morte celular. Assim, células AHSP-shRNA tiveram significativa diminuição na viabilidade celular.

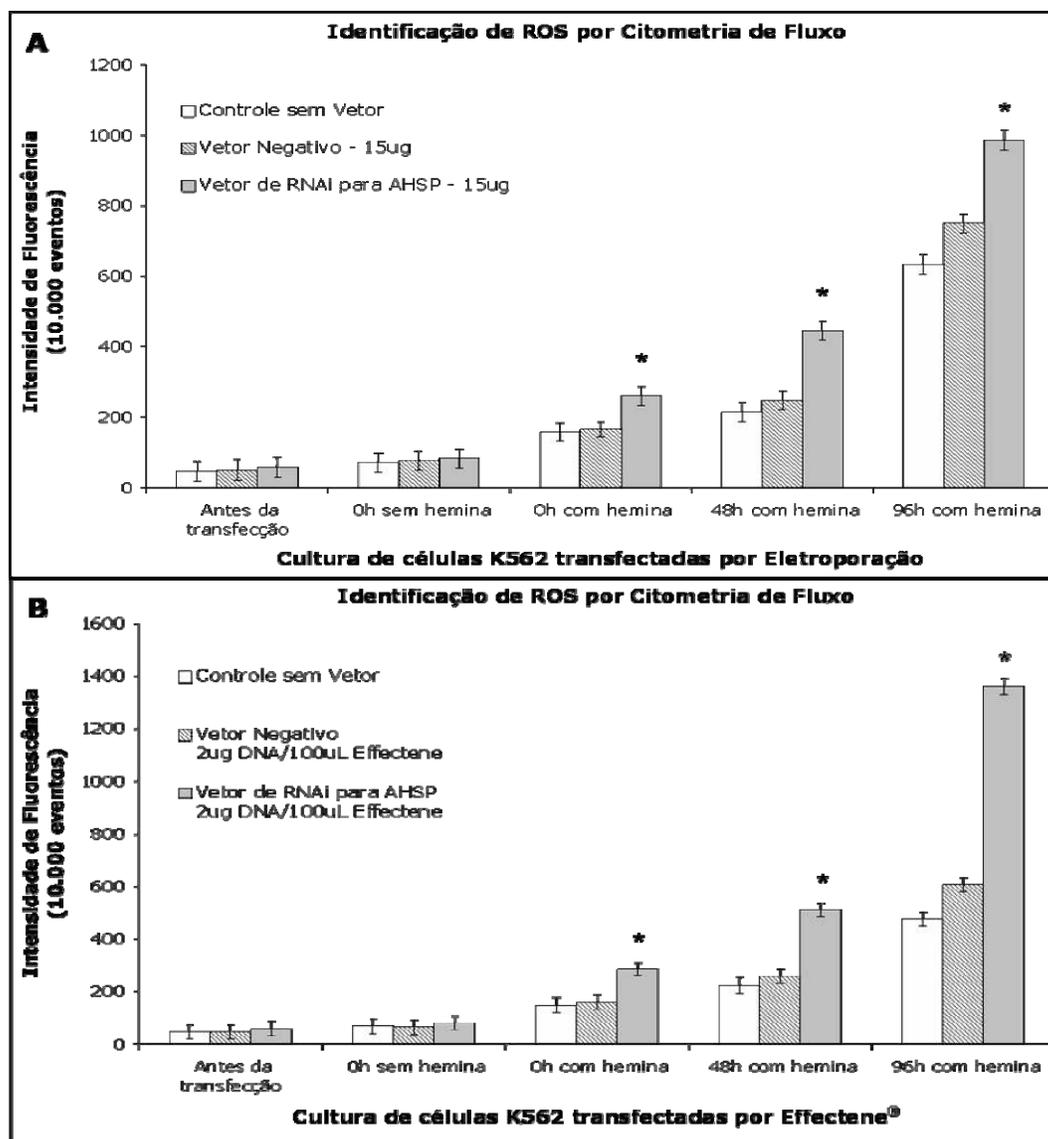


Figura 23- A, B. Identificação de ROS por citometria de fluxo nos grupos de células estudados. * Resultados encontrados foram estatisticamente significativos usando ANOVA ($p < 0.01$) e o teste de comparação par a par Tukey's HSD ($p < 0.05$).

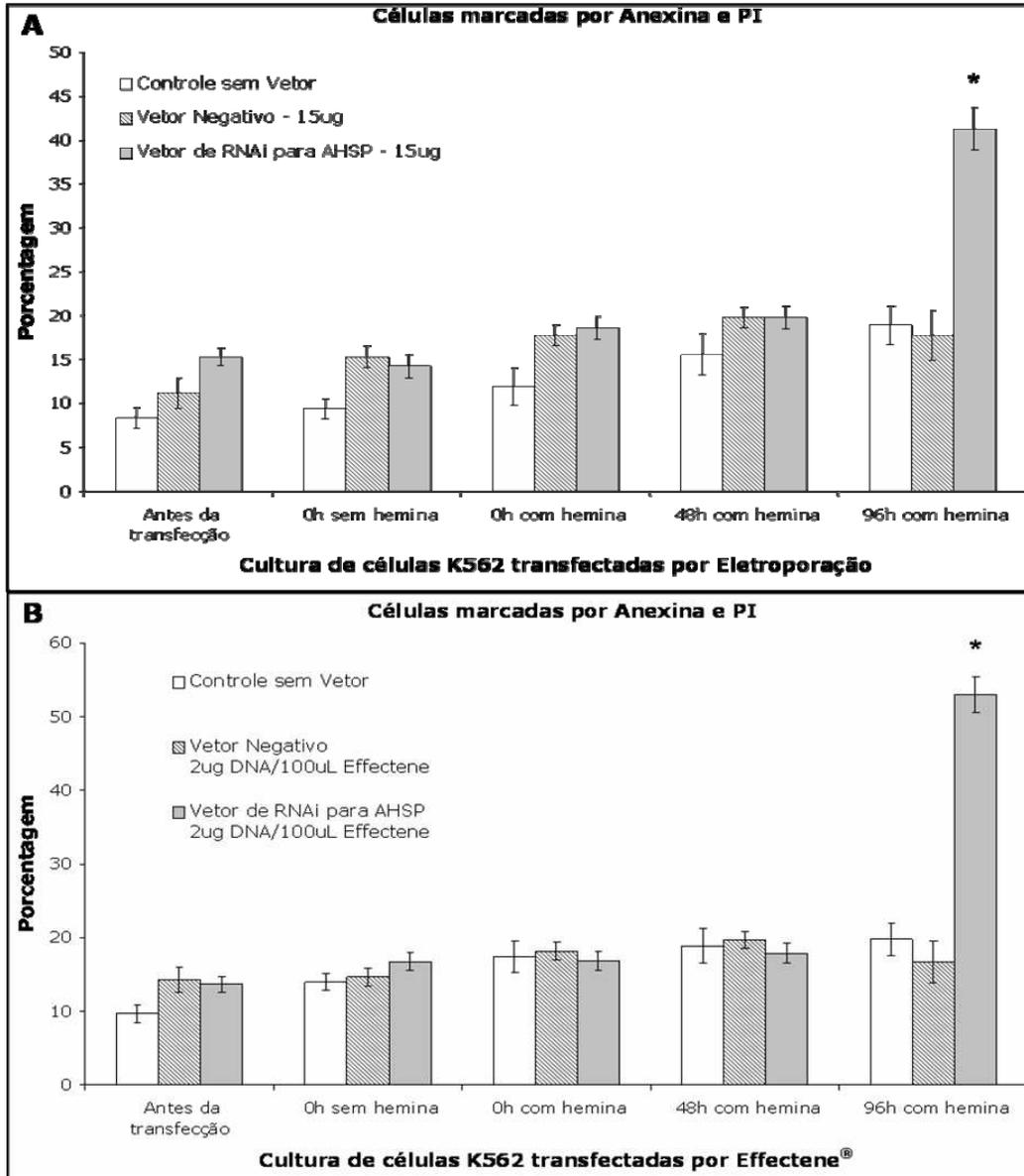


Figura 24- A, B. Porcentagem de células marcadas positivamente para Anexina e PI nos grupos de células estudados. * Resultados encontrados foram estatisticamente significativos usando ANOVA ($p < 0.01$) e o teste de comparação par a par Tukey's HSD ($p < 0.05$).

DISCUSSÃO

Estudos, em camundongos deficientes de AHSP e *in vitro*, demonstraram que a AHSP evita a precipitação das cadeias alfa da hemoglobina, bem como a atividade pró-oxidante das mesmas em solução (Kihm et al., 2002). Além disso, outro trabalho mostrou que camundongos β -talassêmicos deficientes para AHSP possuem maior precipitação de cadeias alfa da hemoglobina nos seus eritrócitos e níveis acentuados de anemia (Kong et al., 2004). Embasados nestes estudos com modelos animais, muitos trabalhos tentaram estabelecer uma relação entre a AHSP e a variabilidade clínica observada em pacientes β -talassêmicos. Entretanto, todas as relações encontradas, até o presente momento, foram sutis, não explicando o papel molecular desempenhado pelo AHSP na β -talassemia humana (Viprakasit et al., 2004; dos Santos et al., 2005; Lai et al. 2006).

Neste trabalho, pela primeira vez em células humanas, foi possível demonstrar pela redução na produção da proteína AHSP através da interferência de RNA, mediada por moléculas de sh-RNA, que a diminuição da expressão do gene AHSP provoca considerável precipitação de cadeias alfa da hemoglobina. Além disso, células silenciadas para o gene AHSP tiveram aumento na expressão de espécies reativas de oxigênio, o que pode provavelmente estar associado com a precipitação das cadeias alfa da hemoglobina e conseqüente exposição do grupo heme que as compõe (Feng et al., 2004).

O grupo heme da hemoglobina pode ser formado por átomos de Fe^{3+} ou Fe^{2+} . Ambos quando expostos em solução aquosa são capazes de diretamente ou indiretamente gerarem espécies reativas de oxigênio ou radicais livres (Fig. 3) (Haber e Weiss, 1934; Halliwell e Gutteridge, 1990). Estes produtos gerados pela exposição do grupo heme na precipitação das cadeias alfa da hemoglobina são extremamente danosos para a célula, uma vez que podem direta ou indiretamente degradar proteínas, danificar organelas e a membrana celular e causar danos irreparáveis ao DNA nuclear. Além disso, Feng et al. (2004) demonstraram que a reatividade do grupo heme da α -globina oxigenada diminui gradativamente uma vez que a AHSP se liga a α -globina oxigenada e o complexo AHSP- α -globina perde a molécula de oxigênio (Fig. 4). Diante disso, o excesso de espécies reativas de oxigênio evidenciadas nas células com redução na expressão do gene AHSP, parece justificar-se pela baixa produção de AHSP e ainda contribuir para que estas células

tivessem mais marcação positiva para marcadores de morte celular como a Anexina V e o PI. Desta forma, estes resultados, pela primeira vez, indicam que a AHSP desempenha importante papel em prevenir a apoptose de precursores eritróides em células humanas.

Os dados, que evidenciam precipitação de cadeias alfa da hemoglobina, produção de ROS e morte celular em células humanas silenciadas para o gene AHSP, confirmam o modelo de interação molecular previamente descrito em camundongo e em ensaios bioquímicos *in vitro* com AHSP recombinante (Baudin-Creuz et al., 2004). Neste modelo de interação molecular, a AHSP se comporta como uma proteína *chaperone* que se liga a cadeia alfa da hemoglobina, evitando sua precipitação e atividade pró-oxidante. Desta forma, o silenciamento do gene AHSP, induzido em nosso estudo, sugere que a AHSP em células humanas desempenha a mesma função previamente identificada em camundongo e *in vitro*.

O gene GATA-1, membro da família dos fatores de transcrição GATA, desempenha importante papel na expressão no desenvolvimento das células eritropoéticas (Harigae et al., 2006; Lowry et al., 2006). Além disso, o promotor do AHSP possui três domínios conservados de ligação do fator de transcrição GATA-1 (Keys et al., 2007; Cao et al., 2002) o que indica que a transcrição do gene AHSP é induzida por GATA-1 (Gallagher et al., 2005). Assim para verificar se o silenciamento do gene AHSP influenciou a expressão do gene GATA-1, os seus níveis de expressão foram quantificados por *Real Time PCR*. Um aumento de expressão do gene GATA-1 foi encontrado imediatamente após o pico de expressão do mesmo em células K562 induzidas por Hemina. Estes dados sugerem que a diminuição da expressão do gene AHSP pode de alguma forma induzir uma expressão tardia do gene GATA-1.

Uma vez que células K562 induzidas por Hemina, predominantemente, expressam os genes α -globina e γ -globina (Gianni et al., 1982), a expressão destes genes foi quantificada com o intuito de verificar possíveis alterações na expressão do gene α -globina e/ou γ -globina devido a redução do gene AHSP. Os perfis de expressão destes genes em células silenciadas para AHSP não apresentaram diferenças significativas em relação aos controles. Desta forma, estes dados indicam que a precipitação das cadeias

alfa da hemoglobina, evidenciada neste estudo, não está relacionada com um eventual aumento de expressão do gene α -globina e sim com o silenciamento do gene AHSP.

Um dado extremamente significativo foi que as células AHSP-shRNA mostraram grande redução na síntese da hemoglobina em relação às células controles, identificada em ensaios de imunofluorescência e confirmada por meio de citometria de fluxo. Estes dados fortemente sugerem que a ligação da AHSP com a α -globina é crucial para a formação da hemoglobina em células humanas. Esta possibilidade é corroborada por um estudo recente, em camundongos, que demonstrou que a AHSP é importante para a eritropoese e produção da hemoglobina mesmo quando a α -globina não é produzida em excesso (Yu et al., 2006)

Tomados em conjunto, nossos dados apresentam, pela primeira vez, um possível papel extremamente significativo para a AHSP na síntese normal da hemoglobina humana, bem como na sobrevivência dos progenitores eritróides ao longo da eritropoese. Além a possibilidade da AHSP ser um modulador da gravidade β -talassêmica ainda permanece por ser demonstrada, entretanto nossos dados reforçam esta possibilidade. Diante disso, alterações na seqüência gênica do AHSP que resultassem em menor produção da AHSP poderiam estar associadas a fenótipos graves de pacientes β -talassêmicos. Por outro lado, alterações no gene AHSP que resultassem em maior produção da AHSP poderiam estar relacionadas aos fenótipos intermediários e amenos da doença. Finalmente, os dados obtidos neste trabalho servem de base para futuros estudos que considerem a possibilidade do AHSP estar associado à fisiopatologia das hemoglobinopatias.

CONCLUSÕES

- O silenciamento do gene AHSP, induzido em nosso estudo, sugere que a AHSP, em células humanas, desempenha função similar à previamente descrita em camundongo e *in vitro*.

- A ligação da AHSP com a α -globina parece ser crucial para a formação da hemoglobina em células humanas.

- A redução na expressão do gene AHSP parece induzir um aumento na expressão do gene GATA-1.

- A evidente precipitação das cadeias alfa da hemoglobina observada neste estudo, não está relacionada com o aumento da expressão do gene α -globina, mas com o silenciamento do gene AHSP.

- Estes dados em conjunto reforçam que o AHSP pode ser um modulador da gravidade β -talassêmica, bem como desempenhar um importante papel na fisiopatologia das hemoglobinopatias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Baudin-Creuzat V, Vasseur-Godbillon C, Pato C, Prehu C, Wajcman H, Marden MC. Transfer of human alpha- to beta-hemoglobin via its chaperone protein: evidence for a new state. *J Biol Chem.* 2004; 279(35):36530-3.

Cao A, Moi P. Regulation of the globin genes. *Pediatr Res.* 2002; 51(4):415-21.

dos Santos CO, Costa FF. AHSP and beta-thalassemia: a possible genetic modifier. *Hematology.* 2005; 10(2):157-61.

dos Santos CO, Duarte AS, Saad ST, Costa FF. Expression of alpha-hemoglobin stabilizing protein gene during human erythropoiesis. *Exp Hematol.* 2004; 32(2):157-62.

Feng L, Gell DA, Zhou S, et al. Molecular mechanism of AHSP-mediated stabilization of alpha-hemoglobin. *Cell.* 2004;119(5):629-40.

Feng L, Zhou S, Gu L, et al. Structure of oxidized alpha-haemoglobin bound to AHSP reveals a protective mechanism for haem. *Nature.* 2005; 435(7042):697-701.

Fire A, et al. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806–811.

Gallagher PG, Liem RI, Wong E, Weiss MJ, Bodine DM. GATA-1 and Oct-1 are required for expression of the human alpha-hemoglobin-stabilizing protein gene. *J Biol Chem.* 2005; 280(47):39016-23.

Gell D, Kong Y, Eaton SA, Weiss MJ, Mackay JP. Biophysical characterization of the alpha-globin binding protein alpha-hemoglobin stabilizing protein. *J Biol Chem.* 2002; 277(43):40602-9.

Gianni AM, Presta M, Polli E, et al. Preferential induction of fetal versus embryonic globin chains in human leukemic cell lines. *Leuk Res.* 1982; 6(2):155-63.

Ghosh P, Besra SE, Tripathi G, Mitra S, Vedasiromoni JR. Cytotoxic and apoptogenic effect of tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) root extract (TRE) and two of its steroidal saponins TS1 and TS2 on human leukemic cell lines K562 and U937 and on cells of CML and ALL patients. *Leuk Res.* 2006; 30(4):459-68.

Grishok A e Mello CC. RNAi (Nematodes: *Caenorhabditiselegans*). *Adv Genet.* 2002; 46: 339-360.

Haber F, Weiss JJ. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. **Proc Royal Soc London** 1934; 147:332-51.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Methods Enzymol.* 1990;186:1-85.

Harigae H. GATA transcription factors and hematological diseases. *Tohoku J Exp Med.* 2006; 210(1):1-9.

Hoffman R., Benz EJ, Shattil AJ, Furie B, Cohen HJ. Hematology –Basic principles and practices. Churchill Livingstone Inc, p. 252-300, 1991.

Hannon GJ. RNA interference. *Nature.* 2002; 418: 244–251.

Hsiao CH, Li W, Lou TF, Baliga BS, Pace BS. Fetal hemoglobin induction by histone deacetylase inhibitors involves generation of reactive oxygen species. *Exp Hematol.* 2006; 34(3):264-73.

Iyamu WE, Adunyah SE, Fasold H, et al. Enhancement of hemoglobin and F-cell production by targeting growth inhibition and differentiation of K562 cells with ribonucleotide reductase inhibitors (didox and trimidox) in combination with streptozotocin. *Am J Hematol.* 2000; 63(4):176-83.

Keys JR, Tallack MR, Hodge DJ, Cridland SO, David R, Perkins AC. Genomic organisation and regulation of murine alpha haemoglobin stabilizing protein by erythroid Kruppel-like factor. *Br J Haematol.* 2007; 136(1):150-7.

Kihm AJ, Kong Y, Hong W, et al. An abundant erythroid protein that stabilizes free alpha-haemoglobin. *Nature.* 2002; 417(6890):758-63.

Kong Y, Zhou S, Kihm AJ, et al. Loss of alpha-hemoglobin-stabilizing protein impairs erythropoiesis and exacerbates beta-thalassemia. *J Clin Invest.* 2004; 114(10):1457-66.

Lai MI, Jiang J, Silver N, et al. Alpha-haemoglobin stabilizing protein is a quantitative trait gene that modifies the phenotype of beta-thalassaemia. *Br J Haematol.* 2006; 133(6): 675-82.

Leung RKM e Whittaker PA. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. 2005; 107: 222-239.

Lowry JA, Mackay JP. GATA-1: one protein, many partners. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38(1):6-11.

Miele G, Manson J, Clinton M. A novel erythroid-specific marker of transmissible spongiform encephalopathies. *Nat Med.* 2001; 7(3):361-4.

Mittal V. Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nat Rev Genet.* 2004; 5(5): 355-365.

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=56786141>, 2007.

Omi K, Tokunaga K, Hohjoh H.. Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. *FEBS Lett.* 2004; 558(1-3): 89–95.

Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Reviews.* 2007; 8: 23-36.

Rund D e Rachmilewitz E. Beta-thalassemia. *N Engl J Med.* 2005; 353(11):1135-46.

Scott MD. H₂O₂ injury in beta thalassemic erythrocytes: protective role of catalase and the prooxidant effects of GSH. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40(7):1264-72.

Siolas D, Lerner C, Burchard J, Ge W, Linsley PS, Paddison PJ, et al. Synthetic ShRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol.* 2005; 23(2): 227-231.

Stamatoyannopoulos G e Grosveld F. An excellent up-to-date review on what is known about the mechanisms of the differential expression of the globin genes during development. *The Molecular Basis of Blood Disease.* 2001; 135–182

Testa U, Vainchenker W, Beuzard y, et al. Hemoglobin Expression in clones of K562 cell line. *Eur. . Biochem.* 1982; 121:649-655.

Tuschl T. Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol.* 2002; 20(5): 446-448.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3(7):RESEARCH0034.

Viprakasit V, Tanphaichitr VS, Chinchang W, Sangkla P, Weiss MJ, Higgs DR. Evaluation of alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) as a genetic modifier in patients with beta thalassemia. *Blood*. 2004; 103(9):3296-9.

Weatherall DJ e Clegg JB. The thalassaemia syndromes. *Science*. 2001; 287-326

Weatherall DJ. Phenotype–genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nature Reviews*. 2001; 2: 245-55

Weatherall DJ. Thalassaemia: the long road from bedside to genome. *Nat Rev Genet*. 2004; 5(8): 625-31.

Zhou S, Olson JS, Fabian M, Weiss MJ, Gow AJ. Biochemical fates of alpha hemoglobin bound to alpha hemoglobin-stabilizing protein AHSP. *J Biol Chem*. 2006; 281(43): 32611-8.