

BÁRBARA DA COSTA REIS MONTE-MÓR

**EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL E ESTUDO DO GENE
JUNB EM POLICITEMIA VERA**

CAMPINAS

Unicamp

2007

BÁRBARA DA COSTA REIS MONTE-MÓR

**EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL E ESTUDO DO GENE
JUNB EM POLICITEMIA VERA**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, área de concentração em Medicina Experimental.

ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO FERREIRA COSTA

CAMPINAS

Unicamp

2007

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

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

M764e Monte-Mór, Bárbara da Costa Reis
Expressão gênica global e estudo do gene *JUNB* em policitemia
vera. / Bárbara da Costa Reis Monte-Mór. Campinas, SP : [s.n.],
2007.

Orientador : Fernando Ferreira Costa
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Hematopoese. 2. Policitemia. 3. Fator de transcrição. I.
Costa, Fernando Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Global gene expression and study of the *JUNB* gene in
polycythemia vera**

Keywords: . Hematopoiesis
. Polycythemia
. Transcription factor

Área de Concentração: Medicina experimental

Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora:

Prof^o. Dr^o. Fernando Ferreira Costa

Prof^o. Dr^o. Cármino Antonio de Souza

Prof^o. Dr^o. Kleber Gomes Franchini

Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille

Prof^o. Dr^o. Dimas Tadeu Covas

Data da defesa: 14 - 12 - 2007

Banca examinadora da tese de Doutorado

Aluno(a): Bárbara da Costa Reis Monte-Mór

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

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Fernando Ferreira Costa

Professor (a) Doutor (a) Cármino Antonio de Souza

Professor (a) Doutor (a) Kleber Gomes Franchini

Professor (a) Doutor (a) Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille

Professor (a) Doutor (a) Dimas Tadeu Covas

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

Data: 14/12/2007

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos e insubstituíveis:

Mamãe (Rivelina)

Papai (Sansa)

Meu irmão (Nando)

E André

Dedico também, *in memorium*, ao vovô Jader,
porque acho que ele gostaria de ter visto este trabalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos aqueles que participaram deste trabalho:

Ao Dr. Fernando, pelo apoio e pelas soluções para tudo

Ao Dr. William, pela oportunidade e pelo entusiasmo

Ao Anderson, pelos dias, noites e fins de semana de SAGE – “ninguém merece!”

À Isabelle, por incontáveis *Western Blots*, culturas, shRNA, vírus, etc – “que ça marche!!!”

À She e à Camila, minhas amigas, e também companheiras de bancada, que não dividem ponteira comigo, mas eu divido com elas, ou vice-versa, sei lá

A todas as meninas do hemocentro: Dul, Ângela, Ucha, Dil, Boquinha, Lena, Simone, Carol, Renata, Regiane, Ana Flávia, Eli, Fernanda, Lediane, Cíntia, Andréia, Carla, Nic, Patrícia e Raquel, as que já partiram: Camila Oresco, Flávias, Lu Hollanda, Luciana e Carol Yaeko, e também aos poucos meninos, presentes e passados: Marcos André, Tiagos e Gustavo Bioinfo, pelo ambiente de trabalho, experimentos, reuniões, cafés e happy-hours

Ao digníssimo quinto dos infernos: Mano, Gu, Hélvia e Ana, por todas as risadas

À Helô, rainha dos falcons, provetas, béquers e peixinhos, por sua ajuda de sempre

À Dri, pelas culturas

À Fernanda, pelas citometrias

À Dra. Irene e à Katinha, pelo apoio constante com os pacientes

Ao Lopes, pela teoria por trás do *real time*

À Dra. Íscia, pela colaboração no curso de fisiopatologia

À Elisete, por todas as assinaturas, impressões e quebra-galhos

A todo o pessoal do ambulatório, agendamento, serviço social, coleta, doação, fracionamento, quimioterapia, hematologia, marcadores celulares, citogenética, onco-hemato, apoio didático, lavagem, limpeza, almoxarifado, copiadora, copa e portaria do Hemocentro da UNICAMP, por suas inúmeras formas de contribuição

A todo o pessoal da U790 INSERM, no IGR em Paris: Sabrina Dupon, Aline, François, Yunhua, Dominique, Christine, Hakim, Dorothea, Marcela, Hanna, Laure, Aurore, Najet, Fawzia, Isabelle G., Jean Luc, Stephan G., Catherine, Anaeli, Hassan, Didier, Sabrina Badaoui, Hélène, Abire, Orianne, Charleen, Anna Lila, Ronan, Roman, Sandrine, Mayuka, Larissa, Jean Pierre, Fanny, Fred, Yann, Véronique, Caro, Sonia, Monia, Fatima, Yanyan, Peggy, etc, etc, etc, por me receberem muito bem e me ensinarem muito

A todos os pacientes e controles, brasileiros e franceses, que contribuíram para o estudo

Agradeço ainda, pela participação indispensável:

Aos meus amigos, por tornarem possível a vida longe da família:

Titinha querida, e também dona Maria Alice e seu Roberto, os amigos de Santos e de São Paulo

Taci e Isabel, minhas amigas e companheiras do dia-a-dia em Campinas, que saudades do condomínio Sta. Genebra!

Flavinha, minha amiga desde o primeiro dia de faculdade

Ju, Su e Cau, minhas amigas Bio 99D

Fá, doninha de casa, e Ana Cláudia, Carol, Mano, meninas do pensionato

Divas e todo o pessoal de Recife

Aos amigos da Maison du Brésil, na cidade universitária de Paris: Biagio, David, Emílio, Ju, Amilcar, Karina, Daniela, Rita, Sidão, Fabinho, Loraine, Patrícia, os agregados preferidos: Sophie e Etienne...

E, é claro, a minha família, de quem sempre tenho saudades: vovó Yara, vovó Solange e vovô Beбето, tia Cris, tia Vri e tio Arturo, Bruno, tia Lili e Ricardo, Mands, Lara e Igor, tia Lida e David, Rê e Dudu, Dinda e tio Ademar, Bia e Laura, meu Dindo Gico.

A mais família, que é enorme: a meus tios, tias e primos todos da fazenda, incluindo: Lulu, Fabinho e Lolô, Bê e Marri, Má, Su, Ni e Renê, Ju e Gi, Mari, Gui e Toti, Chiquinho e Duca, Con, Ge e Vi, Ribão, Diogo, Dani & Cris, Juliana, Pedro, Lali, Gilsinho, Joana, Luluxa...

A minha quase família: tia Úrsula, tio Augusto e companhia limitada, Janice e mais todos os tios e tias e amigos do Norwan

E, por último, mas não menos importante, agradeço à FAPESP e à CAPES, por financiarem este estudo e me abrirem muitas portas.

*“O que não tem explicação, explicado está, ...,
mas um dos sábios corrigiu, O que não tem explicação
terá de esperar mais um bocadinho...”*

José Saramago – Jangada de Pedra

	PÁG
RESUMO	<i>xxxiii</i>
ABSTRACT	<i>xxxvii</i>
1- INTRODUÇÃO	41
1.1- Síndromes mieloproliferativas	43
1.2- Policitemia vera	43
1.3- A descoberta de <i>JAK2 V617F</i>	49
1.4- <i>JAK2 V617F</i> e o fenótipo mieloproliferativo	51
1.5- Justificativa	58
2- OBJETIVOS	59
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS	63
3.1- Casuística	65
3.2- Amostras biológicas	66
3.3- Tipos celulares e cultura primária de células humanas	67
3.4- Linhagens celulares	72
3.5- Cinéticas, inibições, interferência e ensaios de crescimento	73
3.6- Extração de ácidos nucléicos	80
3.7- Análises em DNA (detecção da mutação <i>JAK2 V617F</i>)	82
3.8- Análises em RNA (quantificação de expressão gênica)	85
3.9- Análises em proteínas (<i>Western Blot</i>)	104
4- RESULTADOS	107
4.1- Perfis globais de expressão gênica	109

4.2- Validação dos resultados de SAGE por qRT-PCR.....	119
4.3- Expressão gênica diferencial: PV X controle.....	125
4.4- O gene <i>JUNB</i> em PV.....	126
5- DISCUSSÃO.....	143
6- CONCLUSÕES.....	155
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	159
8- ANEXOS.....	177
Anexo 1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	179
Anexo 2- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	181
Anexo 3- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	183
Anexo 4- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	185
Anexo 5- Tabela 10.....	187
9- APÊNDICES.....	193
Apêndice 1.....	195
Apêndice 2.....	199
Apêndice 3.....	221

LISTA DE ABREVIATURAS

APS	Persulfato de amônia
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
cDNA	DNA complementar
CEE	Colônias eritróides endógenas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFU-Es	Unidades formadoras de colônia eritróide
CIAP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
CONEP	Comitê Nacional de Ética em Pesquisa
Ct	Ciclo de <i>threshold</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Desoxiribonucleic acid</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
E	Eficiência de amplificação
EDTA	Ácido tetracético etilenediamina
EPO	Eritropoetina
ERK (MAPK)	Quinase regulada por sinal extracelular (proteína quinase ativada por mitógeno)
ESTs	<i>Expressed sequence tags</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	<i>Fluorescein</i>
G	L-glutamina
G-CSF	<i>granulocyte-specific colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
IGF-1	<i>Insulin like growth factor 1</i>
IGR:	<i>Institut Gustav Roussy</i>
IL-3	Interleucina 3
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco Medium</i>

JAK	<i>Janus</i> quinase
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
LMMC	Leucemia mielomonocítica crônica
LMMJ	Leucemia monomielocítica juvenil
LNC	Leucemia neutrofílica crônica
MF	Mielofibrose idiopática
mRNA	RNA mensageiro
MS	mastocitose sistêmica
MSSe	Meio sem soro eritróide
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORFs	<i>Open reading frames</i>
P-AKT	<i>Phospho-AKT</i>
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i>
PBST	0,2% Tween 20 em 1X PBS
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	<i>Phycoerythrin</i>
P-ERK	<i>Phospho-ERK</i>
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PS	Penicilina/estreptomicina
P-STAT5	<i>Phospho-STAT5</i>
PV	Policitemia vera
Q	Quantidade de expressão
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
REPO	Receptor de eritropoetina
RG-CSF	Receptor de <i>granulocyte-specific colony-stimulating factor</i>
RIGF-1	Receptor de <i>Insulin like growth factor 1</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RTPO ou Mpl	Receptor de trombopoetina

SAGE MN	Biblioteca SAGE de medula óssea normal
SAGE PV	Biblioteca SAGE de policitemia vera
SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SFB	Soro fetal bovino
SHE/LEC	Síndrome hipereosinofílica/leucemia eosinofílica crônica
shRNA	<i>Short hairpins RNAs</i>
SMD	síndrome mielodisplásica
SMP	Síndrome mieloproliferativa
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOC	<i>Super Optimal Catabolite repression</i>
SOCS	Proteínas supressoras de sinalização de citocinas
src-PTK	Proteína tirosino-quinase da família src
STAT	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Trombocitemia essencial
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
TPO	Trombopoetina
U790 INSERM	Unidade 790 do <i>Institut national de la santé et de la recherche médicale</i>

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Critérios da Organização Mundial de Saúde para diagnóstico de policitemia vera.....	45
Tabela 2- Condições para reações em cadeia da polimerase quantitativas em tempo real.....	102
Tabela 3- Anticorpos utilizados para <i>Western Blot</i>	106
Tabela 4- Distribuição de frequência das <i>tags</i> detectadas na biblioteca de policitemia vera.....	115
Tabela 5- 50 <i>tags</i> mais detectadas na biblioteca de policitemia vera.....	116
Tabela 6- Distribuição de frequência das <i>tags</i> detectadas na biblioteca de medula óssea normal.....	117
Tabela 7- 50 <i>tags</i> mais detectadas na biblioteca de medula óssea normal.....	118
Tabela 8- Tabela 8: Padronização das reações em cadeia da polimerase quantitativas em tempo real.....	120
Tabela 9- Identificação das <i>tags</i> diferencialmente expressas entre células da medula óssea de um paciente portador de policitemia vera e controle normal.....	125
Tabela 10- Processos biológicos atribuídos aos genes com expressão elevada em policitemia vera.....	187

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Vias de sinalização hematopoéticas.....	48
Figura 2- Síntese de DNA complementar (cDNA).....	86
Figura 3- Digestão com <i>Nla</i> III.....	87
Figura 4- Ligação aos adaptadores.....	88
Figura 5- Formação de <i>tags</i> - digestão com <i>BsmF</i> I.....	90
Figura 6- Formação de <i>ditags</i>	91
Figura 7- Amplificação e isolamento de <i>ditags</i>	92
Figura 8- Clivagem dos adaptadores.....	93
Figura 9- Formação de concatêmeros.....	94
Figura 10- Verificação de clonagem.....	96
Figura 11- Extração de RNA.....	110
Figura 12- Amplificação de <i>JAK2</i> em células HEL e K562.....	111
Figura 13- Digestão de <i>JAK2</i> com <i>Bsa</i> XI em células HEL e K562.....	111
Figura 14- Amplificação de <i>JAK2</i> em paciente com policitemia vera e controles.....	112
Figura 15- Digestão de <i>JAK2</i> com <i>Bsa</i> XI em paciente com policitemia vera e controles.....	113
Figura 16- Seqüenciamento de <i>JAK2</i> em paciente com policitemia vera e controle.....	114
Figura 17- Síntese de DNA complementar (cDNA).....	119
Figura 18- Amplificação do gene <i>C3orf10</i>	120
Figura 19- Temperatura de dissociação do produto amplificado de <i>BTG2</i>	121

Figura 20-	Curva padrão para a reação de amplificação do gene <i>ZFP36</i>	122
Figura 21-	Gráficos de expressão dos genes <i>HBA</i> , <i>HBB</i> , <i>C3orf10</i> , <i>PRDX6</i> , <i>GPR137B</i> , <i>JUNB</i> , <i>ZFP36</i> , <i>BTG2</i> , <i>EGR1</i> , <i>C1QB</i> e <i>AHSP</i> obtidos por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	123
Figura 22-	Comparação de resultados obtidos por <i>Serial Analysis of Gene Expression</i> (SAGE) e por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	124
Figura 23-	Expressão de <i>JUNB</i> em células hematopoéticas.....	128
Figura 24-	Células da linhagem granulocítica.....	129
Figura 25-	Células mononucleares.....	129
Figura 26-	Expressão de <i>JUNB</i> em células CD34+.....	130
Figura 27-	Expressão de <i>JUNB</i> em células Ba/F3-REPO em estado basal de cultura e de privação.....	131
Figura 28-	Expressão de <i>JUNB</i> em células Ba/F3-REPO em resposta à eritropoetina (EPO).....	133
Figura 29-	Diferenciação eritróide – morfologia celular.....	133
Figura 30-	Diferenciação eritróide – marcadores de superfície celular.....	135
Figura 31-	Expressão de JunB em eritroblastos, em estado basal de cultura, de privação e em resposta à eritropoetina (EPO).....	136
Figura 32-	Expressão de JunB em células Ba/F3-REPO transformadas com <i>JAK2 V617F</i> em resposta a inibidores de vias de sinalização.....	138
Figura 33-	Efeito da inibição da expressão de JunB sobre a proliferação e potencial clonogênico de progenitores eritróides humanos e formação de colônias eritróides endógenas (CEE).....	141
Figura 34-	Colônias eritróides.....	142

RESUMO

Policitemia vera (PV) é uma síndrome mieloproliferativa (SMP) crônica que ocorre por proliferação clonal de progenitores hematopoéticos multipotenciais. Pacientes com PV apresentam expansão das três principais linhagens mielóides na medula óssea, levando à produção aumentada de hemácias, granulócitos e plaquetas. Características importantes de PV incluem elevação de hematócrito em presença de níveis normais ou diminuídos de eritropoetina (EPO) e a formação de colônias eritróides endógenas (CEE). A mutação *JAK2* V617F, presente na maioria dos pacientes com PV, causa ativação constitutiva de *JAK2* e parece ser responsável pelo fenótipo observado. Apesar disso, as mudanças transcricionais desencadeadas pela mutação ainda não foram completamente caracterizadas. Neste trabalho, utilizou-se *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE) para realizar um estudo de expressão gênica global em células da medula óssea de um paciente com PV portador da mutação, ao diagnóstico e em células normais de doadores saudáveis. Genes com expressão aumentada em PV estão envolvidos em processos biológicos importantes, como transdução de sinal, diferenciação e proliferação celular, ciclo celular, apoptose, resposta imune e regulação da transcrição. *JUNB* foi um dos genes identificados e, usando reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR), detectou-se expressão aumentada de *JUNB* em dois outros pacientes com PV *JAK2* V617F-positivos. Por meio de linhagens murinas Ba/F3-REPO e culturas primárias de eritroblastos humanos, observou-se que *JUNB* é expresso após adição de EPO e que a proteína JunB é constitutivamente induzida por *JAK2* V617F. Além disso, interferência na expressão de *JUNB* diminuiu o potencial clonogênico e proliferativo de progenitores eritróides humanos. Ainda, em PV, a eritropoese causada por *JAK2* V617F mostrou-se mais sensível à diminuição de expressão de JunB do que a eritropoese normal. Assim, esses resultados sugerem que JunB tenha um papel fundamental no desenvolvimento de SMPs causadas por *JAK2* V617F.

ABSTRACT

Polycythemia vera (PV) is a chronic myeloproliferative disorder that arises through clonal proliferation of multipotent hematopoietic progenitors. PV patients present bone marrow trilineage expansion, leading to increased production of mature red cells, granulocytes and platelets. Important PV features are elevated red cell mass, despite normal or subnormal erythropoietin (EPO) levels, and endogenous erythroid colony (EEC) formation. The *JAK2* V617F mutation, present in the majority of polycythemia vera (PV) patients, causes a *JAK2* constitutive activation and seems to be responsible for the PV phenotype. However, the transcriptional changes triggered by the mutation have not yet been totally characterized. Serial analysis of gene expression (SAGE) was used to perform a large scale gene expression study in bone marrow cells of a newly-diagnosed PV patient harboring the *JAK2* V617F mutation and in normal bone marrow cells from healthy donors. Genes overexpressed in PV are involved in important biological processes, such as signal transduction, cellular differentiation, cellular proliferation, cell cycle, apoptosis, immune response and transcriptional regulation. *JUNB* was one of the genes up-regulated in PV and overexpression of *JUNB* was also detected by quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) in hematopoietic cells of another two *JAK2* V617F PV patients. Using Ba/F3-EPOR cell lines and primary human erythroblast cultures, *JUNB* was found to be expressed after Epo addition and JunB protein was shown to be constitutively induced by *JAK2* V617F. In addition, *JUNB* knock down reduced the clonogenic and proliferative potential of human erythroid progenitors. Furthermore, in PV, the *JAK2* V617F driven erythropoiesis was more sensitive to JunB downregulation than normal erythropoiesis. Hence, these results demonstrate that JunB may play a major role in the development of *JAK2* V617F myeloproliferative disorders.

1- INTRODUÇÃO

“O começo de todas as ciências é o espanto de as
coisas serem o que são”

Aristóteles - Metafísica

1.1- Síndromes mieloproliferativas

“Síndromes mieloproliferativas” (SMPs) foi o termo cunhado em 1951, quando William Dameshek observou que policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE), mielofibrose idiopática (MF) e leucemia mielóide crônica (LMC) apresentavam várias características clínicas e biológicas similares (Dameshek W, 1951). Já em 2002, além das SMPs clássicas, a Organização Mundial de Saúde (OMS) incluiu em sua classificação doenças mieloproliferativas menos frequentes, como leucemia neutrofílica crônica (LNC), síndrome hipereosinofílica/leucemia eosinofílica crônica (SHE/LEC) e outras, não classificáveis (Vardiman JW et al., 2002).

As SMPs se originam por proliferação clonal de um progenitor hematopoético pluripotencial (Adamson JW et al., 1976; Fialkow PJ et al., 1981; Fialkow PJ et al., 1967; Jacobson RJ et al., 1978), levando à hematopoese exacerbada com expansão de uma ou mais linhagens (Spivak JL et al., 2003). Entre as manifestações clínicas comuns às SMPs estão hiperplasia de medula óssea, hematopoese extramedular ocasionando esplenomegalia, transformação para leucemia aguda, desenvolvimento de mielofibrose e alto risco de hemorragia e trombose (Spivak JL et al., 2003).

Progenitores hematopoéticos de SMPs possuem características biológicas marcantes, como hipersensibilidade a diversas citocinas, incluindo eritropoetina (EPO), interleucina 3 (IL-3), *stem cell factor* (SCF), *insulin like growth factor* (IGF-1), *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) e trombopoetina (TPO) (Axelrad AA et al., 2000; Correa PN et al., 1994; Dai CH et al., 1992; Dai CH et al., 1994a; Prchal JF e Axelrad AA, 1974) e a habilidade de gerar, *in vitro*, colônias eritróides independentes de eritropoetina, conhecidas como colônias eritróides endógenas (CEE) (Prchal JF e Axelrad AA, 1974).

1.2- Policitemia vera

Policitemia vera é uma SMP caracterizada por hiperplasia das três principais linhagens mielóides, com predominância de progenitores eritróides (Adamson JW et al., 1976). Em PV, a eritrocitose ocorre em níveis normais ou baixos de EPO

(de Klerk G et al., 1981) e neste aspecto distingue-se das eritrocitoses secundárias, em que a proliferação eritróide ocorre em resposta à concentrações elevadas desta citocina (Berlin NI, 1975).

A) Manifestações clínicas

A PV manifesta-se, em média, ao redor dos 60 anos de idade, mas também pode ocorrer em adultos jovens e muito raramente em crianças. Entre as manifestações clínicas, observam-se cefaléia, fraqueza, prurido, tontura e sudorese em 30% a 40% dos pacientes. Queixas neurológicas como vertigem, diplopia, escotomas e isquemias cerebrais transitórias também podem estar relacionadas. É freqüente a ocorrência de esplenomegalia. Entre as doenças associadas destacam-se a gota e úlcera péptica. Pacientes com PV estão mais propensos a hemorragias e trombose. Esta ocorre em 30% dos pacientes antes do estabelecimento do diagnóstico e em 40% a 60% durante os primeiros 10 anos. Em pacientes não tratados, a incidência de trombose é altíssima, com média de sobrevida de 18 meses. Algumas formas de tromboembolismo envolvidas podem ser fatais, como trombose venosa profunda, trombose das veias hepáticas e sistema portocava, embolia pulmonar, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral. Em alguns casos, a PV pode evoluir para mielofibrose, mielodisplasia e leucemia aguda (Zago MA FR, Pasquini R, 2001).

B) Diagnóstico

Os critérios internacionais para diagnóstico da PV propostos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) estão indicados na Tabela 1 (Jaffee ES et al., 2001).

Tabela 1- Critérios da Organização Mundial de Saúde para diagnóstico de policitemia vera.

A1 Volume elevado de células vermelhas > 25% acima do volume médio normal estimado ou Hb > 18.5 g/dl homens, 16.5 g/dl mulheres ou > 99º percentil de faixa referência de método específico para idade, sexo, altitude de residência
A2 Ausência de causa de eritrocitose secundária, incluindo: Ausência de eritrocitose familiar Nenhuma elevação de eritropoetina devido a: Hipóxia (pO ₂ arterial =< 92%) Hemoglobina com alta afinidade por oxigênio Receptor de eritropoetina truncado Produção inapropriada de eritropoetina por tumor
A3 Esplenomegalia
A4 Outras anormalidades genéticas clonais que não cromossomo Ph ⁺ ou gene <i>BCR/ABL</i> em células de medula óssea
A5 Formação endógena de colônia eritróide <i>in vitro</i>

B1 Trombocitose > 400X10 ⁹ /l
B2 Contagem de leucócitos totais > 12X10 ⁹ /l
B3 Biópsia de medula óssea mostrando panmielose com proliferação proeminente de linhagens eritróide e megacariocítica
B4 Baixos níveis de eritropoetina no soro

Interpretação

Policitemia vera = A1 + A2 + 1 critério A
Policitemia vera = A1 + A2 + pelo menos 2 dos critérios B

C) Tratamento

Não existindo tratamento específico para PV, a principal terapia no manuseio da doença é a sangria, com objetivo de manter o hematócrito abaixo de 45%. Para pacientes com alto risco trombótico ou que desenvolvem plaquetose ou esplenomegalia progressiva, deve-se indicar um agente mielosupressor (Zago MA et al., 2001).

D) Características biológicas e moleculares

Além das características comuns às SMPs, como hipersensibilidade a fatores de crescimento e formação de colônias eritróides espontâneas, diversos aspectos biológicos e moleculares de células hematopoéticas de pacientes com PV já foram investigados.

Estudos dos receptores celulares de fatores de crescimento hematopoéticos em PV incluíram os genes codificadores, a estrutura das proteínas, sua capacidade de ligação à citocina e as mudanças bioquímicas decorrentes desta interação. Apesar da existência de receptores de EPO (REPO) truncados em casos de eritrocitose familiar (de la Chapelle A et al., 1993), em pacientes com PV, análises por *Southern Blot* não detectaram grandes rearranjos, inserções ou deleções no gene do REPO (Emanuel PD et al., 1992) e dados de SSCP não indicaram mutações pontuais neste gene ou em seu promotor (Hess G et al., 1994). Além disso, se observou que a ligação de EPO ao receptor era similar em progenitores eritróides de pacientes com PV e progenitores normais (Means RT, Jr. et al., 1989). Com relação ao receptor de IGF-1 (RIGF-1), observou-se, em progenitores eritróides de pacientes com PV, fosforilação constitutiva do receptor, sendo a resposta ao fator de crescimento também elevada (Mirza AM et al., 1995). Já para o receptor de TPO (RTPO ou Mpl), demonstrou-se que megacariócitos e plaquetas de pacientes com PV têm expressão reduzida desta proteína, e sinalização defeituosa em resposta à citocina (Moliterno AR et al., 1998). O receptor Mpl apresentou, ainda, glicosilação posterior à tradução incompleta (Moliterno AR e Spivak JL, 1999). Experimentos de ligação e análises autoradiográficas não demonstraram diferenças significativas na ligação específica de IL-3 a seu receptor entre progenitores eritróides PV e normais (Dai CH et al., 1992). Da mesma forma, o número de receptores de SCF, suas constantes de dissociação e taxa de internalização se mostraram similares (Dai CH et al., 1994b).

Além dos receptores, estudou-se também em PV o processo de transdução de sinal. A via de sinalização hematopoética intracelular mais bem caracterizada é JAK/STAT. O processo se inicia quando receptores celulares, após a ligação específica de citocinas, são dimerizados e provocam ativação de tirosino-quinases citoplasmáticas, as JAKs (*Janus* quinases). Estas, por sua vez, além de fosforilar diversas outras proteínas celulares,

ativam STATs (transdutores de sinal e ativadores de transcrição), localizados no citoplasma, que então se dimerizam e se deslocam para o núcleo, interferindo no mecanismo de controle da transcrição (Ward AC et al., 2000) (Figura 1). Experimentos de *gel-shift* demonstraram atividade de ligação ao DNA constitutiva do fator de transcrição STAT3 em 4 dos 14 pacientes com PV analisados (Roder S et al., 2001). Outras proteínas que integram a via JAK/STAT são as tirosino-fosfatase citoplasmáticas, como SHP-1 (Adachi M et al., 1996), que regulam negativamente a transdução do sinal hematopoético (Ward AC et al., 2000). Evidências de que SHP-1 estaria comprometida em PV foram descritas (Wickrema A et al., 1999), mas observou-se que o gene que codifica esta fosfatase apresentava-se estruturalmente intacto e a proteína, produzida em níveis normais (Asimakopoulos FA et al., 1997). Ainda, ensaios enzimáticos em progenitores eritróides indicaram aumento da atividade tirosino-fosfatase total, principalmente devido a uma fosfatase de 170kDa, PTP-MEG2, que se localiza na membrana celular ou associada a ela (Sui X et al., 1997; Xu MJ et al., 2003). Além da via JAK/STAT, a ligação de EPO a seu receptor ativa também as vias PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase)/AKT, MEK/ERK (MAPK) (quinase regulada por sinal extracelular ou proteína quinase ativada por mitógeno) e src-PTKs (proteínas tirosino-quinases da família src) (Figura 1) e o uso de inibidores em progenitores eritróides mostrou que as vias JAK2, PI3K e Scr estão envolvidas na diferenciação eritróide espontânea da PV (Ugo V et al., 2004). Detectou-se também fosforilação aumentada de AKT em progenitores eritróides de pacientes com PV (Dai C et al., 2005).

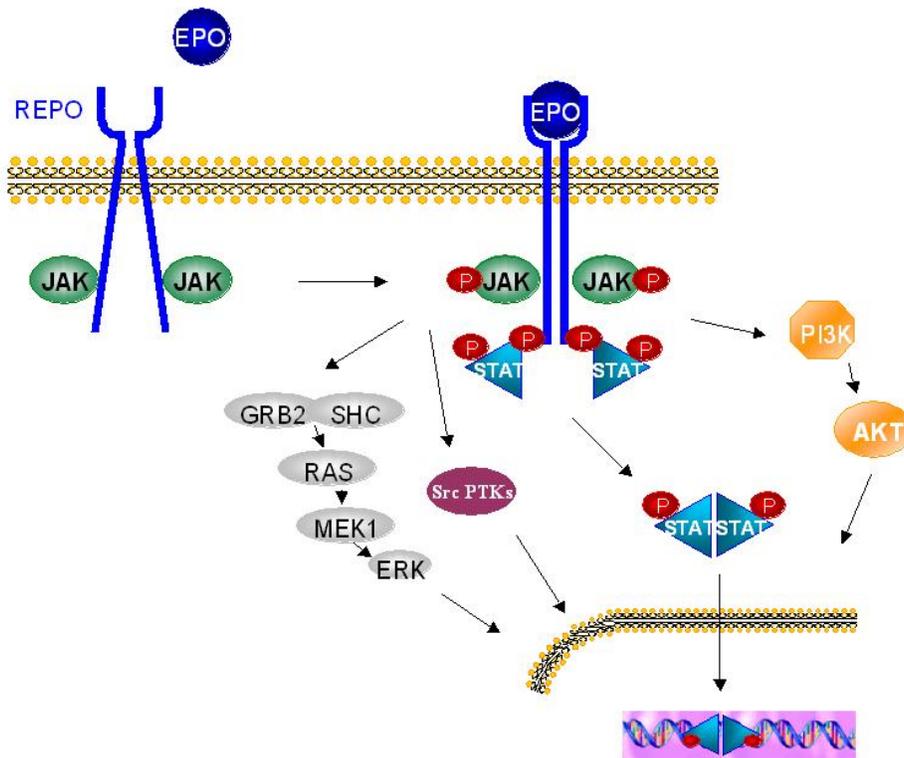


Figura 1- Vias de sinalização hematopoéticas. A transdução de sinal se inicia quando receptores celulares, como o receptor de eritropoetina (REPO), após a ligação específica de citocinas, são dimerizados e provocam ativação de tirosino-quinases citoplasmáticas, as JAKs (*Janus* quinases). Estas, por sua vez, ativam STATs (transdutores de sinal e ativadores de transcrição), localizados no citoplasma, que então se dimerizam e se deslocam para o núcleo, interferindo no mecanismo de controle da transcrição. Além da via JAK/STAT, a ligação de EPO a seu receptor ativa também as vias PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase)/AKT, MEK/ERK (MAPK) (quinase regulada por sinal extracelular ou proteína quinase ativada por mitógeno) e src-PTKs (proteínas tirosino-quinases da família src)

Outras investigações moleculares em PV envolveram proteínas reguladoras do ciclo celular e apoptose. Dois importantes reguladores do ciclo celular, p16^{INK4a} e p14^{ARF}, são codificados pelo locus INK4a/ARF no cromossomo 9 (Sharpless NE e DePinho RA, 1999). Diferentemente de várias doenças malignas, em progenitores eritróides de PV estes genes não apresentaram mutações e estavam superexpressos, sem no entanto acarretar mudanças no ciclo celular (Dai C e Krantz SB, 2001). De outro modo, progenitores eritróides tardios normais dependem de EPO, que atua nestas células protegendo-as de apoptose (Koury MJ e Bondurant MC, 1990) por meio da expressão dos genes Bcl-x_L e Bcl-2 (Silva M et al., 1996). Em PV, observou-se expressão elevada de Bcl-x_L independente de EPO, prevenindo a entrada destas células em apoptose (Silva M et al., 1998).

Além disso, a metodologia de biblioteca subtrativa de DNA complementar (cDNA) permitiu a identificação do gene denominado *PRV-1*, superexpresso especificamente em PV (Temerinac S et al., 2000). Análises por *Northern Blot* mostraram expressão deste gene em granulócitos de sangue periférico dos 19 pacientes com PV estudados, mas não nos 21 controles normais. Ao contrário da diferença observada na quantidade de mRNA *PRV-1*, a técnica de *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) mostra expressão similar da proteína PRV-1 na superfície celular de células de portadores de PV e controles normais.

1.3- A descoberta de JAK2 V617F

Apesar dos numerosos estudos acima descritos, permanecia desconhecida a alteração primária da PV, enquanto a fisiopatologia de outras SMPs e de algumas neoplasias mielóides relacionadas já indicavam papel importante de tirosino-quinases com funções alteradas. Proteínas fusionadas hiperativas, resultantes de translocações, forneceram a base genética de SMPs, como Bcr-Abl na LMC (Deininger MW et al., 2000) e FIP1L1-PDGFRFA em alguns casos de SHE (Cools J et al., 2003). Da mesma forma, FOP-FGFR1 e Bcr-JAK2 foram associadas à LMC atípica (Griesinger F et al., 2005; Guasch G et al., 2004), e tel-PDGFRB à leucemia mielomonocítica crônica (LMMC)

(Golub TR et al., 1994), duas síndromes mielodisplásicas/mieloproliferativas. Ainda, mutações relevantes para a patologia de mastocitose sistêmica (MS) foram descritas nos genes *c-kit* e *PDGFRA* (Tefferi A e Pardanani A, 2004).

O grande número de estudos concernentes as SMPs finalmente resultou, entre março e abril de 2005, na descrição de uma única mutação no gene *JAK2*, recorrente em pacientes com SMPs clássicas, Bcr-Abl negativas (Baxter EJ et al., 2005; James C et al., 2005; Kralovics R et al., 2005a; Levine RL et al., 2005b; Zhao R et al., 2005). A proteína *JAK2*, pertencente à família das *Janus* quinases, é também uma tirosino-quinase, fosforilada em resposta à ação de diversas citocinas, ativando assim diferentes vias de sinalização intracelular e participando do processo de transdução do sinal (Ihle JN et al., 1995) (Figura 1). Trata-se de uma mutação pontual, a substituição de uma guanina por timina ($G \rightarrow T$) no éxon 14 do gene *JAK2*, levando à substituição de uma valina por fenilalanina ($V \rightarrow F$) na posição 617 da proteína codificada (*JAK2* V617F). A mutação se localiza no subdomínio IV do domínio pseudo-quinase, no local de ligação de ATP. O domínio pseudo-quinase tem as características estruturais básicas de uma proteína tirosino-quinase, mas não tem atividade catalítica. Diversas evidências indicam que ele regula a atividade do domínio quinase. Assim, acredita-se que a mutação levaria a uma mudança de conformação na proteína, causando disrupção da atividade inibitória do domínio pseudo-quinase e desregulação do domínio quinase (Zhao R et al., 2005).

Esta alteração é somática, adquirida, sendo detectada em células de linhagem eritróide e mielóide, mas não em células T (Baxter EJ et al., 2005; James C et al., 2005; Kralovics R et al., 2005a) ou células da mucosa bucal (Levine RL et al., 2005b).

Métodos sensíveis demonstram a mutação em mais de 95% de pacientes com PV e em 50-60% de pacientes com TE ou MF (Campbell PJ e Green AR, 2006). A mutação *JAK2* V617F pode também ser encontrada em outras doenças mielóides, incluindo leucemia mielóide aguda (LMA), síndromes mielodisplásicas (SMD), LMMC, leucemia monomielocítica juvenil (LMMJ), LNC, SHE/LEC, MS e SMPs atípicas (Jelinek J et al., 2005; Jones AV et al., 2005; Tefferi A e Pardanani A, 2006). No entanto, *JAK2* V617F não é encontrada em controles saudáveis, em eritrocitose secundária (James C et al., 2005), em casos de SMP com alteração molecular definida, como Bcr-Abl ou outras tirosino-quinases

hiperativas (Jelinek J et al., 2005; Jones AV et al., 2005), em doenças linfóides agudas ou crônicas (Jelinek J et al., 2005; Levine RL et al., 2005a; Scott LM et al., 2005; Tefferi A e Pardanani A, 2006) ou em neoplasias não-hematológicas (Lee JW et al., 2006).

1.4- *JAK2* V617F e o fenótipo mieloproliferativo

Desde sua descoberta, a relevância da mutação *JAK2* V617F na gênese das SMPs vem sendo intensivamente estudada. Com relação à atividade tirosino-quinase e sinalização intracelular induzidas pela mutação, experimentos com diferentes linhagens celulares transfectadas com *JAK2* V617F demonstraram autofosforilação constitutiva de *JAK2*, fosforilação constitutiva do fator de transcrição STAT5 e ativação das vias ERK e PI3K/AKT (James C et al., 2005; Levine RL et al., 2005b; Zhao R et al., 2005).

Esta sinalização exacerbada levaria tanto à hipersensibilidade quanto à independência de fatores de crescimento, como demonstrado em curvas de crescimento de linhagens transfectadas com *JAK2* V617F na ausência ou em concentrações crescentes de IL-3 ou EPO (James C et al., 2005; Kralovics R et al., 2005a; Levine RL et al., 2005b).

Ensaio utilizando *small interfering* RNA para redução de expressão de *JAK2* mostraram diminuição de diferenciação eritróide normal em células de pacientes portadores de PV, assim como inibição da formação de colônias eritróides espontâneas (James C et al., 2005). Concentrações crescentes de um inibidor de *JAK2* também causaram diminuição da proliferação de células da linhagem HEL, portadoras da mutação *JAK2* V617F (Levine RL et al., 2005b). Camundongos letalmente irradiados que tiveram seu sistema hematopoético reconstituído por células contendo a mutação desenvolveram eritrocitose, com aumento de hematócrito a 60% (James C et al., 2005).

Além deste achados, compatíveis com o fenótipo observado nas SMPs, nota-se que a mutação ativadora de *JAK2* explicaria algumas das alterações anteriormente descritas:

- 1- Dos fatores de crescimento aos quais os progenitores SMP são hipersensíveis, EPO, TPO, IL-3, GM-CSF e SCF utilizam JAK2 para sinalização intracelular (Parganas E et al., 1998).
- 2- Alterações observadas em diversas moléculas de sinalização intracelular ativadas pela via JAK2, como ativação constitutiva de STAT3 (Roder S et al., 2001), superexpressão de Bcl-x1 (Silva M et al., 1998) e aumento de atividade Akt (Dai C et al., 2005),
- 3- Envolvimento da via JAK2 na diferenciação eritróide terminal (Ugo V et al., 2004).
- 4- Perda de heterozigose devido à recombinação mitótica no braço curto do cromossomo 9 (Kralovics R et al., 2002), onde se localiza o gene *JAK2*.

Como colocado por Kaushansky: “tudo faz sentido!” (Kaushansky K, 2005). No entanto, esta descoberta permitiu que outras importantes questões fossem levantadas, por exemplo, como uma única mutação pode desencadear três doenças com características distintas (PV, TE e MF)? Que mecanismos determinam a doença nos pacientes em que não se detecta a mutação? Que mecanismos moleculares são ativados pela mutação?

A) Como uma única mutação pode desencadear três doenças distintas?

Atualmente três hipóteses são propostas para se compreender como a mesma mutação poderia dar origem a três doenças fenotipicamente distintas. A primeira postula que o fenótipo da doença dependeria da natureza da célula progenitora afetada pela mutação. Uma segunda hipótese seria de que o nível da atividade quinase gerada pela mutação determinaria o perfil da doença. Ainda uma terceira considera que eventos alternativos e/ou adicionais poderiam ser responsáveis pela variedade clínica ou mesmo preceder a mutação (Delhommeau F et al., 2006; Villeval JL et al., 2006).

A.1- Natureza da célula progenitora

Os fenótipos de PV, TE e MF variam pela extensão com que as linhagens eritrocitária, megacariocítica ou granulocítica estão envolvidas (Spivak JL, 2004). Em PV, há aumento proeminente de massa eritrocitária, enquanto em TE a contagem de plaquetas

aumenta dramaticamente (Pahl HL, 2000). Em mielofibrose a hiperproliferação de células mielóides e megacariocíticas na medula óssea estimulam a proliferação de fibroblastos residentes, levando à deposição de colágeno e fibrose da medula óssea (Pahl HL, 2000). Poderia-se, portanto, especular que a clínica destas doenças é determinada pela capacidade da célula progenitora afetada pela mutação se diferenciar nas diferentes linhagens. No entanto, esta hipótese parece ser pouco provável, uma vez que evidências recentes demonstram que, ao menos em PV e MF, a célula mutada tem caráter multipotencial (Delhommeau F et al., 2007; Jamieson CH et al., 2006).

A.2- Nível de atividade JAK2 V617F

Esta segunda hipótese sugere que baixos níveis de atividade quinase favoreceriam um fenótipo megacariocítico (TE) e altos níveis, um fenótipo eritróide (PV). Atividade quinase sustentada, dependendo do nível e tempo de exposição, levariam à mielofibrose (Delhommeau F et al., 2006; Villeval JL et al., 2006). Diversas evidências parecem suportar este mecanismo proposto, como experimentos em modelos animais e análises de zigose em pacientes.

Em camundongos letalmente irradiados que tiveram seu sistema hematopoético reconstituídos por células com superexpressão de *JAK2 V617F*, observou-se rápido aparecimento de eritrocitose e, após alguns meses de exposição, aparecimento de mielofibrose, mimetizando a evolução natural da doença no homem (Lacout C et al., 2006; Wernig G et al., 2006). Ainda, trombocitose transitória só foi observada no grupo expressando baixos níveis de *JAK2 V617F* (Lacout C et al., 2006).

Já em pacientes com SMPs, a zigose parece ter papel importante na determinação do fenótipo. A homozigose aumenta a atividade quinase mutada não só por duplicação gênica decorrente de recombinação mitótica (Kralovics R et al., 2005a), como provavelmente também pela falta de competição com a proteína selvagem (James C et al., 2005), e o clone homozigoto teria uma vantagem proliferativa (Delhommeau F et al., 2006). De fato, em alguns pacientes com PV se observou transição de uma população mista heterozigota/homozigota para uma população predominantemente homozigota (Passamonti F et al., 2006; Scott LM et al., 2006).

Quantificações de *JAK2* V617F em SMPs mostraram que a grande maioria de pacientes com TE é heterozigota para a mutação (93-100%), enquanto 28% (21-35%) de pacientes com PV e 14% de pacientes com MF (0-21%) são homozigotos (Tefferi A e Pardanani A, 2006).

A avaliação da clínica de pacientes com SMPs à luz destas observações indica que pacientes com TE positivos para a mutação poderiam ser vistos como uma manifestação incompleta de PV. Comparados a pacientes com TE *JAK2* V617F-negativos, a mutação confere à TE características de PV, incluindo nível aumentado de hemoglobina e resposta similar a tratamento (Campbell PJ et al., 2005). Em PV, observou-se que pacientes homozigotos apresentaram níveis de hemoglobina e taxas de transformação fibrótica maiores que pacientes heterozigotos para a mutação (Tefferi A et al., 2006). Ainda, pacientes com fibrose apresentaram maior quantidade de alelo mutado que indivíduos sem fibrose, e pacientes com PV cuja doença evoluiu para MF têm granulócitos predominantemente homozigotos (Passamonti F et al., 2006), sugerindo que altos níveis de atividade *JAK2* quinase poderiam levar à fibrose.

Assim, sugere-se que PV, TE e MF poderiam ser interpretadas como etapas diferentes da mesma doença, cujo processo se iniciaria pela mutação em heterozigose levando à TE, sendo a progressão para PV e MF regulada por eventos que aumentariam a atividade quinase e pelo tempo de exposição (Delhommeau F et al., 2006; Villeval JL et al., 2006). Nota-se também que este modelo seria compatível com o padrão geral de evolução clínica, severidade e prevalência das três doenças (Villeval JL et al., 2006).

Entre os eventos que aumentam a atividade *JAK2* V617F poderiam estar a duplicação do alelo mutado por recombinação mitótica (Kralovics R et al., 2005a), trissomia 9p (Andrieux JL e Demory JL, 2005) ou outros, como desregulação de fosfatases (Xu MJ et al., 2003), proteínas supressoras de sinalização de citocinas (SOCS) (Hookham MB et al., 2007) e polimorfismos ou mutações em receptores de citocinas (Moliterno AR et al., 2004). Neste sentido, haveria uma sobreposição entre as hipóteses “nível de atividade *JAK2* V617F” e “eventos adicionais e/ou alternativos”, para explicar a diversidade clínica em SMPs.

A.3- Eventos adicionais e/ou alternativos

Uma terceira hipótese seria de que outros eventos, que não a mutação *JAK2* V617F, poderiam determinar o fenótipo final da doença, ou mesmo preceder à mutação.

Além das já citadas alterações que afetam diretamente a atividade *JAK2* V617F, destacam-se outros modificadores. De uma forma geral, o contexto genético parece influenciar no desenvolvimento da doença induzida pela mutação: diferentes linhagens de camundongos letalmente irradiados que tiveram seu sistema hematopoético reconstituído por células *JAK2* V617F têm fenótipos distintos da doença (Wernig G et al., 2006). Sugere-se também que o sexo poderia ser um outro fator, pois nota-se que TE é mais comum em mulheres e PV, em homens (Campbell PJ et al., 2005). Ainda, pacientes com MF apresentam alta frequência de anormalidades cromossômicas (Bench AJ e Pahl HL, 2005), que poderiam contribuir para o fenótipo da doença.

De outro modo, um estudo com SMPs familiares mostra que também nestes casos, a mutação *JAK2* V617F é adquirida, sugerindo que poderiam haver fatores genéticos anteriores, precedendo e favorecendo a ocorrência da mutação (Bellanne-Chantelot C et al., 2006). A observação de clones leucêmicos *JAK2* V617F-negativos em pacientes SMP *JAK2* V617F-positivos também poderiam indicar que a mutação pode não ser o evento clonogênico inicial da doença (Campbell PJ et al., 2006a; Theocharides A et al., 2007).

B) Que alterações são responsáveis pelo desenvolvimento da doença em pacientes *JAK2* V617F-negativos?

Mesmo que diversos estudos relacionem a mutação *JAK2* V617F a SMPs, nota-se que uma proporção significativa de pacientes com TE e pacientes com MF são negativos para a mutação. No intuito de se identificarem, nestes pacientes, os mecanismos reponsáveis pelo desenvolvimento da doença, descobriu-se recentemente uma mutação ativadora somática no domínio transmembrana de Mpl (*MPL* W515L) em 9% de pacientes com MF *JAK2* V617F-negativos (Pikman Y et al., 2006). A mutação *MPL* W515L conferiu

crescimento independente de citocinas e hipersensibilidade à TPO, além de sinalização intracelular aumentada (Pikman Y et al., 2006). No modelo animal expressando a mutação, observou-se fenótipo mieloproliferativo, com trombocitose marcante, hematopoese extramedular levando à esplenomegalia e fibrose (Pikman Y et al., 2006). Um estudo posterior descreveu uma nova mutação *MPL* (*MPL* W515K) e concluiu que mutações *MPL* estão presentes em 5% de pacientes com MF e 1% de pacientes com TE, mas não em PV ou outras doenças mielóides (Pardanani AD et al., 2006). Tomados em conjunto estes trabalhos sugerem que mutações *MPL* sejam relevantes para fisiopatologia de TE e MF.

Ainda, quatro novas mutações foram descritas no éxon 12 do gene *JAK2* em 10 pacientes com PV negativos para *JAK2* V617F. Todas elas parecem ser mutações somáticas, presente apenas em pacientes com fenótipo policitêmico *JAK2* V617F-negativos e não em pacientes com TE (Scott LM et al., 2007). Curiosamente, diferente da mutação *JAK2* V617F, que está presente em homozigose na maioria dos progenitores hematopoéticos em PV (Scott LM et al., 2006), as recém-descritas mutações no éxon 12 de *JAK2* estão presentes em heterozigose nestas células (Scott LM et al., 2007). Ainda assim, são responsáveis por hipersensibilidade a fatores de crescimento e ativação de vias associadas a sinalização de EPO, sendo que três delas, contendo a substituição K539L, geraram níveis de fosforilação *JAK2* e vias associadas notadamente mais altos que *JAK2* V617F (Scott LM et al., 2007). Os modelos animais reproduziram fenótipos similares ao observado em pacientes portando as mutações K539L, ou seja, hematócrito elevado e contagem de leucócitos e de plaquetas mais baixas que as observadas para células *JAK2* V617F (Scott LM et al., 2007). Estes resultados parecem concordar com a hipótese de que baixos níveis de atividade *JAK2* V617F estariam associados à TE e altos, à PV.

C) Que mecanismos moleculares são ativados pela mutação?

Como anteriormente discutido, os estudos iniciais mostram que *JAK2* V617F é uma quinase constitutivamente ativa, porém os exatos mecanismos moleculares pelos quais esta mutação induz sinalização independente de citocina não são conhecidos (Staerk J et al., 2007). A mutação poderia simplesmente mimetizar a estimulação por citocinas ou desencadear mecanismos moleculares diferentes.

Acredita-se que a proteína mutante interaja com os receptores normalmente ligados por JAK2, ou seja, REPO, RTPO ou Mpl, receptor para *granulocyte-specific colony-stimulating factor* (G-CSF) (RG-CSF) e outros, e que estes complexos sejam as entidades constitutivamente ativas (Staerk J et al., 2007). Ensaio *in vitro* mostraram que células portando somente JAK2 mutada respondem à presença de citocinas e, ainda que os mecanismos possam não ser os mesmos induzidos por JAK2 WT ativada, sugerem que JAK2 V617F tem capacidade se ligar aos receptores e ativar sinalização via domínios citosólicos do receptor (Staerk J et al., 2005).

Com relação à maturação e ao tráfego intracelular de receptores, sabe-se que JAK2 WT promove estes processos para REPO (Huang LJ et al., 2001) e RTPO (Royer Y et al., 2005). JAK2 WT é também necessária à estabilização da forma madura de RTPO, sua localização na superfície celular e reciclagem (Royer Y et al., 2005). Evidências iniciais mostraram que JAK2 V617F promove eficientemente o tráfego de REPO, mas não de RTPO (Staerk et al, *manuscript in preparation*) e (Staerk J et al., 2007). Infere-se, deste modo, que pacientes homocigotos para a mutação tenham baixa expressão de RTPO na superfície celular (Staerk J et al., 2007). Esta hipótese concordaria com observações anteriores de que plaquetas e megacariócitos de pacientes com PV e pacientes com MF apresentam níveis baixos de RTPO na superfície celular (Moliterno AR et al., 1998) e maturação deficiente deste receptor (Moliterno AR e Spivak JL, 1999).

Um outro aspecto relevante é a observação de que a proteína mutada, expressa em níveis endógenos, requer co-expressão de receptor homodimérico de tipo 1, como REPO, RTPO ou RG-CSF para independência de fatores de crescimento e ativação constitutiva da via JAK-STAT (Lu X et al., 2005). Este fenômeno poderia contribuir para a restrição da patogênese induzida por JAK2 V617F à linhagem mielóide, uma vez que a linhagem linfóide não expressa receptores do tipo 1 (Delhommeau F et al., 2006).

Ainda com relação à atividade da mutação, descreveu-se que, diferentemente da proteína selvagem, JAK2 V617F interage com a via do receptor RIGF-1 (Staerk J et al., 2005), fato este que explicaria a hipersensibilidade a IGF-1 descrita em progenitores SMPs (Correa PN et al., 1994).

Apesar destes achados indicarem que haveria uma interação diferencial da proteína mutada com os receptores expressos nas diferentes linhagens hematopoéticas, ainda permanece desconhecido o papel destes complexos JAK2 V617F-receptor no desenvolvimento de PV, TE e MF.

1.5- Justificativa

Estas recentes descobertas deram nova luz à pesquisa dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos em PV. A observação de que a mutação induz atividade quinase constitutiva de JAK2 e ativa também vias de sinalização explica em parte o fenótipo proliferativo das células. No entanto, além de alterações na transdução de sinal, a mutação deve também provocar mudanças no programa transcricional das células afetadas, que apenas recentemente começou a ser caracterizado (Kralovics R et al., 2005b). Assim, acredita-se que estudos de expressão gênica global de progenitores hematopoéticos possam contribuir para esclarecer os mecanismos moleculares ativados pela mutação, principalmente aqueles subjacentes à formação de CEE em SMPs e ao potencial aumentado para diferenciação eritróide de células tronco hematopoéticas mutadas (Jamieson CH et al., 2006).

2- OBJETIVOS

“L'expérimentateur qui ne sait pas ce qu'il cherche ne comprend pas ce qu'il trouve.”

Claude Bernard

Objetivos gerais

- 1- Determinação dos perfis de expressão gênica global de células totais de medula óssea de pacientes com policitemia vera (PV) e de controles.
- 2- Análise da expressão gênica diferencial entre as duas condições.
- 3- Estudo de gene(s) possivelmente envolvido(s) na fisiopatologia de PV.

Objetivos específicos

- 1- Construção de duas bibliotecas utilizando a técnica de *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE): uma a partir de RNA de células da medula óssea de um paciente com PV positivo para a mutação *JAK2 V617F* e outra a partir de *pool* de RNA de células da medula óssea de cinco doadores de medula óssea para transplante.
- 2- Validação dos resultados obtidos por SAGE por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR).
- 3- Comparação de bibliotecas SAGE para identificação de genes diferencialmente expressos.
- 4- Como decorrência dos resultados anteriores, análise da expressão gênica de *JUNB* em diferentes tipos celulares hematopoéticos, análise de sua relação com a proteína mutada *JAK2 V617F* e estudo de seu papel na eritropoese.

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

“Não existem métodos fáceis para resolver problemas
difíceis”

Descartes

3.1- Casuística

A) Pacientes e controles

Diagnósticos de PV, TE e MF foram feitos segundo critérios adotados internacionalmente (Barosi G et al., 1999; Michiels JJ et al., 2000; Vardiman JW et al., 2002). Como controle, foram coletadas amostras de indivíduos saudáveis ou de pacientes que realizam citaférese.

Para verificar a frequência da mutação *JAK2* V617F em pacientes brasileiros, foram estudados 49 pacientes com PV, 25 pacientes com MF e 29 pacientes com TE, todos atendidos no Hemocentro da UNICAMP. Como controle, foram analisados oito doadores voluntários de sangue periférico.

Nos estudos de expressão gênica por SAGE, foram analisados um paciente com PV, diagnosticado no Hemocentro da UNICAMP, e cinco doadores de medula óssea para transplante, sem alterações hematológicas, submetidos a este procedimento no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

Para validação dos resultados qRT-PCR, foram estudados o mesmo paciente com PV e três dos doadores de medula óssea incluídos nos estudos de expressão gênica por SAGE.

Nas análises de expressão do gene *JUNB* em células hematopoéticas, foram estudados 20 pacientes com PV, acompanhados no Hemocentro da UNICAMP. Como controle, foram estudados três doadores de medula óssea para transplante (os mesmos estudados por SAGE) e 20 doadores voluntários de sangue periférico. O experimento de expressão de *JUNB* em células CD34+ foi realizado em células obtidas de dois pacientes com PV, dois pacientes com MF e um controle, atendidos nos hospitais Hôtel-Dieu ou Henri Mondor (Paris, França).

Experimentos de deprivação e re-estimulação de eritrócitos com eritropoetina foram realizados com células de três pacientes com PV, um paciente com MF e três controles, atendidos nos hospitais Hôtel-Dieu ou Henri Mondor (Paris, França). Já os experimentos de inibição de *JUNB*, foram feitos com células de dois pacientes com PV, um paciente com MF e dois controles, também atendidos nos hospitais franceses.

B) Aspectos éticos

O projeto intitulado “Análise da expressão gênica em policitemia vera por *Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)*” foi apresentado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP - CEP em 19/05/2003 e aprovado em 15/07/2003 (registro CEP: 204/2003). Foi aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) em 13/10/2003 (registro CONEP: 7989), segundo as determinações do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções 196/96 e 251/97). O projeto intitulado “Frequência da mutação *JAK2 V617F* em pacientes portadores de policitemia vera, mielofibrose primária e trombocitemia essencial no Brasil” foi apresentado ao CEP em 06/03/2006 e aprovado em 11/05/2006 (registro CEP: 092/2006). O estudo também foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa dos hospitais Hôtel-Dieu and the Henri Mondor (França). Todos os pacientes envolvidos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), de acordo a Declaração de Helsinki (Paris, France). Os TCLEs para este estudo contêm justificativa, os objetivos e os procedimentos da pesquisa, os desconfortos e riscos possíveis e benefícios esperados, a garantia do sigilo que assegure a privacidade quanto aos dados confidenciais; a liberdade de abandonar a pesquisa em qualquer tempo sem ter sua assistência médica comprometida, o nome e telefone dos pesquisadores para esclarecer eventuais dúvidas, bem como o telefone do Comitê de Ética em Pesquisa (Anexos 1-4).

3.2- Amostras biológicas

A) Medula óssea

A coleta de medula óssea foi feita por punção aspirativa e as amostras de 4ml foram alíquotadas em tubos contendo ácido tetraacético ethilenediamina (EDTA). Para pacientes com PV, a coleta ocorreu no momento do exame para diagnóstico, antes que os pacientes recebessem medicação. Para doadores de medula, a coleta foi feita no momento da coleta para doação.

B) Sangue periférico

Amostras de sangue periférico de pacientes e controles foram coletadas em tubos (4ml) contendo EDTA, independentemente do tempo de diagnóstico ou tratamento.

C) Bolsas de sangria terapêutica

Bolsas contendo cerca de 500ml de sangue periférico, resultantes do procedimento de sangria terapêutica realizado em pacientes com PV e que normalmente são descartadas, foram utilizadas neste estudo.

3.3- Tipos celulares e cultura primária de células humanas

A) Células totais de medula óssea

As amostras de medula óssea foram centrifugadas (3000rpm, 10min, 4°C), sendo o plasma descartado e as células ressuspensas em 5V de tampão de lise de hemácias (0,144M NH₄Cl; 0,01M NH₄HCO₃). As amostras foram incubadas por 30min a 4°C com agitação periódica vigorosa. Após nova centrifugação (3000rpm, 15min, 4°C) e descarte do sobrenadante, as células foram lavadas com tampão de lise de hemácias e a seguir ressuspensas em reagente TRIzol (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) (5x10⁶-1x10⁷ células/ml). Os células totais de medula óssea obtidos foram utilizados para análise de expressão gênica global por SAGE, para validação dos resultados e análise da expressão gênica de *JUNB* por qRT-PCR.

B) Leucócitos totais de sangue periférico

Para obtenção de leucócitos totais, amostras de sangue periférico foram centrifugadas (3000rpm, 10min, 4°C), sendo o plasma descartado e as células ressuspensas em 5V de tampão de lise de hemácias. As amostras foram incubadas por 30min a 4°C com agitação periódica vigorosa. Após nova centrifugação (3000rpm, 15min, 4°C) e descarte do

sobrenadante, as células foram lavadas com tampão de lise de hemácias e a seguir ressuspensas em reagente TRIzol. Leucócitos totais de sangue periférico foram utilizados para análise da expressão de *JUNB* por qRT-PCR.

C) Células mononucleares X granulócitos

A separação de células mononucleares e granulócitos foi feita por gradiente de densidade, utilizando-se HISTOPAQUE[®]-1119 e HISTOPAQUE[®]-1077 (Sigma-Aldrich, Steinheim) conforme recomendação do fabricante. Preparou-se gradiente de dupla densidade, adicionando-se a um falcon (15ml) primeiramente 3ml de HISTOPAQUE[®]-1119 e após, cuidadosamente, 3ml de HISTOPAQUE[®]-1077. Adicionaram-se 6ml de sangue periférico e centrifugaram-se as amostras (700g, 30min, temperatura ambiente). Após a centrifugação, as células mononucleares foram encontradas na interface plasma/HISTOPAQUE[®]-1077, coletadas com auxílio de pipeta Pasteur e transferidas para novo falcon. Já as células da linhagem granulocítica foram encontradas na interface HISTOPAQUE[®]-1077/HISTOPAQUE[®]-1119 e, do mesmo modo, foram coletadas com pipeta Pasteur e transferidas para novo falcon. As células já separadas (mononucleares ou granulócitos) foram então lavadas com 8ml de tampão 1X *phosphate buffer solution* (PBS) (8g de NaCl, 0,2g de KCl, 2,89g de Na₂HPO₄.12H₂O, 0,2g KH₂PO₄ para 1l, pH7,4) e centrifugadas (1600rpm, 10min, temperatura ambiente). Após a retirada do sobrenadante, foi feita a lise de hemácias, ressuspendendo-se as células em tampão de lise (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0,1mM EDTA) e incubando-as por 15min, a 4°C. Após nova centrifugação (1600rpm, 10min, temperatura ambiente) e descarte do sobrenadante, as células foram lavadas com 1X PBS. A seguir, realizou-se nova centrifugação (1600rpm, 10min, temperatura ambiente). Após descarte do sobrenadante, o *pellet* foi disrompido e ressuspensão em 1ml de 1X PBS para contagem de células na câmara de Neubauer. Para tanto, se diluiu 50X a suspensão celular em solução 1V 1X PBS/1V azul de trypan, para análise da viabilidade celular. Após a contagem, cerca de 5x10⁴ células foram utilizadas para confecção de lâminas por citospin. O restante das células foi ressuspensão em reagente TRIzol. As células obtidas foram utilizados para análise da expressão de *JUNB* por qRT-PCR.

D) Células CD34+ de sangue periférico

Células CD34+ foram obtidas por separação imunomagnética duplo-positiva a partir de células mononucleares, utilizando-se para tanto o *CD34 MicroBead Kit* (Miltenyi Biotec, Paris, France), conforme protocolo fornecido pelo fabricante, sendo todo o procedimento realizado em fluxo estéril.

Bolsas de sangria de pacientes com PV, contendo cerca de 500ml de sangue periférico, foram utilizadas para obtenção de células mononucleares, segundo protocolo da unidade 790 do *Institut national de la santé et de la recherche médicale* (U790 INSERM), localizado no *Institut Gustav Roussy* (IGR), França. As bolsas foram vertidas em béquer (1l), em ambiente estéril. Adicionou-se igual volume de solução 2% dextran (peso molecular ~500 Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) em 0,9% NaCl, homogeneizou-se e incubou-se a mistura por 45min. Após este tempo observou-se precipitação das hemácias, e o sobrenadante, contendo células mononucleares, granulócitos e plaquetas, foi recuperado em tubos falcon (50ml). Centrifugou-se (1600rpm, 10min, temperatura ambiente) e descartou-se o sobrenadante, sendo os *pellets* combinados em 15ml de 1X PBS/0,1% EDTA. De outro modo, amostras de 30-40ml de sangue periférico de pacientes com MF ou de pacientes que realizaram citaférese (controles), ricas em CD34+, foram utilizadas. As amostras foram diluídas em 1X PBS/0,1% EDTA.

Em ambos os casos, a suspensão celular foi submetida ao procedimento de separação de células mononucleares utilizando-se o reagente Ficoll-Paque[®] (Amersham Pharmacia Biotech, France) e submetido à centrifugação (1800rpm, 30min, temperatura ambiente, rotor swing, sem freio). As células mononucleares, observadas na interfase Ficoll/plasma foram transferidas para novo tubo falcon. Completou-se o volume para 50ml com 1X PBS/0,1% EDTA e centrifugou-se (900rpm, 10min, temperatura ambiente, rotor swing, sem freio) para retirada de plaquetas. Após descarte do sobrenadante, o *pellet* foi disrompido e ressuspenso em 5-10ml de tampão para contagem de células na câmara de Neubauer, conforme descrito. Completou-se o volume para 10ml com tampão 1X PBS/0,1% EDTA, centrifugou-se (1200rpm, 10min, temperatura ambiente, rotor swing, sem freio), descartou-se o sobrenadante e disrompeu-se o *pellet*.

A 1×10^8 células mononucleares, ressuspensas em 300 μ l de 1X PBS/0,1% EDTA, foram adicionados 100 μ l de *FCR Blocking Reagent* e 100 μ l de *Monoclonal mouse anti-human CD34 antibody QBEND/10-conjugated Microbeads*. Após 30min de incubação ou incubação de 16h em 30% soro fetal bovino (SFB) (Stem Cell Technologies, Meylan, France) a 4°C, completou-se o volume para 10ml com tampão 1X PBS/0,1% EDTA, centrifugou-se (1200rpm, 10min, temperatura ambiente, rotor swing, sem freio), descartou-se o sobrenadante e disrompeu-se o *pellet*. As células foram ressuspensas em 500 μ l de 1X PBS/0,1% EDTA, filtradas para evitar que agregados entupissem as colunas e aplicadas em separador magnético AutoMACS[®] (Miltenyi Biotec).

Os tubos falcons contendo as frações positivas e negativas foram centrifugados (1200rpm, 10min, temperatura ambiente, rotor swing, sem freio). O sobrenadante foi descartado e o *pellet*, disrompido e ressuspenso em 1ml de tampão para contagem de células na câmara de Neubauer, conforme descrito.

As células obtidas foram utilizados para análise da expressão de *JUNB* por qRT-PCR e para cultura *in vitro* de eritroblastos.

E) Cultura líquida de eritroblastos *in vitro*

Eritroblastos foram cultivados *in vitro*, em sistema líquido, a partir de células CD34+, conforme protocolo da U790 INSERM (Ugo V et al., 2004), França, sendo todo o procedimento realizado em fluxo estéril.

Cerca de $3-5 \times 10^5$ células CD34+ foram cultivadas em meio sem soro eritróide (MSSe). Para preparação deste meio, utilizaram-se os seguintes constituintes: *Iscove's Modified Dulbecco Medium* (IMDM) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), penicilina/estreptomicina (PS) (Sigma), L-glutamina (G) (Sigma), α -thioglicerol (Sigma), *bovine serum albumin* (BSA) (Sigma), bicarbonato de sódio (Sigma), lipídeos (Sigma) e transferrina humana saturada em ferro (Sigma).

Primeiramente preparou-se um meio básico (IMDM/ α -thioglicerol/PSG): 500ml de IMDM + 330 μ l de 1% α -thioglicerol + 5ml de PS + 5ml de G. Preparou-se também BSA/bicarbonato de sódio: 10ml de 10% BSA + 500 μ l de 7,5% bicarbonato de sódio e a mistura de lipídeos: 78mg de colesterol, 62mg de ácido oleico, 74mg de 3L- α -fosfatidilcolina dipalmitol foram dissolvidos em 4ml de 100% etanol, por 3-4h, a 56°C. Evaporou-se o álcool sob gás nitrogênio para obtenção de um filme branco e seco, que foi dissolvido em 90ml de IMDM + 10ml de 10% BSA. A mistura foi então sonicada por cerca de 3h, filtrada sob filtro 0,22 μ m e conservada a 4°C sob abrigo da luz. Preparou-se ainda a transferrina saturada em ferro: 100mg de apo-transferrina em 1,1ml de IMDM/ α -thioglicerol/PSG + 0,3ml de FeCl₃ (64mg de FeCl₃.6H₂O em 30ml de H₂O + 30 μ l de 1N HCl), foi filtrada em filtro 0,22 μ m, aliqüotada em 520 μ l e estocada a -20°C. Na hora do uso, adicionaram-se 11,6ml de IMDM/ α -thioglicerol/PSG.

Para 50 ml de MSSe, misturaram-se: 36,5ml de IMDM/ α -thioglicerol/PSG + 7,5ml de BSA/bicarbonato de sódio + 1ml de mistura de lipídeos + 5ml de transferrina saturada em ferro. O meio MSSe foi suplementado com 10% (dias 0 a 7 de cultura) ou 30% (dias 7 a 13 de cultura) SFB (Stem Cell Technologies). Ainda, adicionaram-se citocinas para estimular a diferenciação eritróide: 50ng de SCF/ml (Immunex, Seattle, WA), 50U de IL3/ml (Novartis, Basel, Switzerland), 1U de EPO/ml (Orthobiotech, Paris, France). As células foram cultivadas numa concentração de 1X10⁵ células/ml entre os dias 0 e 7 e 4-5X10⁵ células/ml entre os dias 7 e 13 em garrafas plásticas apropriadas, incubadas em estufa estéril a 37°C, 5% CO₂. Nos dias 7, 10 e 13 de cultura, após contagem em câmara de Neubauer, coletaram-se 1X10⁵ células para confecção de lâminas por citospin e 1X10⁵ células para análise por citometria de fluxo. Além disso, as células eritróides foram utilizadas em cinéticas de resposta à EPO e em experimentos de inibição de *JUNB*.

F) Confecção de lâminas

Para confecção de lâminas foram utilizadas 5X10⁴ células, ressuspensas em 200 μ l de 1X PBS. As amostras foram aplicadas em suporte plástico adequado encaixado sobre a lâmina, e centrifugadas em centrífuga citospin (400g, 5min, temperatura ambiente)

para fixação. A seguir, as lâminas foram coradas com eosina/azul de metileno (Merck, Rio de Janeiro) ou May-Grunwald-Giemsa.

G) Citometria de fluxo

A 5×10^4 células, coletadas nos dias 07, 10 ou 13 da cultura de eritroblastos e ressuspensas em 100µl de 1X PBS, adicionaram-se 3µl de anticorpo anti-receptor de glicoforina A, conjugado ao fluoróforo *phycoerythrin* (PE) (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), e 3µl de anticorpo anti-CD36, conjugado ao fluoróforo *fluorescein* (FITC) (Becton Dickinson), para se verificar a aquisição desses marcadores eritróides ao longo da diferenciação. Como controle negativo, realizou-se o procedimento com anticorpos negativos anti-*mouse* IgG1, conjugado a PE ou a FITC (Becton Dickinson). As amostras foram incubadas por 30min, a 4°C e, a seguir, adicionaram-se 500µl de 1X PBS e centrifugou-se (1200rpm, 5min, temperatura ambiente). Ressuspenderam-se as células em 500µl de 1X PBS. Para análise, cerca 5000 eventos foram adquiridos em citômetro FACSsort® (Becton Dickinson).

3.4- Linhagens celulares

A) HEL

Células da linhagem eritroleucêmica HEL foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Invitrogen, Life Technologies, USA), suplementado com 10% SFB (Invitrogen). A 1l RPMI-10% SFB, adicionaram-se também 3,7g de bicarbonato de sódio, 0,062g de penicilina, 0,1g de estreptomicina e 1ml de Fungizone (todos Invitrogen). O pH do meio foi ajustado para 7,0. O cultivo das células foi feito em garrafas apropriadas, na concentração de 2×10^5 células/ml, a 37°C, 5% CO₂, em atmosfera úmida. As células foram utilizadas para padronização da metodologia de análise da mutação *JAK2* V617F.

B) K562

Células da linhagem K562 foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Invitrogen), suplementado com 10% SFB (Invitrogen). A 11 DMEM-10% SFB, adicionaram-se também 2,0g de bicarbonato de sódio, 0,062g de penicilina, 0,1g de estreptomicina e 1ml de Fungizone (todos Invitrogen). O pH do meio foi ajustado para 7,0. O cultivo das células foi feito em garrafas apropriadas, na concentração de 2×10^5 células/ml, a 37°C, 5% CO₂, em atmosfera úmida. As células foram utilizadas para padronização da metodologia de análise da mutação *JAK2 V617F*.

C) Ba/F3-REPO

Células da linhagem murina Ba/F3 expressando o receptor para eritropoetina (Ba/F3 -REPO) parentais, superexpressando *JAK2 WT* ou *JAK2 V617F* (James C et al., 2005) foram cultivadas em meio RPMI (Invitrogen, Cergy Pontoise, França), suplementado com 10% SFB (Stem Cell Technologies), adicionando-se 1U de EPO/ml. O cultivo das células foi feito em garrafas apropriadas, na concentração de 4×10^5 células/ml, a 37°C, 5% CO₂, em atmosfera úmida. As células obtidas foram utilizados em cinéticas de resposta à EPO e inibição de vias de sinalização.

3.5- Cinéticas, inibições, interferência e ensaios de crescimento

A) Cinética de resposta à EPO

Para deprivação, células Ba/F3-REPO parentais, superexpressando *JAK2 WT* ou *JAK2 V617F* e células eritróides derivadas de pacientes foram lavadas com 50ml de meio RPMI (células Ba/F3-REPO) ou 1X PBS (células eritróides), centrifugadas (1200rpm, 10min, temperatura ambiente) e o sobrenadante, descartado. Este procedimento foi repetido mais duas vezes e, a seguir, as células foram ressuspensas em meio sem citocinas (RPMI para células Ba/F3-REPO ou IMDM/10% transferrina saturada em ferro para células eritróides) na concentração de 1×10^6 células/ml, por 6h (células Ba/F3-REPO) ou

4h (células eritróides), a 37°C, 5% CO₂, em atmosfera úmida. Para restimulação, adicionaram-se às células em deprivação 10U de EPO/ml e estas foram mantidas por 5min, 15min, 30min, 1h, 3h e 6h (células Ba/F3-REPO) ou 3h (células eritróides) a 37°C, 5% CO₂, em atmosfera úmida. Em cada ponto, foram coletadas 1,5X10⁶ células para preparação de RNA e 1,5X10⁶, para extração de proteínas. As células foram centrifugadas (1200rpm, 5min, temperatura ambiente) e o meio de cultura, descartado. Foram então lavadas com 1X PBS, centrifugadas novamente (1200rpm, 5min, temperatura ambiente), o tampão, descartado e o *pellet* seco foi mantido a -80°C. As células obtidas foram utilizadas para análise da expressão de *JUNB* por qRT-PCR e por *Western Blot*.

B) Inibidores bioquímicos

Para os experimentos de inibição de vias de sinalização, células Ba/F3-REPO expressando *JAK2 V617F* foram mantidas durante 6h em meio RMPI sem citocinas na presença de 0, 10, 25, 50, 75 ou 100µM AG490 (inibidor de JAK2); 0, 5, 10 ou 25µM LY294002 (inibidor de PI3K) ou 0, 5 ou 10µM PD98059 (inibidor de MEK) (todos de VWR, Fontenay-sous-bois, França). Em cada ponto, foram coletadas 1,5X10⁶ para extração de proteínas. As células foram centrifugadas (1200rpm, 5min, temperatura ambiente) e o meio de cultura, descartado. Foram então lavadas com 1X PBS, centrifugadas novamente (1200rpm, 5min, temperatura ambiente), o tampão, descartado e o *pellet* seco foi mantido a -80°C. As células obtidas foram utilizadas para análise da expressão de JunB por *Western Blot*.

C) Construção de shRNAs, produção de lentivírus e infecção celular

C.1 - Construção de shRNAs

Para bloquear a expressão de *JUNB*, utilizaram-se *short hairpins* RNAs (shRNA) mediados por lentivírus, como descrito (Berthebaud M et al., 2005). Oligonucleotídeos para sh*JUNB* (sh*JUNB*2F: 5' GATCCCCCAGACTACAAACTCCTGAAATTCAAGAGATT

TCAGGAGTTTGTAGTCGTGTTTTTGGAAA 3' e shJUNB2R: 5' AGCTTTTCCAAA AACAGCACTACAAACTCCTGAAATCTCTTGAATTTTCAGGAGTTTGTAGTCGTGG GG 3'; shJUNB3F: 5' GATCCCCGAAGACCAAGAGCGCATCAAATTCAAGAGATT TGATGCGCTCTTGGTCTTCTTTTTGGAAA 3' e shJUNB3R: 5' AGCTTTTCCAAA AAGAAGACCAAGAGCGCATCAAATCTCTTGAATTTGATGCGCTCTTGGTCTTCG GG 3' - Eurogenotec, Belgium) foram hibridizados: 16µM *primer forward*, 16µM *primer reverse* e tampão de anelamento (100mM acetato de potássio; 30mM HEPES-KOH pH 7,4; 2mM acetato de magnésio), em volume final de 125µl, incubados por 1min, a 95°C, por 15min, a 37°C e por 16h, à temperatura ambiente.

Para clonagem dos oligonucleotídeos dupla-fita em plasmídeo pBlue Script contendo o promotor humano H1 (pH1), foi necessária preparação e digestão prévia deste plasmídeo. Assim, para transformação, adicionou-se 1µg de pH1 em 30µl de suspensão de bactérias DH5α termocompetentes e incubou-se por 30min a 4°C, por 30s, a 42°C e por 2min, a 4°C. Acrescentaram-se 500µl de meio *Super Optimal Catabolite repression* (SOC) (20g de triptonal/l, 5g de extrato de levedura/l, 0,5g de NaCl/l, 2,5mM KCl, 20mM glicose, pH 7,0) e incubou-se a 200rpm, por 1h, a 32°C. Plaqueou-se a suspensão em meio *Lysogeny Broth* (LB) (10g de triptonal/l, 5g de extrato de levedura/l, 10g de NaCl/l, pH 7,0)/2% ágar e incubou-se por 16h, a 32°C. Uma colônia foi isolada e amplificada em 150ml de LB/100mM ampicilina, a 200rpm, por 16h, a 32°C.

Realizou-se maxipreparação do plasmídeo, utilizando-se *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* (Qiagen, Courtaboeuf Cedex, França). Primeiramente, centrifugou-se a cultura de bactérias (6000g, 15min, 4°C) e descartou-se o sobrenadante, ressuspendendo-se o *pellet* em 10ml de tampão P1 (50mM Tris-Cl, pH 8,0, 10mM EDTA, 100µg/ml RNase A). Adicionaram-se, a seguir, 10ml de tampão P2 (200mM NaOH, 1% SDS (p/v)), homogeneizou-se e incubou-se a mistura por 5min, à temperatura ambiente. Acrescentaram-se 10 ml de tampão P3 gelado (3M acetato de potássio, pH 5,5), homogeneizou-se e incubou-se a mistura por 20min, a 4°C. Centrifugou-se (20000g, 30min, 4°C) e transferiu-se o sobrenadante para coluna Qiagen-tip 500, previamente equilibrada com 10ml de tampão QTB (750mM NaCl, 50mM MOPS, pH 7,0, 15% isopropanol (v/v), 0,15% Triton® X-100 (v/v)). Lavou-se a coluna duas vezes com 30ml de tampão QC

(1M NaCl, 50mM MOPS, pH 7,0, 15% isopropanol (v/v)) e elui-se o DNA com 15ml de tampão QF (1,25M NaCl, 50mM Tris-Cl, pH 8,5, 15% isopropanol (v/v)). O DNA foi precipitado com 10,5ml de isopropanol, por centrifugação (15000g, 30min, 4°C), e lavado com 5ml de 70% etanol, seguindo-se nova centrifugação (15000g, 10min, 4°C). Após descarte do sobrenadante e secagem, o *pellet* de DNA foi ressuspensão em 50µl de tampão TE (10mM Tris-Cl, pH 8,0, 1mM EDTA).

Para verificação do plasmídeo pH1, realizaram-se digestões simples com as enzimas *Bgl* II (New England Biolabs Inc., Saint-Quentin Fallavier, França) (1ug de pH1, 1X tampão 2, 20U de *Bgl* II, em volume final de 40µl) e *Hind* III (New England Biolabs Inc.) (1ug de pH1, 1X tampão 2, 60U de *Hind* III, em volume final de 40µl) e dupla (1ug de pH1, 1X tampão 2, 20U de *Bgl* II, 60U de *Hind* III, em volume final de 40µl), por 4h, a 37°C. Após eletroforese em gel 1% agarose, foram observados tamanhos corretos para os plasmídeos linearizados e digerido. Realizou-se, então, dupla digestão de 8µg de pH1 e, após eletroforese em gel 1% agarose, o fragmento de 3,5kb foi excisado do gel, sob luz ultravioleta. O plasmídeo digerido foi recuperado do gel por meio do *S.N.A.P.*TM *Gel Purification Kit* (Invitrogen, Cergy Pontoise, França). O fragmento de gel foi pesado e adicionou-se 2,5V (assumindo que 1mg equivale a 1µl) de solução de iodeto de sódio (6,6M iodeto de sódio, 16mM sulfito de sódio). Misturou-se por inversão e incubou-se por 15min, a 50°C, invertendo-se a cada 3min, até que a agarose estivesse completamente dissolvida. A seguir, adicionaram-se 1,5V de *Binding Buffer* (7M Guanidinium HCl), transferiu-se a mistura para coluna *S.N.A.P.*TM (*0,45-micron cellulose acetate microcentrifuge spin columns*), previamente acoplada a tubo coletor e centrifugou-se (3000g, 30s, temperatura ambiente). O conteúdo do tubo coletor foi descartado, a coluna foi lavada com 400µl de 1X *Final Wash Buffer* (100mM NaCl, 80% etanol) e centrifugou-se (3000g, 30s, temperatura ambiente). O conteúdo do tubo coletor foi descartado e centrifugou-se (10000g, 1min, temperatura ambiente), para secagem completa da coluna. Para eluição do DNA, a coluna foi transferida para novo tubo, adicionaram-se 40µl de água estéril, incubou-se por 1min, à temperatura ambiente, e centrifugou-se (10000g, 1min, temperatura ambiente).

Finalmente, a reação de ligação dos oligonucleotídeos dupla-fita ao plasmídeo consistiu em 2µl de pH1 digerido e purificado, 14µl de oligonucleotídeos hibridizados, 1X tampão T4 ligase e 800U de T4 ligase (New England Biolabs Inc.), em volume final de 20µl, incubados por 16h, a 16°C. A seguir, 5µl desta ligação foram transformados em bactérias eletrocompetentes, conforme protocolo descrito. Tendo sido obtidas colônias resistentes à ampicilina, foi necessária a confirmação da seqüência inserida. As colônias foram coletadas da placa LB/2% ágar, amplificadas em 50µl de LB/100mM ampicilina a 180rpm, por 2h, a 37°C, e submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR). A reação realizada foi: 1X tampão *Taq* polimerase, 2mM MgCl₂, 660µM dNTP's, 1mM *primer T3*, 1mM *primer T7*, 0,5U de *Taq* polimerase e como molde, 5µl de suspensão de bactérias, em volume final de 30µl. O programa foi iniciado por 1min/96°C, seguindo-se 25 ciclos: 30s/96°C – 30s/50°C – 1min/72°C. Após eletroforese em gel 2% agarose, identificaram-se colônias em que houve amplificação de fragmento do tamanho esperado. Realizou-se, então, a purificação das PCRs: a 25µl de amostra adicionaram-se 25µl de água destilada e transferiu-se a mistura para *PCR Cleanup Filter Plate* (Millipore, St. Quentin en Yvelines, França). Após filtração a vácuo, o DNA permaneceu ligado à membrana e foi ressuspenso em 15µl de água destilada, sob leve agitação, por 20min. Transferiu-se então esta suspensão para novo tubo. Para seqüenciamento, foi utilizado o *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Courtaboeuf Cedex, França). A reação realizada foi: 5µl de produto de PCR purificado, 3,2pmol *primer T3* ou *T7*, 2X *BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix*, 0,5X *Sequencing Buffer*, em volume final de 20µl. O programa foi iniciado por 1min/96°C, seguindo-se 25 ciclos: 10s/96°C – 5s/50°C – 4min/60°C. Para purificação da reação, adicionaram-se 20µl de *Injection Solution (Montage SEQ96 KIT*, Millipore) e transferiu-se a mistura para *Sequencing reaction Cleanup Filter Plate* (Millipore). Após filtração a vácuo, repetiu-se este procedimento. Após nova filtração, o DNA foi ressuspenso em 25µl de *Injection Solution*, sob leve agitação, por 20min. Transferiu-se então esta suspensão para placa adequada ao seqüenciador *ABI Prism 310 DNA Analyser* (Applied Biosystems), onde as seqüências foram analisadas.

Após verificação da seqüência, a unidade H1-sh*JUNB* foi retirada do plasmídeo pH1 e inserida em vetor lentiviral derivado de HIV (pRRL sin PGK eGFP WPRE; Généthon, Evry, France), por meio de digestão com a enzima *Xho* I (New England Biolabs Inc.). Para isso, amplificaram-se as colônias portadoras de pH1-sh*JUNB* e colônia portadora do vetor pRRL, e realizou-se a maxipreparação de plasmídeos, conforme descrito. As reações de digestão realizadas foram: 10µg de pH1-sh*JUNB*, 1X tampão 2, 1X BSA e 100U de *Xho* I, em um volume final de 70µl, e 4ug de pRRL, 1X tampão 2, 1X BSA e 40U de *Xho* I, em um volume final de 50µl, por 3h, a 37°C. O vetor pRRL digerido foi ainda incubado por 10min, a 75°C, por 15min, a 37°C e tratado com 20U de *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIAP) (New England Biolabs Inc.), para fosfatação das extremidades, por 30min, a 37°C. Os produtos das reações foram então aplicados em gel 2% agarose e após eletroforese, foram excisados e purificados do gel, conforme descrito acima, sendo ressuspensos em 35µl de tampão. A seguir, a reação de ligação realizada foi: 1µl de pRRL digerido e purificado, 14µl da unidade H1-sh*JUNB* purificada, 1X tampão T4 ligase e 400U de T4 ligase, em volume final de 20µl, incubados por 16h, a 16°C. Para transformação, 5µl da ligação foram misturados a 100µl de suspensão de bactérias XL10, previamente tratadas com 4µl de β-mercapto, por 10min, a 4°C e a incubação foi realizada como descrito acima. Após plaqueamento e obtenção de colônias resistentes à ampicilina, verificou-se a seqüência inserida, por PCR e seqüenciamento (utilizando-se *primers* pRRL *forward* e/ou *reverse*), conforme descrito.

C.2 - Produção de lentivírus

Partículas lentivirais foram produzidas transfectando-se células 293T com três plasmídeos diferentes pCMV (plasmídeo de empacotamento), pMD2G (codificante da proteína de envelope viral VSV-G) e pRRL, contendo a seqüência sh*JUNB* ou SCR (seqüência aleatória, usada como controle), previamente amplificados e preparados, em presença de lipofectamina 2000 (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Para tanto, cultivaram-se 5×10^5 células 293T em garrafas de 75cm², em 5ml de meio DMEM/10% SFB/PS/100mM G418, a 32°C, 5% CO₂, em atmosfera úmida. Após 4 dias, o meio foi substituído por 11ml de DMEM/10% SFB, sem antibióticos, e incubou-se por 1h, a 32°C. Prepararam-se as soluções A: 36µl de lipofectamina + 600µl de meio Optimum

(Invitrogen) incubados por 5min, à temperatura ambiente e B: 24 μ g de DNA (11,6 μ g de pCMV + 5,8 μ g de pMD2G + 6,7 μ g de pRRL) + 600 μ l de meio Optimem. Misturaram-se a seguir as duas soluções, incubando-se por 15min, à temperatura ambiente, e transferiu-se a mistura para a garrafa de cultura com as células. Após 2 dias, o meio foi substituído por 17ml de DMEM/10% SFB/PS. Após mais 1 dia, recolheu-se o meio da garrafa e adicionaram-se novos 17ml de DMEM/10% SFB/PS. O meio de cultura recolhido de cada duas garrafas foi combinado (34ml) e submetido à ultracentrifugação (20000rpm, 2h, 12°C) em tubos apropriados, para obtenção de partículas virais. Lavou-se ainda duas vezes o tubo com 34ml de DMEM e centrifugou-se (20000rpm, 2h, 12°C). As partículas virais obtidas foram incubadas em 100 μ l de DMEM/10% SFB, sob leve agitação, por 1-3 dias, a 4°C. Seguindo-se este protocolo, sobrenadantes virais foram obtidos também no segundo e terceiro dias de cultura. Estoques virais foram armazenados a -80°C.

C.3 - Infecção de células eritróides

1000 progenitores eritróides, cultivados como descrito por quatro dias, foram incubados na presença de 10 μ l de sobrenadante viral, por 24h. No dia seguinte (dia 5), as células foram lavadas com 1ml 1X PBS e centrifugadas (1200rpm, 10min, temperatura ambiente). Após marcação com anticorpos específicos (Immunotech, Marseille-Lumigny, França), conforme o protocolo descrito no item Citometria de fluxo, células GFP⁺/CD34⁺/CD36⁺ e GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻ foram separadas em citômetro de fluxo FACSDiva (Becton Dickinson). Estas células foram utilizadas em ensaios de proliferação em meio líquido e semi-sólido.

D) Ensaio de proliferação em meio líquido

18000 células GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻ foram cultivadas por nove dias no sistema de cultura líquida eritróide descrito. Após 2, 5, 7 e 9 dias de cultivo, foi feita contagem das células em câmara de Neubauer, após exclusão por Trypan blue.

E) Ensaio de formação de colônias eritróides

1000 células GFP⁺/CD34⁺/CD36⁺ ou 1000 células GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻ foram plantadas em duplicata em 1ml de meio semi-sólido metilcelulose H4100 Medium (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada), suplementado com 10% SFB, 25ng de SCF/ml e 3U de EPO/ml, como descrito (Garcon L et al., 2006). Adicionalmente, para pacientes *JAK2* V617-positivos, 5000 células GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻ foram plantadas, também em duplicata, em 1ml de metilcelulose, suplementada com 10% SFB, 25ng de SCF/ml, na ausência de EPO. Após 14 dias, o número de colônias eritróides foi contado. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. Para determinação do status de *JAK2* em cada colônia, estas foram retiradas da metilcelulose, com auxílio de microscópio óptico, e transferidas para placas de 96 poços, contendo 100µl de 1X PBS/poço, a 4°C. A placa foi então centrifugada (1200rpm, 10min, 4°C), e as colônias foram lisadas em 50µl de tampão de lise (0,5µl de Tween 20, 370µg de proteinase K (Invitrogen)/ml, em 50µl de volume final), por 1h, a 65°C e 15min, a 95°C. 5µl desta suspensão foram utilizados em qRT-PCR, conforme descrito adiante.

3.6- Extração de ácidos nucléicos

A) Extração de DNA

A.1 - Reagente TRIzol

Após a adição de reagente TRIzol às células e separação da fração aquosa contendo RNA (ver preparação de RNA – reagente TRIzol), a fração orgânica restante foi utilizada para extração de DNA, conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Para tanto, adicionaram-se 300µl de etanol absoluto e as amostras foram misturadas por inversão. Após incubação por 2-3min, à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas (4400rpm, 5min, 4°C) e o sobrenadante, descartado. O DNA precipitado foi lavado com 1ml de 1M citrato de sódio em 10% etanol, incubando-se por 30min, à temperatura ambiente. Após centrifugação, seguiu-se nova lavagem. O DNA foi então lavado com 1,5ml de 75% etanol, incubando-se por 20min à temperatura ambiente. Após centrifugação,

o sobrenadante foi descartado e o DNA, solubilizado em 300-600µl de 8mM NaOH, pH7-8 e estocado a -20°C. Este protocolo foi utilizado quando as amostras foram também submetidas à preparação de RNA.

A.2- GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Biosciences, São Paulo)

Em *ependorff* contendo 900µl de solução de lise de hemácias (10mM KHCO₃, 155mM NH₄Cl, 0,1mM EDTA) adicionaram-se 500µl de sangue periférico, homogeneizando-se. Incubou-se a mistura por 5min, à temperatura ambiente. Centrifugou-se brevemente (12000rpm, 30s, temperatura ambiente) e descartou-se o sobrenadante. A seguir, disrompeu-se o *pellet* de células e adicionaram-se 500µl de solução de extração (solução tamponada contendo agente caotrópico e detergente), agitou-se vigorosamente e incubou-se a mistura por 5min, à temperatura ambiente. Transferiu-se a mistura para colunas MicroSpinTM previamente encaixadas em tubos coletores. Centrifugou-se (8000rpm, 1min, temperatura ambiente) e descartou-se o sobrenadante. Adicionaram-se à coluna 500µl de solução de extração, centrifugou-se (8000rpm, 1min, temperatura ambiente) e descartou-se o sobrenadante. A seguir, lavou-se a coluna com 500µl de solução de lavagem (tampão Tris-EDTA contendo etanol) e centrifugou-se (12000rpm, 3min, temperatura ambiente). Descartou-se o sobrenadante e transferiu-se a coluna para novo tubo coletor. Eluiu-se o DNA adicionando-se à coluna 80µl de água pré-aquecida à 70°C, seguido de incubação por 1min, à temperatura ambiente e centrifugação (8000rpm, 1min, temperatura ambiente). Este protocolo foi utilizado para amostras de sangue periférico de pacientes PV, TE e MF brasileiros que foram analisadas quanto à presença da mutação *JAK2 V617F*.

B) Preparação de RNA

B.1 - Reagente TRIzol

RNA total foi extraído utilizando-se TRIzol, de acordo com as instruções do fabricante. A 5x10⁶ a 1x10⁷ células, adicionou-se 1ml do reagente, com posterior homogeneização. A seguir, a solução foi incubada por 5min, à temperatura ambiente.

Adicionaram-se 200µl de clorofórmio, seguindo-se agitação vigorosa. Outra incubação foi realizada por 5min, à temperatura ambiente, seguida por centrifugação (13500rpm, 15min, 4°C). A fase aquosa foi então transferida para *ependorf* novo, onde foram adicionados 500µl de isopropanol gelado. A amostra foi novamente incubada por 10min, à temperatura ambiente, sendo em seguida centrifugada (13500rpm, 10 min, 4°C). O sobrenadante foi retirado por inversão cuidadosa do tubo e o RNA precipitado foi lavado com 1ml de 75% etanol. Após centrifugação (11500rpm, 5min, 4°C) e descarte do sobrenadante, o RNA foi solubilizado em 10-20µl de H₂O tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

B.2 - Quantificação

A concentração de RNA foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop[®] ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington), por leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 260nm.

B.3 - Visualização

A visualização do RNA foi feita em gel 1,2% agarose contendo formaldeído.

3.7- Análises em dna (detecção da mutação *JAK2* V617F)

A) PCR e digestão com enzima de restrição

Conforme previamente descrito (Baxter EJ et al., 2005), amostras de DNA foram utilizadas em PCR para amplificação do gene *JAK2*. Os produtos obtidos (460pb) foram submetidos à digestão com a enzima *Bsa* XI. O fragmento amplificado a partir do alelo selvagem *JAK2* foi digerido em fragmentos de 241pb, 189pb e 30pb. No entanto, a mutação *JAK2* V617F acarretou perda do sítio reconhecido pela enzima e, portanto, o fragmento permaneceu intacto. A linhagem eritroleucêmica HEL, mas não a linhagem K562, é portadora da mutação *JAK2* V617F, por isso tais linhagens foram usadas para padronização da técnica. Para confirmação da mutação foi feito seqüenciamento automático dos produtos de PCR obtidos.

As amostras de DNA foram utilizadas em PCR para amplificação do gene *JAK2*. A reação realizada foi: 1X tampão *Taq* polimerase, 2mM MgCl₂, 160μM dNTP's, 200μM *primer JAK2F* (5' - GGGTTTCCTCAGAACGTTGA - 3'), 200μM *primer JAK2R* (5' - TCATTGCTTTCCTTTTTCACAA - 3'), 1U de *Taq* polimerase e aproximadamente 50ng de DNA, em volume final de 50μl. O programa foi iniciado por 2min/96°C, seguindo-se 45 ciclos: 30s/96°C – 30s/57°C – 1min/72°C. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel 1% agarose para verificação da amplificação.

Após verificação da amplificação de fragmentos do tamanho esperado, os produtos obtidos foram submetidos à reação de digestão pela enzima de restrição *Bsa* XI (New England BioLabs inc.). A reação feita foi: 5,0μl de produto de PCR, 1X *NE Buffer 4* (50mM acetato de potássio, 20mM Tris-acetato, 10mM acetato de magnésio, 1mM *Dithiothreitol* (DTT), pH7,9) e 1U de *Bsa* XI, em volume final de 15,0μl. A reação ocorreu por 16 horas, a 37°C. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel 2% agarose para verificação da digestão.

Esta técnica foi utilizada para detecção da mutação nos indivíduos estudados por SAGE, nos pacientes incluídos no estudo de expressão de *JUNB* em células hematopoéticas (excluindo células CD34+) e em 49 pacientes com PV, 25 pacientes com MF e 29 pacientes com TE, para levantamento da frequência da mutação em pacientes brasileiros. Estes últimos resultados foram publicados sob forma de artigo e encontram-se em apêndice (Apêndice 1).

B) Seqüenciamento

O seqüenciamento automático das amostras foi realizado por meio do *Dyynamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Amersham - Life Science). Para a reação utilizou-se aproximadamente 15ng do produto de PCR purificado, 330nM *primer* específicos (*JAK2 forward* ou *reverse*) e 4,0μl de *Dyynamic ET Terminator reagent premix*, em volume final de 15,0μl. O programa foi iniciado por 2min/94°C, seguindo-se 35 ciclos: 20s/94°C – 15s/57°C – 1min/72°C.

O produto foi precipitado adicionando-se 2µl de 7,5M acetato de amônio e 50µl de etanol absoluto. Após homogeneização e incubação por 15min, à temperatura ambiente, protegidas da luz, as amostras foram centrifugadas (4000rpm, 30 minutos, 4°C). O sobrenadante foi removido por inversão e a seguir adicionaram-se 100µl de 70% etanol. Posteriormente, o material foi centrifugado (4000rpm, 15 minutos, 4°C) e novamente o sobrenadante foi desprezado por inversão. Para completa remoção do etanol, as amostras foram submetidas à centrifugação invertida (200rpm, 7s, 4°C) e finalmente aquecidas por 5min, a 65°C, para a secagem. O produto da purificação foi então analisado em seqüenciador *MEGA BACE 1000 DNA Analysis System* (Molecular Dynamics/ Amersham - Life Science), segundo as recomendações dos fabricantes. O resultado foi analisado com auxílio do programa *Chromas* (Technelysium Pty Ltd.). Esta técnica foi utilizada para confirmação do genótipo de *JAK2*, analisado por PCR seguida de digestão, nos pacientes estudados por SAGE.

B) Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Os princípios da qRT-PCR encontram-se mais detalhadamente descritos adiante. A genotipagem de *JAK2* e a quantificação dos alelos foram realizadas conforme descrito (James C et al., 2006; Levine RL et al., 2006). Para tanto, realizou-se a seguinte reação: 6,25µl de *qPCR Master Mix Plus* (Eurogentec), 1,157µl de *TaqMan® SNP Genotyping Assay* (contendo os primers *JAK2F*: 5' AAGCTTCTCACAAGCATTTGGTTT 3' e *JAK2R*: 5' AGAAAGGCATTAGAAAGCCTGTAGTT 3' e as sondas fluorescentes competitivas *JAK2WT*; VIC: 5' TCTCCACAGACACATAC 3' e *JAK2V617F*; FAM: 5' TCCACAGAAACATAC 3') e aproximadamente 50ng de DNA (ou 5µl de suspensão de colônias eritróides lisadas), em volume final de 15µl. O programa foi iniciado por 2min, a 50°C e 10min, a 95°C, seguindo-se 40 ciclos de 15s/95°C - 1min/60°C, sendo realizado em aparelho ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

DNA bialélico 100% homozigoto para a mutação foi diluído em diversas proporções em DNA diplóide selvagem para *JAK2* para gerar uma curva padrão *JAK2* V617F/*JAK2* total *versus* delta Ct ($Ct_{JAK2V617F} - Ct_{JAK2WT}$), conforme descrito (Levine RL et al., 2006). Para quantificação dos alelos, as reações foram realizadas em triplicata e o delta Ct médio, comparado à curva padrão, para determinação da proporção *JAK2* V617F/*JAK2* total.

Esta técnica foi utilizada para detecção da mutação em pacientes franceses e para genotipagem de colônias eritróides.

3.8- Análises em rna (quantificação de expressão gênica)

A) *Serial Analysis Of Gene Expression (SAGE)*

Técnica utilizada para análises globais de expressão gênica. O protocolo foi realizado segundo recomendações do fabricante (I-SAGE™ Kit – Invitrogen, Life Technologies). Informações também são disponíveis nos sites www.invitrogen.com; www.sagenet.org; www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE/.

A.1 - Separação do RNA mensageiro (mRNA)

Iniciou-se com a separação do mRNA a partir do RNA total, feita por meio de interação de suas caudas poli-A a oligos dT adaptados a esferas magnéticas. Utilizando-se uma estante magnética, o mRNA ligado às esferas foi atraído para a parede do tubo, sendo o restante da solução descartado.

A.2 - Síntese DNA complementar (cDNA)

Para síntese da primeira fita de cDNA, as esferas foram ressuspensas na seguinte reação: 1X *First Strand Buffer* (50mM Tris-HCl, pH 8,3; 75mM KCl; 3mM MgCl₂), 10mM DTT, 500µM dNTPs, 40U de RNaseOUT RT™ (Invitrogen, Life Technologies, USA) e 600U de Superscript II RT™ (Invitrogen, Life Technologies, USA), em volume final de 90µl. A reação foi realizada por 1h, a 37°C.

Para síntese da segunda fita de cDNA, foi realizada a seguinte reação: 90µl do produto de reação anterior, 1X *Second Strand Buffer* (20mM Tris-HCl, pH 6,9; 90mM KCl; 23mM MgCl₂; 13µM β-NAD⁺; 10mM sulfato de amônia), 200µM dNTPs, 50U de *E. coli* DNA ligase, 200U de *E. coli* DNA polimerase e 10U de *E. coli* RNase H, em volume final de 750µl (Figura 2A). A reação foi realizada por 2h, a 16°C, sendo paralisada com 28,3mM EDTA.

A verificação da síntese de cDNA foi feita por meio de PCR, com a utilização de *primers* para os genes *EF* e *GAPDH* (Figura 2B). A reação realizada foi: 1X *BV Buffer* (33mM sulfato de amônia; 134mM Tris-HCl, pH 8,8; 15,4mM MgCl₂; 20mM β-mercaptoetanol), 3µl de DMSO, 1mM dNTPs, 200ng de *primer sense GAPDH* ou *EF*, 200ng de *primers antisense GAPDH* ou *EF*, 5U de *Taq* polimerase e 0,5µl de amostra de cDNA em volume final de 50µl. O programa foi iniciado por 1min/95°C, seguindo-se 30 ciclos: 30s/95°C – 30s/55°C – 2min/72°C, finalizando com 5min/72°C. Foram geradas amplificações de 350 e 540 pb, respectivamente para os genes *EF* e *GAPDH*, visualizadas em gel 1% agarose (Figura 2C).

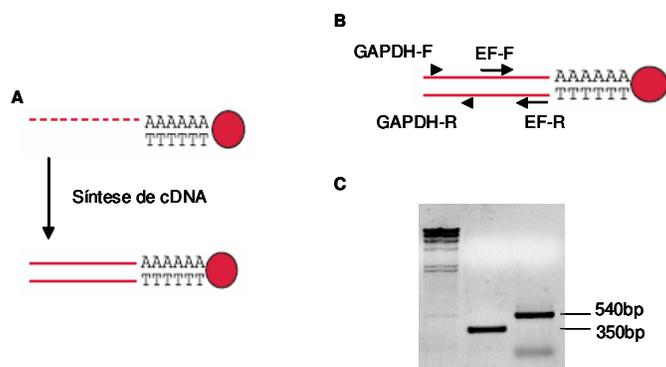


Figura 2- Síntese de DNA complementar (cDNA). A) Representação esquemática do RNA mensageiro com cauda poli-A ligada a esfera magnética e síntese de DNA complementar dupla-fita B) Representação esquemática da reação em cadeia da polimerase para verificação da síntese do cDNA, utilizando *primers* para os genes *EF* e *GAPDH* C) Gel 1% agarose para verificação da síntese do cDNA: 1 - λ-Hind 2 - amplificação de 350bp do gene *EF* 3 - amplificação de 540bp do gene *GAPDH*

A.3 - Digestão com *Nla* III

A digestão do cDNA com enzima *Nla* III, que reconhece a sequência repetitiva CATG, normalizou o tamanho das moléculas de cDNA presentes na amostra. Após a digestão, estas apresentaram cerca de 256 pb e permaneceram ligadas às esferas magnéticas (Figura 3A). Para digestão com *Nla* III, as esferas foram ressuspensas na seguinte reação: 172µl de LoTE (3mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,2mM EDTA, pH 7,5), 1X BSA (100µg/ml), 1X *Buffer* 4 (20mM Tris-acetato, pH 7,9; 10mM acetato de magnésio; 50mM acetato de potássio; 1mM DTT) e 60U de *Nla* III, em volume final de 200µl. A reação foi realizada por 1h, a 37°C.

A digestão com *Nla* III pode ser verificada por PCR (reação idêntica à utilizada para verificação da síntese de cDNA) pela perda do sítio reconhecido pelo *primer* do gene *GAPDH*, mas não do gene *EF* (Figura 3B e 3C).

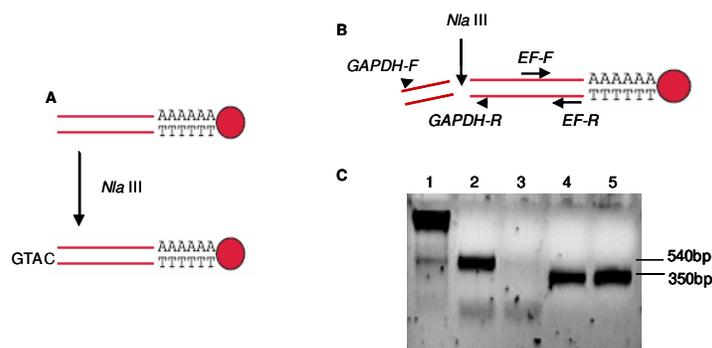


Figura 3- Digestão com *Nla* III. A) Representação esquemática da digestão enzimática do DNA complementar (cDNA) com *Nla* III B) Representação esquemática da reação em cadeia da polimerase para verificação da digestão com *Nla* III, utilizando *primers* para os genes *EF* e *GAPDH* C) Gel 1% agarose para verificação da digestão com *Nla* III: 1 - λ -*Hind* 2 - amplificação de 540bp do gene *GAPDH* em amostra de cDNA não digerida com *Nla* III 3 - após a digestão o sítio reconhecido pelo *primer* do gene *GAPDH* é perdido e por isso não ocorre amplificação 4 - amplificação de 350bp do gene *EF* em amostra de cDNA não digerida com *Nla* III 5 - mesmo após a digestão o sítio reconhecido pelo *primer* do gene *EF* é mantido e por isso ocorre amplificação de 350bp

A.4 - Ligação aos adaptadores

A amostra foi a seguir dividida em duas, para ligação aos adaptadores A ou B, que apresentam extremidades coesivas às geradas no cDNA pela digestão com *Nla* III (Figura 4A). Cada uma das amostras de esferas magnéticas foi ressuspensa na seguinte reação: 14,0µl de LoTE, 60ng de adaptador A ou B, 1X *Ligase Buffer* (6mM Tris-HCl, pH 7,5; 6mM MgCl₂; 5mM NaCl; 100µg/ml BSA; 7mM β-mercaptoetanol; 100µM ATP; 2mM DTT; 1mM *spermidin*) e 10 unidades *Weiss* de T4 DNA ligase, em volume final de 20µl. A reação foi realizada por 2h, a 16°C.

A verificação da ligação do cDNA aos adaptadores foi feita por PCR, utilizando-se os primers *anti-sense EF* e *sense DTP-1*, que reconhece sítio localizado no adaptador A ou *sense DTP-2*, que reconhece sítio localizado no adaptador B (Figura 4B e 4C). A reação realizada foi: 1X *BV Buffer*, 3µl de DMSO, 1mM dNTPs, 200ng de *primer antisense EF* e 350ng de *primer sense DTP-1* ou *DTP-2*, 5U de *Taq* polimerase e 0,5µl de amostra de cDNA, em volume final de 50µl. Foi utilizado o mesmo programa de PCR anteriormente descrito.

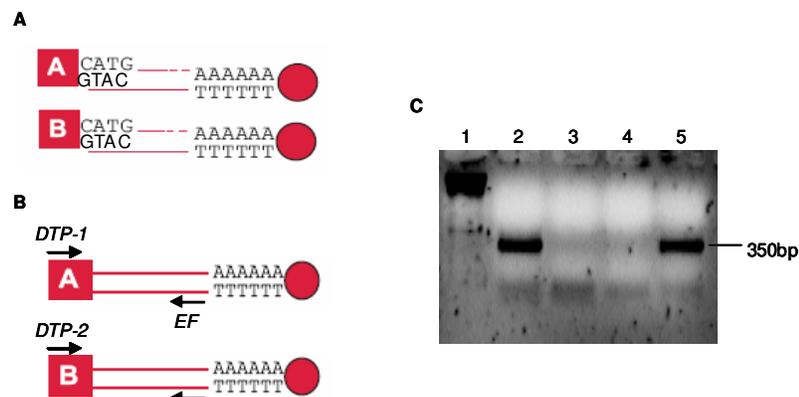


Figura 4- Ligação aos adaptadores. A) Representação esquemática da ligação dos adaptadores A ou B ao DNA complementar (cDNA) B) Representação esquemática da reação em cadeia da polimerase para verificação da ligação dos adaptadores, utilizando *primers antisense EF* e *sense DTP-1* ou *DTP-2* C) Gel 1% agarose para verificação da ligação dos adaptadores: 1- λ -*Hind* 2- amplificação de 350bp utilizando-se os *primers antisense EF* e *sense DTP-1* em amostra de cDNA ligada ao adaptador A 3- utilizando-se os *primers antisense EF* e *sense DTP-1* em amostra de cDNA ligada ao adaptador B não ocorre amplificação 4- utilizando-se os *primers antisense EF* e *sense DTP-2* em amostra de cDNA ligada ao adaptador A não ocorre amplificação 5- amplificação de 350bp utilizando-se os *primers antisense EF* e *sense DTP-2* em amostra de cDNA ligada ao adaptador B

A.5 - Formação de *tags* - digestão com *BsmF I*

As duas amostras de cDNA, ligadas aos adaptadores A ou B, foram digeridas com a enzima *BsmF I*. Esta enzima reconhece sítio localizado nos adaptadores e digeriu a fita de cDNA em região distante de 10 a 14 pares de bases do sítio de reconhecimento. Assim, foram obtidos fragmentos de 10-14pb específicos para cada molécula de cDNA, denominados *tags*, ligados ao adaptador A ou adaptador B (Figura 5A). Para tanto, as esferas ligadas ao adaptador A ou B foram ressuspensas na seguinte reação: 174µl de LoTE, 1X *Buffer 4*, 2X BSA e 4U de *BsmF I*, em volume final de 200µl. A reação foi realizada por 1h, a 65°C. Neste ponto, as esferas magnéticas foram descartadas e os sobrenadantes, contendo as *tags* ligadas a adaptadores, foram recuperados. Para purificação, adicionou-se aos sobrenadantes um volume igual de fenol-clorofórmio. Após centrifugação (14000rpm, 2min, temperatura ambiente), a fase aquosa foi transferida para *ependorf* novo. Para precipitação do cDNA, adicionaram-se 2/3 volumes de 7,5M acetato de amônio, 5µl de glicogênio e 1ml de etanol absoluto, a amostra foi incubada por 20min em banho de gelo seco com etanol, seguido de centrifugação (14000rpm, 40min, 4°C). Após duas lavagens com 75% etanol, o cDNA precipitado foi ressuspenso em 10µl de LoTE.

A verificação da digestão com *BsmF I* pode ser feita por PCR (reação idêntica à utilizada para verificação da ligação dos adaptadores), pela perda do sítio reconhecido pelo *primer* do *EF* (Figura 5B e 5C).

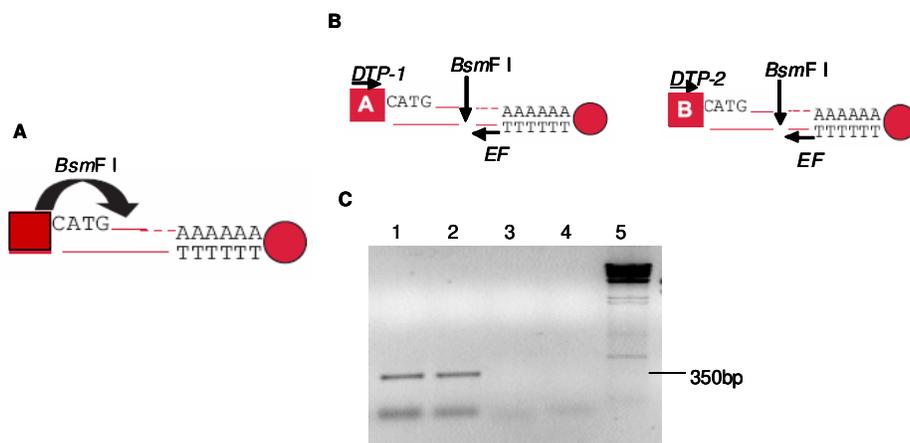


Figura 5- Formação de tags - digestão com *BsmF I*. A) Representação esquemática da digestão do DNA complementar (cDNA) ligado aos adaptadores com a enzima *BsmF I* B) Representação esquemática da reação em cadeia da polimerase para verificação da digestão do cDNA, utilizando *primers antisense EF* e *sense DTP-1* ou *DTP-2* C) Gel 1% agarose para a verificação da digestão: 1 - amplificação de 350bp utilizando-se os *primers antisense EF* e *sense DTP-1* em amostra de cDNA ligada ao adaptador A, antes da digestão 2 - amplificação de 350bp utilizando-se os *primers antisense EF* e *sense DTP-2* em amostra de cDNA ligada ao adaptador B, antes da digestão 3 - após a digestão, utilizando-se os *primers antisense EF* e *sense DTP-1* em amostra de cDNA ligada ao adaptador A não ocorre amplificação 4 - após a digestão, utilizando-se os *primers antisense EF* e *sense DTP-2* em amostra de cDNA ligada ao adaptador B não ocorre amplificação 5 - λ -*Hind*

A.6 - Formação de ditags

As extremidades deixadas pela digestão com *BsmF I* foram preenchidas por ação da enzima *Klenow* polimerase (Figura 6) na seguinte reação: 10 μ l da amostra de cDNA ligada a adaptador A ou B, 1X *Klenow Buffer* (50mM Tris-HCl, pH 8,0; 10mM MgCl₂; 50mM NaCl), 0,5X BSA, 500 μ M dNTPs e 3–9U de *Klenow* polimerase, em volume final de 50 μ l, realizada por 30min, a 37°C.

A seguir, as alíquotas contendo as *tags* ligadas a adaptadores A e ligadas a adaptadores B foram combinadas. Após purificação e precipitação, apenas 2/3 da amostra foram utilizados para formar a chamada *ditag*, por ação da enzima T4 DNA ligase (Figura 6). Para tanto, 1,5 μ l do seguinte *mix* de reação foi adicionado: 1mM Tris-HCl, pH

7,5, 2X *Ligase Buffer* e 4,0 unidades *Weiss* de T4 DNA ligase, em 3,75µl de volume final. Como controle negativo da ligação, 1/3 de amostra restante foi adicionado a 1,5µl do *mix*: 600µM Tris-HCl, pH 7,5 e 2X *Ligase Buffer*, em 3,75µl de volume final. A reação foi realizada por 16h, a 16°C.

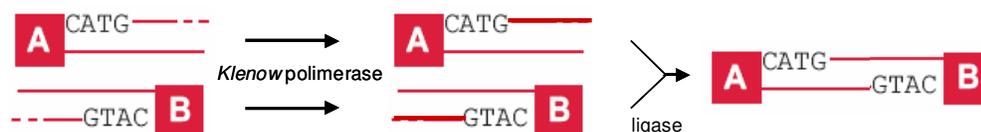


Figura 6- Formação de ditags. Representação esquemática da reação de preenchimento de extremidades com a enzima *Klenow* polimerase e posterior ligação das *tags* para formar *ditags*

As *ditags* obtidas na reação de ligação foram submetidas à amplificação por PCR em larga escala (Figura 7A). Para isto, verificou-se anteriormente qual diluição de amostra seria adequada para ser utilizada como molde, tendo como padrão a amplificação do controle positivo I-SAGE. As reações realizadas foram: 1X *BV Buffer*, 3µl de DMSO, 1,5mM dNTPs, 350ng de *primer DTP-1*, 350ng de *DTP-2*, 2,5U *Platinum® Taq* polimerase e 1µl das *ditags* nas diluições 1:50 ou 1:100 ou 1:200, ou 1µl do controle positivo I-SAGE, ou 1µl do controle negativo de ligação, ou 1µl de água DEPC (controle negativo da PCR), em volume final de 50µl. Os produtos foram aplicados em gel 12% poliacrilamida (Figura 7B). A diluição adequada encontrada foi aquela cujo produto amplificado mais se aproximou em intensidade ao controle positivo I-SAGE. O programa foi iniciado por 2min/95°C, seguindo-se 27 ciclos: 30s/95°C – 1min/55°C – 1min/70°C, finalizando com 5min/70°C.

Após amplificação das *ditags* por PCR em larga escala (300 reações), os produtos foram purificados utilizando-se fenol-clorofórmio seguido de precipitação com 7,5M acetato de amônio, glicogênio e etanol absoluto. Ressuspensos em LoTE, tais produtos foram aplicados em gel 12% poliacrilamida e submetidos à eletroforese. O fragmento de 100pb, correspondente a *ditag* ladeada pelos adaptadores A e B, foi isolado

do gel (Figura 7C). A seguir, foi eluído em solução 5V LoTE, 1V 7,5M acetato de amônio, purificado em colunas S.N.A.P.TM, seguido de fenol-clorofórmio, sendo ao final precipitado com etanol, 7,5M acetato de amônio e glicogênio e ressuspenso em 126µl de LoTE.

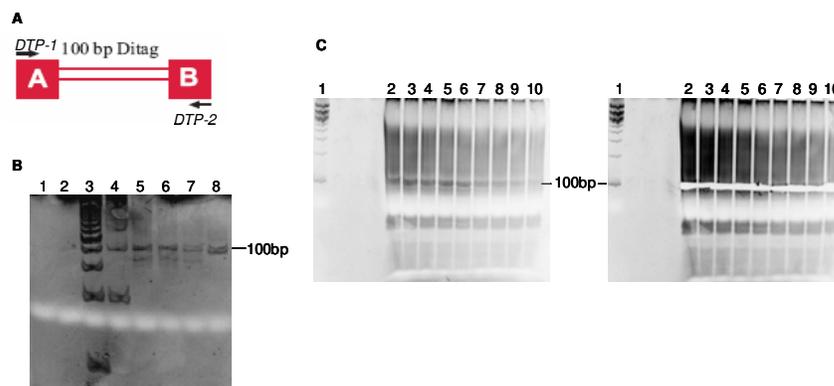


Figura 7- Amplificação e isolamento de *ditags*. A) Representação esquemática da amplificação das *ditags* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) B) Gel 12% poliacrilamida para teste da concentração de *ditags* a ser usada na PCR em larga escala. Como molde foram utilizados: 1 - água DEPC (controle negativo da PCR) 2 - controle negativo da reação de ligação 5 - amostra de *ditags* na diluição 1:50 6 - amostra de *ditags* na diluição 1:100 7 - amostra de *ditags* na diluição 1:200 8 - controle positivo I-SAGE; Como marcadores de peso molecular foram utilizados: 3 - Ladder 25pb 4 - Ladder 50pb C) Géis 12% poliacrilamida: 2 – 10 - produtos da amplificação em larga escala das *ditags* e isolamento do fragmento de 100bp 1 - Ladder 100pb

A.7 - Clivagem dos adaptadores

A enzima *Nla* III foi utilizada para clivagem dos adaptadores, gerando *ditags* de 26pb, ladeadas pela seqüência de reconhecimento desta enzima, CATG (Figura 8A). Para realizar a reação dividiram-se os 126µl de amostra de cDNA (100pb) em 3 alíquotas de 42µl. A reação realizada foi: 42µl de cDNA, 1X *Buffer* 4, 1,3X BSA e 120U de *Nla* III, em volume final de 200µl, por 2h, a 37°C. A seguir, a amostra foi purificada com fenol-clorofórmio e o cDNA, precipitado como descrito anteriormente.

Os produtos da digestão foram aplicados em gel 12% poliacrilamida e submetidos à eletroforese. Puderam ser visualizados fragmentos de 100pb, correspondente a *ditags* não digeridas, 60pb, resultante de digestão parcial, 40 pb, correspondente aos adaptadores, e 26 pb, correspondente às *ditags* clivadas, que foram então isolados (Figura 8B). A eluição, purificação e precipitação de cDNA foram realizadas como descrito anteriormente, sendo a amostra ressuspensa em 7,75µl de LoTE.

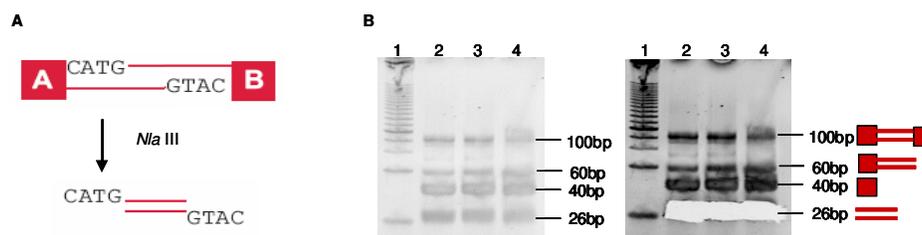


Figura 8- Clivagem dos adaptadores. A) Representação esquemática da digestão das *ditags* com *Nla* III B) Géis 12% poliacrilamida: 1 - *Ladder* 25pb 2 – 4 - fragmentos de 100pb, correspondente a *ditags* não digeridas; 60pb, resultantes de digestão parcial; 40 pb, correspondentes aos adaptadores; e 26 pb, correspondente às *ditags* clivadas, que foram então isolados do gel

A.8 - Formação de concatâmeros

As *ditags* purificadas foram ligadas umas as outras com a enzima T4 DNA ligase para formação de concatâmeros (Figura 9A). A reação realizada foi: 7,75µl de cDNA (26pb), 1X *Ligase Buffer* e 5 unidades *Weiss* de T4 DNA ligase, em volume final de 10µl, sendo a reação realizada por 3h, a 16°C.

Em seguida, a amostra foi submetida à eletroforese em gel 8% poliacrilamida. Foi feita então uma seleção por tamanho, isolando-se do gel fragmentos de 300 a 500pb, de 500 a 800pb e de 800 a 1000pb (Figura 9B). A eluição, purificação e precipitação de cDNA foram realizadas como descrito anteriormente, sendo as amostras ressuspensas em 6µl de LoTE.

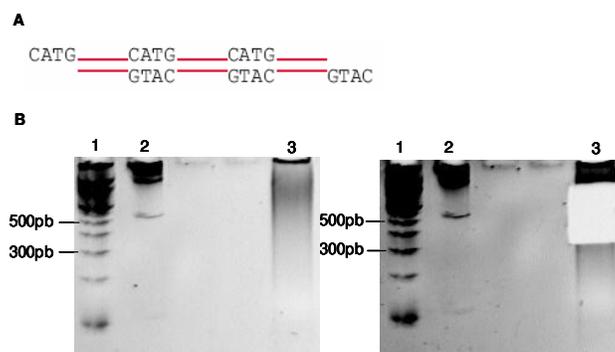


Figura 9: Formação de concatâmeros. A) Representação esquemática da ligação das *ditags* para formação de concatâmeros B) Géis 8% poliacrilamida: 3 - concatâmeros de tamanhos variados e isolamento daqueles de tamanho de 300 a 500pb, de 500 a 800pb e de 800 a 1000pb; os marcadores de peso molecular 1 - *Ladder* 100 pb e 2 - λ -*Hind* foram utilizados para orientar no isolamento dos fragmentos

A.9 - Clonagem em plasmídeo pZErO[®]-1

Para clonagem dos concatâmeros, o plasmídeo pZErO[®]-1 foi previamente linearizado utilizando-se a enzima *Sph* I. A reação realizada foi: 2 μ g de pZErO[®]-1, 1X *Buffer* 2 (10mM Tris-HCl, pH 7,9, 1mM MgCl₂, 5mM NaCl; 100 μ M DTT) e 7U de *Sph* I, em volume final de 25 μ l, por 25min, a 37°C. A seguir foi feita purificação com fenol-clorofórmio e precipitação de DNA conforme descrito anteriormente, sendo ressuspensão em 60 μ l de LoTE.

Para clonagem, a reação realizada foi: 6 μ l de cDNA (concatâmeros), 1 μ l de pZErO[®]-1 digerido com *Sph* I, 1X *Ligase Buffer* e 8 unidades *Weiss* de T4 DNA ligase, em volume final de 10 μ l. Como controles negativos, foram feitas reações sem DNA (os 6 μ l de amostra foram substituídos por água estéril em reação idêntica à descrita) e sem ligase (os volumes de amostra e de enzima foram substituídos por água estéril em reação idêntica à descrita). Após purificação e precipitação as amostras foram ressuspensas em LoTE.

A.10 - Transformação de bactérias

A transformação de bactérias *One Shot[®] TOP10 Eletrocomp[™] E. coli* foi feita por eletroporação com a utilização de cubetas 0,1cm e eletroporador MicroPulser (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), ajustado para 1,8kV, 25mF de capacitância e 200ohms de resistência, utilizando 2µl de amostra da biblioteca construída por alíquota de 40µl de bactérias.

Imediatamente após a eletroporação, as bactérias foram incubadas em meio líquido SOB (20g de triptona/l, 5g de extrato de levedura/l, 0,5g de NaCl/l, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, pH 7,0) a 37 °C por 1h, sendo a seguir plaqueadas em meio LB *Low Salt* (10g de triptona/l, 5g de extrato de levedura/l, 5g NaCl/l)/2% ágar, contendo 50µg de antibiótico Zeocin[™]/ml e incubadas por 16h, a 37 °C.

Uma característica importante do vetor pZErO[®]-1 é a existência do gene “letal” *ccdB*. Quando ocorre a religação do vetor sem inserto, este gene é transcrito e a proteína traduzida, interferindo no mecanismo de ação da enzima bacteriana essencial DNA girase, leva à quebra de DNA e morte celular. Assim, apenas bactérias contendo plasmídeos com insertos cresceram nas placas de cultura.

Para verificação da clonagem, foi realizada a seguinte PCR: 1X tampão *Taq* polimerase, 1,66mM MgCl₂, 125µM dNTPs, 0,12pmol *primer M13 forward*, 0,12pmol *primer M13 reverse* e 1U de *Taq* polimerase, em volume final de 13µl. Como molde da PCR, utilizou-se diretamente a colônia resistente a Zeocin[™], homogeneizada no volume da reação. O programa foi iniciado por 2min/94°C, seguindo-se 35 ciclos: 20s/94°C – 15s/58°C – 1min/72°C. Os produtos obtidos foram verificados em gel 1% agarose (Figura 10).

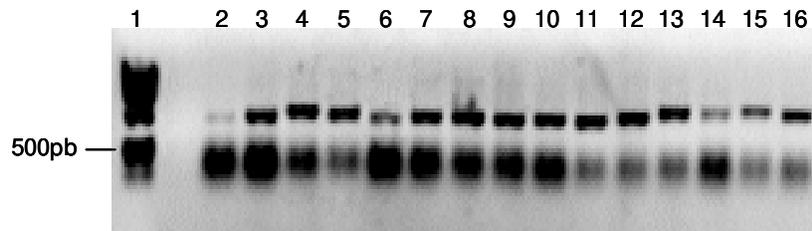


Figura 10- Verificação de clonagem. Gel 1% agarose para verificação da clonagem: 1 - λ -Hind 2 – 16 - amplificações obtidas por reação em cadeia da polimerase utilizando *primers M13 forward e reverse* e como molde, colônias resistentes ao antibiótico ZeocinTM

A.11 - Seqüenciamento automático das bibliotecas

As colônias obtidas foram inoculadas em placas de cultura com 96 poços contendo meio líquido SOB com 50 μ g de antibiótico ZeocinTM/ml e incubadas a 130rpm, por 16h, a 37°C. A seguir, 2 μ l desta cultura foram usados como molde em PCR idêntica à descrita para verificação da clonagem, sendo o programa utilizado também o mesmo. Para verificação da reação, as amplificações de diferentes tamanhos foram visualizadas em gel 1% agarose.

Para seqüenciamento, 1 μ l desta PCR foi usado como molde na seguinte reação: 0,3pmol *primer M13 forward* e 4 μ l de *Dyynamic ET Terminator reagent premix*, em volume final de 15 μ l. A programa utilizado foi o mesmo descrito para PCR, sendo a temperatura de anelamento de 57°C. As amplificações foram precipitadas, utilizando-se 7,5M acetato de amônia e etanol absoluto, e analisadas em seqüenciador *MEGA BACE 1000 DNA Analysis System*.

A.12 - Análise de seqüências

As seqüências obtidas foram analisadas por meio dos programas MEGA BACE Sequence Analyser (Amersham - Life Science), Phred e Phrap (<http://genome.washington.edu/phrap.docs/phred.html>; <http://genome.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>), sendo excluídas bases de baixa qualidade e seqüências correspondentes a vetores.

A.13 - Extração e contagem de tags

A extração e contagem das *tags* foi realizada por meio do programa eSAGE Software v1.2 (Margulies EH e Innis JW, 2000).

A.14 - Identificação das tags

Para identificação das *tags* foi utilizado o banco de dados *Best Gene for a tag*, SAGEGenie - CGAP (Boon K et al., 2002) (banco CGAP), (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>), que relacionou *tags* a números de *cluster Unigene* do banco de dados *Homo sapiens* (*Unigene Cluster Number, Hs.*) (Pontius JU et al., 2003) de maneira não redundante. Ainda, por sua identificação no *Unigene*, as *tags* foram classificadas de acordo com critérios estabelecidos em nosso laboratório, nas seguintes categorias: *no match*; seqüências denominadas preditas ou anotadas, as quais incluem *Expressed Sequence Tags* (ESTs), *Open Reading Frames* (ORFs), clones de cDNA e proteínas hipotéticas; e ainda a categoria genes conhecidos, que são aqueles bem caracterizados, com diversas seqüências depositadas no *Unigene*.

A.15 - Comparação estatística entre duas bibliotecas

A comparação entre duas bibliotecas foi feita utilizando o método estatístico descrito por Audic e Claverie (Audic S e Claverie JM, 1997), por meio de programa gentilmente cedido pelos autores. Primeiramente, a biblioteca SAGE de PV foi comparada à biblioteca controle depositada no banco de dados *SAGEmap*. A seguir, foi feita a comparação da biblioteca SAGE de PV à biblioteca controle construída neste estudo.

A.16 - Critérios para identificação de tags diferencialmente expressas

Foram consideradas diferencialmente expressas *tags* que apresentaram variação de expressão ≥ 5 (positiva ou negativa) e $p < 0,05$ nas duas comparações estatísticas realizadas.

A.17 - Perfil funcional dos transcritos

Para a análise do perfil funcional, transcritos observados foram classificados segundo o sistema do *GeneOntology* (Ashburner M et al., 2000).

B) PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Técnica utilizada para validação dos resultados obtidos por SAGE, para análise da expressão de *JUNB* em diferentes tipos celulares hematopoéticos, e em células murinas Ba/F3-REPO.

B.1 - Síntese de DNA complementar (cDNA)

As amostras de RNA foram submetidas à síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit Superscript III RTTM (Invitrogen, Life Technologies): 2µg de RNA foram tratados com DNase I (Invitrogen, Life Technologies), na seguinte reação: 1U de DNase I e 1X *DNase I reaction buffer* (20mM Tris-HCl, 2mM MgCl₂, 50mM KCl₂), em volume final de 10µl. A reação foi realizada por 15min, à temperatura ambiente e paralisada com 2,27mM EDTA, incubando-se por 10min, a 65°C.

Para síntese do cDNA, adicionaram-se a seguir 1,0µl de 50µM oligodT e 1,0µl de 10mM dNTP's. As amostras foram incubadas por 5min, a 65°C, seguidos por 1min, a 4°C. A cada amostra, adicionaram-se 10µl da seguinte mistura: 1X RT *buffer*, 10mM MgCl₂, 8mM DTT, 40U de RNaseOUTTM e 200U de Superscript III RTTM, em volume final de 10µl. A reação ocorreu por 50min, a 50°C, seguindo-se 5min, a 85°C. A seguir, trataram-se as amostras com 2U de *E. coli* RNase H por 20min, a 37°C.

A verificação da síntese de cDNA foi feita por meio de PCR para amplificação do gene *BAC* (para β-actina). As reações realizadas foram: 1X tampão *Taq* polimerase, 1mM MgCl₂, 200µM dNTP's, 200µM *primer BACF* (5' – AAGAGATGGCCACGGCTGCT – 3'), 200µM *primer BACR* (5' – TCGCTCCAACCGACTGCTGT – 3'), 2,5U de *Taq* polimerase e aproximadamente 50ng de cDNA, em volume final de 50µl. O programa foi iniciado por 2min/95°C, seguindo-se 30 ciclos: 30s/95°C – 45s/50°C – 1min/72°C, sendo finalizado por 7min/72°C. Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel 1% agarose para verificação da amplificação de 640pb.

B.2 - Princípios da qRT-PCR

Após quantificação, alíquotas de cDNA foram utilizadas como molde em qRT-PCR. A técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de PCR, através da ligação de uma sonda específica ou um corante, na fita recém sintetizada.

As reações, feitas sempre em duplicata, foram realizadas utilizando o reagente SyberGreen PCR Master Mix ® (Applied Biosystems), que além de conter todos os reagentes necessários para PCR (dNTP's, MgCl₂, tampão, *Taq Ampli-Gold*), contém o corante SYBRGreen, componente intercalante de dupla fita. Além disso, utilizaram-se também amostra de cDNA e *primers* específicos para o gene analisado. Em todos os casos foram feitos controles negativos, contendo água estéril em substituição à amostra. As reações foram preparadas em placas de 96 poços (Sorenson, BioScience Inc) com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. O programa foi iniciado por 10min/95°C, seguindo-se 45 ciclos: 15s/95°C – 1min/60°C.

A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento ABI 5700 Sequence Detector System ® (Applied Biosystems) e os resultados foram apresentados pelo programa GeneAmp® 5700 SDS (Applied Biosystems) em gráficos de fluorescência *versus* número de ciclos. O ciclo no qual se detecta fluorescência acima do limite basal estabelecido (*threshold*) é denominado ciclo de *threshold* ou Ct. Quanto maior a expressão de um gene, ou seja, quanto mais cópias existirem no início da reação, mais precocemente ocorre a amplificação e, conseqüentemente, menor é o Ct.

B.3 - Padronizações

De acordo com o gene escolhido para análise foram necessárias padronizações para realização da reação, descritas a seguir.

Desenho dos primers

Os *primers* utilizados nas reações foram desenhados com o uso do programa *Primer Express* (Applied Biosystems), analisados no programa *Blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para verificação de sua especificidade e do programa *GeneRunner* (Hastings Software) para verificação das condições de formação de estruturas

como *hairpins* e *dimers*. Sempre que possível os *primers forward* e *reverse* foram desenhados em éxons separados, de forma a se detectar uma eventual contaminação com DNA genômico (amplificação do íntron entre os éxons aumentaria o tamanho do produto amplificado).

Especificidade de amplificação

Após serem eluídos em ambiente estéril e quantificados por análise em espectrofotômetro, os *primers* foram utilizados em PCR convencional que simulou os ciclos de temperatura da qRT-PCR para verificação de amplificação nítida e específica, de tamanho esperado. A reação realizada foi: 1X tampão *Taq* polimerase, 2mM MgCl₂, 200μM dNTP's, 200μM *primer*, 200μM *primer*, 1U de *Taq* polimerase e aproximadamente 50ng de cDNA, em volume final de 50μl. Os produtos foram visualizados após eletroforese em gel 3% agarose.

Já na reação em tempo real, a especificidade pode ser verificada pela temperatura de desnaturação do produto amplificado, que depende de seu tamanho e constituição de nucleotídeos. A temperatura teórica foi predita pelo programa “Primer Express” (Applied Biosystems), e experimentalmente, foi determinada ao final do programa de amplificação, em protocolo de dissociação, que consistiu em aumento gradativo de temperatura de 60°C a 95°C. A temperatura de desnaturação é aquela em que se observou queda brusca da fluorescência, ocasionada pela separação das duas fitas e liberação do intercalante.

Concentração de *primer*

A seguir, foi padronizada a concentração ótima de *primer* a ser utilizada, que deve ser a mínima suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias do gene presentes na amostra. Utilizando a mesma quantidade de amostra foram feitas reações contendo cada um dos *primers (forward e reverse)* na concentração final de 150nM, 300nM, 600nM ou 900nM. Considerando que se utilizou a mesma quantidade de amostra em todas as reações, os Cts não deveriam variar. Se o aumento da concentração de *primer* ocasionou diminuição de Ct, a quantidade deste reagente na reação ainda era insuficiente. Assim, a concentração ótima escolhida foi a mínima, associada ao menor Ct.

Eficiência de reação

Utilizando-se a concentração ótima de *primer*, foi determinada então a eficiência da reação. Para tanto, são feitas reações com 6 quantidades conhecidas de amostra, em escala logarítmica: 2 ou 2×10^0 ng; 6,32 ou $2 \times 10^{0,5}$ ng; 20 ou 2×10^1 ng; 63,2 ou $2 \times 10^{1,5}$ ng; 200 ou 2×10^2 ng; 632 ou $2 \times 10^{2,5}$ ng. Além disso, foi feita também uma reação contendo quantidade intermediária de amostra, 120ng, perfazendo 7 reações. Os resultados foram utilizados para construção de uma curva padrão Ct *versus* quantidade de amostra. A eficiência de amplificação (E) foi obtida a partir da fórmula $E = 10^{(-1/\text{slope})}$, onde *slope* corresponde ao coeficiente de inclinação da reta (Pfaffl MW, 2001), dado pelo programa GeneAmp® 5700 SDS (Applied Biosystems). Observando-se tal linearidade, qualquer quantidade amostra dentro da faixa analisada pode ser utilizada nas reações.

B.4 - Reações

Tendo sido feitas as devidas padronizações, as reações realizadas continham 12,5µl do reagente SyberGreen PCR Master Mix ® (Applied Biosystems), 25ng de amostra de cDNA e a concentração ótima de *primer* determinada, perfazendo um volume final de 25µl.

Para a validação das bibliotecas SAGE, utilizou-se como molde as amostras de cDNA do paciente portador de PV e de três dos cinco doadores de medula para transplante, estudados por SAGE. Foram analisados os genes de interesse arbitrariamente escolhidos *JUNB*, *AHSP*, *BTG2*, *C1QB*, *C3orf10*, *EGR1*, *HBA*, *HBB*, *PRDX6*, *GPR137B* e *ZFP36* e como calibradores, *BAC*, *BCR* e *GAPDH*. Destes, as reações para amplificação de *JUNB*, *BTG2*, *C3orf10*, *ZFP36* foram padronizadas neste estudo e as restantes já haviam sido padronizadas em nosso laboratório.

Para análises de expressão gênica de *JUNB*, foram utilizadas como molde diversas amostras de cDNA, obtidas a partir de diferentes tipos celulares humanos e murinos (Ba/F3-EPOR) e como calibradores os genes *BAC* e *GAPDH* (humanos) e *GAPDH* (camundongo). Na tabela 2, estão apresentados todos os *primers*, concentrações ótimas e eficiências de reação.

Tabela 2- Condições para reações em cadeia da polimerase quantitativas em tempo real. Sequências dos *primers*, concentrações ótimas em que devem ser utilizados e eficiências das reações de amplificação de cada um dos genes selecionados para análise

	<i>Primers</i>	Concentração ótima	Eficiência de amplificação
<i>BAC</i>	F – 5' AGGCCAACCGCGAGAAG 3' R – 5' ACAGCCTGGATAGCAACGTACA 3'	150 nM	100%
<i>BCR</i>	F – 5' CCTTCGACGTCAATAACAAGGAT 3' R – 5' CCTGCGATGGCGTTCAC 3'	150 nM	99,85%
<i>GAPDH</i>	F – 5' GCACCGTCAAGGCTGAGAAC 3' R – 5' CCACTTGATTTTGGAGGGATCT 3'	300 nM	100%
<i>EGRI</i>	F – 5' GAGCATGTGTCAGAGTGTTGTT 3' R – 5' CATGTGAGAGTACGGTCAAGC 3'	600 nM	99,76%
<i>C1QB</i>	F – 5' GGCAAGTTCACCTGCAAGGT 3' R – 5' CATGAGGTTACGCACAGGTT 3'	150 nM	100%
<i>PRDX6</i>	F – 5' ATTAGTGCCATGTGCCTTTC 3' R – 5' TCTCTTCTTTCACATGGTGTAC 3'	600 nM	99%
<i>GPR137B</i>	F – 5' CCCATAGGAATAAGCAATAATGTA 3' R – 5' AGCAAGGCTCCCTCTTTAGTAC 3'	600 nM	100%
<i>AHSP</i>	F – 5' TGATCC TCTCGTCTCTGAAGAAGAC 3' R – 5' GCTGCCTGTAATAGTTGATGTAGAAGTT 3'	900 nM	100%
<i>HBA</i>	F – 5' TGGTCCCCACAGACTCAGAGA 3' R – 5' CGGCCTTGACGTTGGTCTT 3'	150 nM	100%
<i>HBB</i>	F – 5' AGGCACCGAGCACTTTCTTG 3' R – 5' ATCTGTCCACTCCTGATCCAGTT 3'	600 nM	100%
<i>ZFP36</i>	F – 5' GCCGACACCCCTCATGG 3' R – 5' ACGTCAGGGCTCAGCGAC 3'	300 nM	100%
<i>BTG2</i>	F – 5' GAGCAGGCAGAGGCTTAAGGT 3' R – 5' GCCCTTGACGGCTTTTC 3'	300 nM	99,8%
<i>C3orf10</i>	F – 5' GCCTGGGACTCTTTGTGAAGGTC 3' R – 5' CAGAAGCAGTGCAAAGGCAAT 3'	600 nM	100,41%
<i>JUNB</i>	F – 5' TGGAAAAGAAACACGCACTTAGTC 3' R – 5' AACAAACACACACAAACACAAACA 3'	600 nM	100%
<i>JUNB camundongo</i>	F – 5' ACTTTTCGGGTCAGGGATCAG 3' R – 5' GACGATCAAGCGCTCCAGTT 3'	400 nM	96,51%
<i>GAPDH camundongo</i>	F – 5' ACTGGCATGGCCTTCCG 3' R – 5' CAGGCGGCACGTCAGATC 3'	400 nM	99,44%

B.5 - Análise dos dados

A expressão dos genes de interesse foi determinada de forma relativa, sendo normalizada com relação a genes chamados calibradores. Estes são genes cuja expressão é dita constitutiva, ou seja, apresentam pouca variação entre diversas condições. No entanto, diversos trabalhos demonstram que sua expressão pode variar consideravelmente (Vandesompele J et al., 2002). Sendo a qRT-PCR uma técnica tão sensível e precisa, é recomendado o uso de múltiplos genes calibradores (Vandesompele J et al., 2002). Para tanto, após exportação dos valores de Ct obtidos para uma planilha Excel (Microsoft Corporation), foi calculada média aritmética do Ct das duplicatas. A seguir foi obtida a quantidade de expressão (Q), por meio da fórmula $Q = E^{\text{deltaCt}}$, onde E = eficiência de reação e delta Ct = menor Ct observado – Ct da amostra. Desta forma, a expressão foi relacionada à amostra que apresentou maior expressão (menor Ct observado), que recebeu valor Q = 1. Os valores Q dos genes calibradores de cada amostra foram submetidos ao programa *Genorm* (Vandesompele J et al., 2002), que calcula a média geométrica entre eles, valor este denominado Fator de Normalização da amostra. A expressão normalizada de um dado gene de interesse em uma determinada amostra é dada pela razão entre o valor Q do gene de interesse da amostra e o Fator de Normalização da amostra.

Nas células CD34+ e nas células murinas Ba/F3-REPO, a normalização foi feita em relação aos genes *HPRT* e *GAPDH*, respectivamente, pelo método delta-delta Ct convencional (Livak KJ e Schmittgen TD, 2001).

B.6 - Comparação com dados de SAGE

A comparação com os dados de SAGE foi feita em termos da variação de expressão entre PV e controles. Para os dados de qRT-PCR, calcularam-se, para cada gene, as razões entre o valor de expressão no paciente e o valor de expressão nos controles 1, 2 e 3. A seguir, calculou-se a média destas três razões e o erro padrão da média. Para os dados de SAGE, a variação corresponde à razão entre o número total de *tags* correspondentes a cada um dos genes (normalizado para 50.000) nas duas bibliotecas. Assim, para variação positiva (expressão aumentada em PV), calculou-se: número de tags na biblioteca SAGE de PV/número de tags na biblioteca SAGE controle. Para variação negativa (expressão

diminuída em PV) o cálculo foi – (número de tags na biblioteca controle/número de tags na biblioteca de PV).

B.7 - Análise estatística

Para verificar se havia diferença significativa de expressão do gene *JUNB* entre o grupo de pacientes PV e o grupo de controles, foi realizado o teste Mann-Whitney.

3.9- Análises em proteínas (*Western Blot*)

Esta técnica foi utilizada para quantificar a expressão das proteínas JunB, β -actina, P-STAT5, STAT5, P-AKT, AKT, P-ERK, ERK e Bcl-xL.

A) Amostras

$1,5 \times 10^6$ células foram ressuspensas em 100 μ l de 2X tampão Laemli (100 μ M Tris pH6,8, 10% glicerol, 4% SDS, 0,2% azul de bromofenol, 150mM DTT imediatamente antes do uso), sonicadas e fervidas por 5min, a 100°C.

B) Gel

Preparou-se primeiramente o gel de migração (12% acrilamida, 0,375M Tris pH8,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amônia (APS), 0,04% *Tetramethylethylenediamine* (TEMED) e cobriu-se com água. Após a polimerização, a água foi removida e depositou-se o gel de stacking (5% acrilamida, 0,06M Tris pH6,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,01% TEMED).

C) Migração

Após a polimerização, o gel foi acoplado em sistema para migração, recoberto de 1X tampão de migração (0,025M Tris, 0,25M glicina, 0,1% SDS, pH \geq 8,0) e as amostras foram depositadas. A migração ocorreu a 80V por cerca de 20min (gel de stacking) e a 120V por cerca de 2h (até o azul de bromofenol sair do gel).

D) Transferência

Após a migração, retirou-se o gel do sistema e colocou-se gentilmente no sistema para migração, sobre grade recoberta por esponja e por papel Whatman, embebidos em 1X tampão de transferência (0,024M Tris, 0,192M glicina, $\text{pH} \geq 8,0$, 20% etanol). Tendo sido depositado o gel, cobriu-se com membrana de nitrocelulose (Hybond C, Amershan), papel Whatman e esponja, embebidos em 1X tampão de transferência, e fechou-se a grade. A grade foi acoplada ao sistema de migração, feita em 1X tampão de transferência e com gelo, a 90V durante 1h.

E) Coloração

A membrana foi colorida com *Rouge ponceau* para verificação da quantidade de proteína em cada poço. Neste momento, cortaram-se membranas que seriam incubadas com mais de um anticorpo.

F) Saturação

A membrana foi bloqueada em tampão 1X PBST-10% leite (10g leite em pó desnatado dissolvido em 100ml 1X PBST (0,2% Tween 20 em 1X PBS) ou 3% BSA por 1h, à temperatura ambiente.

G) Marcação

A membrana foi marcada por 16h, a 4°C, com anticorpo primário apropriado (Tabela 3). A seguir, a membrana foi lavada três vezes por 10min, com tampão 1X PBST e incubada por 1h, à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário apropriado (Tabela 3). Lavou-se novamente três vezes com 1X PBST.

Tabela 3- Anticorpos utilizados para *Western Blot*. Anticorpos, suas respectivas marcas, diluições e tampões em que foram preparados e o anticorpo secundário apropriado.

Anticorpo	Marca	Diluição	Tampão	Anticorpo Secundário
Anti-JunB	Santa Cruz	1/200	PBST -1% leite	Anti-Mouse
Anti-β-actina	Cell Signaling	1/1000	PBST -1% leite	Anti-Mouse
Anti-P-STAT5	Up STATE	1/1000	PBST -1% leite	Anti-Mouse
Anti-STAT5	Up STATE	1/2000	PBST -1% leite	Anti-Rabbit
Anti-P-ERK	Cell Signaling	1/5000	PBST -1% leite	Anti-Rabbit
Anti-ERK (p44/42)	Cell Signaling	1/2000	PBST -1% leite	Anti-Rabbit
Anti-P-AKT (THR 308)	Cell Signaling	1/1000	3% BSA	Anti-Rabbit
Anti-AKT	Cell Signaling	1/2000	PBST -1% leite	Anti-Rabbit
Anti-IgG Mouse		1/5000	PBST-5% leite	-
Anti-IgG Rabbit		1/2500	PBST-5% leite	-

H) Revelação

Para revelação, utilizou-se o reagente ECL (Pierce) ou Femto Super Signal (Pierce), conforme instruções do fabricante, fechou-se a seguir a membrana em filme plástico e colocou-se então em cassete autoradiográfico. No escuro, depositou-se um filme para exposição por 30s-20min, de acordo com o anticorpo utilizado. A seguir, realizou-se a revelação do filme em equipamento automático (Kodak, Paris Cedex, França).

I) Quantificação

Após serem revelados e escaneados, os filmes foram transformados em imagens digitais. A quantificação da expressão foi então realizada utilizando-se para tanto o programa livre ImageJ.

4- RESULTADOS

“-Eu não quero desculpas, quero resultados”

no filme “Madagascar”

4.1- Perfis globais de expressão gênica: PV E CONTROLE

A) Pacientes e controles, tipos celulares e ácidos nucleicos

Para construção da biblioteca SAGE de medula óssea de policitemia vera, foi selecionado como objeto de estudo um paciente com PV, ao diagnóstico. O diagnóstico foi feito segundo critérios da OMS no Hemocentro da UNICAMP. A amostra de medula óssea foi obtida na ocasião da coleta para os exames de biópsia e mielograma, quando o paciente apresentava 18,0g hemoglobina/dl, 15780×10^6 leucócitos/l, 605000×10^4 plaquetas/l e ainda não havia sido submetido a nenhum tipo de tratamento. O mielograma indicou celularidade nos grumos aumentada moderada e 22% de eritroblastos. Na série granulocítica, observaram-se 4% de promielócitos, 10% de mielócitos, 24% de metamielócitos e bastões, 22% de neutrófilos, 11% de eosinófilos, 1% de basófilos (72% de granulócitos totais). A série megacariocítica apresentou celularidade moderada e presença de formas jovens. Já o exame de biópsia de medula mostrou hiper celularidade global e pleomorfismo intenso de megacariócitos e quadro histológico compatível com síndrome mieloproliferativa, em especial policitemia vera.

Para construção da biblioteca SAGE de medula óssea normal, que foi usada como controle, optou-se pelo estudo de cinco doadores de medula para transplante, que foram submetidos a este procedimento no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo – HC-USP. As amostras foram obtidas no momento da coleta para doação.

Em todos os casos, a preparação de células foi realizada em no máximo 12 horas após a coleta e os células totais de medula óssea foram obtidos. Amostras de DNA e RNA (Figura 11) foram extraídas, utilizando-se o reagente TRIzol, segundo os protocolos descritos.

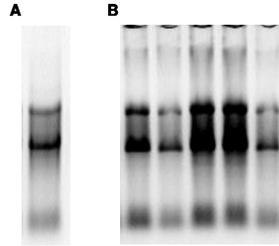


Figura 11- Extração de RNA. Géis 1,2% agarose contendo formaldeído para verificação da qualidade de RNA A) RNA extraído de células da medula óssea de paciente portador de policitemia vera B) RNAs extraídos de células da medula óssea de cinco doadores para transplante

B) Análise da mutação *JAK2* V617F

Para análise da mutação *JAK2* V617F nas amostras obtidas de pacientes foi necessário, primeiramente, que se padronizasse a técnica, utilizando-se para isso as linhagens celulares HEL e K562.

B.1 - Padronização da técnica

Após cultivo conforme descrito, foram obtidas cerca de 1×10^8 células da linhagem HEL e a mesma quantidade de células da linhagem K562. Estas foram então ressuspensas em reagente TRIzol para extração de RNA, que foi submetido à PCR para amplificação do gene *JAK2*. Realizando-se a reação descrita na metodologia, foram obtidos produtos do tamanho esperado, observados em gel 1% agarose como bandas fortes e nítidas (Figura 12).

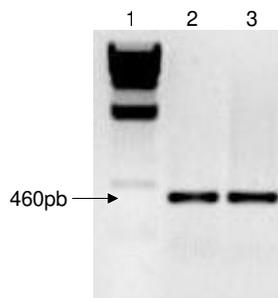


Figura 12- Amplificação de *JAK2* em células HEL e K562. Gel 1% agarose para verificação de amplificações obtidas por reação em cadeia da polimerase: 1 - λ -*Hind* 2 – 3 - amplificações de 460pb obtidas utilizando-se os *primers JAK2 forward e reverse* e como molde: DNA de células da linhagem HEL (2) ou da linhagem K562 (3)

Para padronização da reação de digestão, foram feitas otimizações das quantidades de enzima e produto de PCR utilizadas, de forma a se observar digestão completa do produto de PCR de 460pb do gene *JAK2* obtido a partir de DNA de células K562. Realizando-se a digestão conforme descrito, utilizando-se 5 μ l do produto de PCR e 1U de enzima, visualizaram-se em gel 2% agarose somente os fragmentos digeridos de 241pb e 189pb, não sendo observado o produto de PCR intacto, de 460pb, a partir de células K562. Utilizando-se as mesmas condições de reação, observou-se que o produto obtido a partir de células HEL permaneceu intacto (Figura 13).

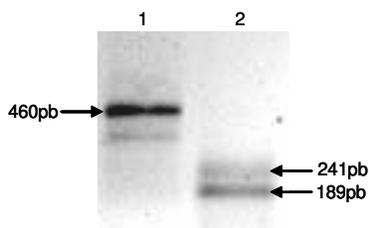


Figura 13- Digestão de *JAK2* com *Bsa* XI em células HEL e K562. Gel 2% agarose para verificação de digestão com a enzima *Bsa* XI: 1 - após digestão, o produto de PCR de 460pb do gene *JAK2*, obtido a partir de DNA de células HEL, permanece intacto 2 - após digestão, o produto de PCR do gene *JAK2* obtido a partir de DNA de células K562 é completamente digerido, sendo visualizados os fragmentos de 241pb e 189pb

B.2- Análise da mutação *JAK2* V617F nos indivíduos a serem estudados por SAGE

Após a padronização da técnica, analisaram-se a seguir as amostras de DNA de células da medula óssea dos indivíduos estudados por SAGE, quanto à presença da mutação *JAK2* V617F. Realizou-se PCR para amplificação do fragmento do gene *JAK2*, visualizado após eletroforese em gel 1% agarose (Figura 14).

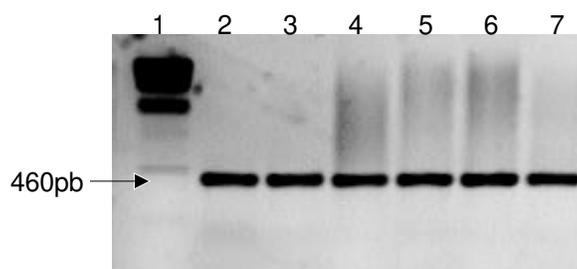


Figura 14- Amplificação de *JAK2* em paciente com policitemia vera e controles. Gel 1% agarose para verificação de amplificações obtidas por reação em cadeia da polimerase: 1 - λ -*Hind* 2 – 7 - amplificações de 460pb obtidas utilizando-se os *primers* *JAK2 forward e reverse* e como molde: DNA de paciente com policitemia vera (2) ou doadores de medula óssea para transplante (3-7)

Seguiu-se digestão com a enzima *Bsa* XI e os produtos foram visualizados após eletroforese em gel 2% agarose (Figura 15). Observou-se que parte do produto de PCR 460pb do gene *JAK2* obtido a partir de DNA de paciente portador de PV permanece intacta, indicando que parte das células possuem a mutação *JAK2* V617F. Já os produtos obtidos a partir de DNA dos doadores de medula óssea para transplantes foram completamente digeridos, sendo visualizados os fragmentos de 241pb e 189pb, indicando que estes indivíduos possuem o alelo *JAK2* selvagem.

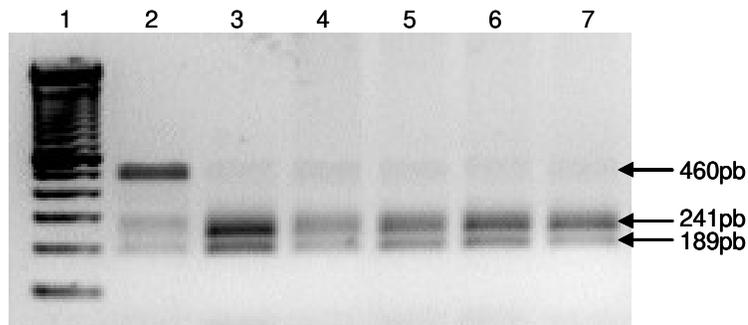


Figura 15- Digestão de *JAK2* com *Bsa XI* em paciente com policitemia vera e controles. Gel 2% agarose para verificação de digestão com a enzima *Bsa XI*: 1 - λ -*Hind* 2 - após digestão, parte do produto de PCR de 460pb do gene *JAK2*, obtido a partir de DNA de paciente com policitemia vera, permanece intacto e parte é digerida, sendo visualizados os fragmentos de 241pb e 189pb 3 – 7 - após digestão, os produtos de PCR do gene *JAK2*, obtidos a partir de DNA de doadores de medula óssea para transplante, são completamente digeridos, sendo visualizados os fragmentos de 241pb e 189pb

Para confirmação da mutação, foi feito seqüenciamento automático conforme protocolo descrito. Foram analisados os produtos de PCR do gene *JAK2* obtidos a partir de DNA do paciente portador de PV e de um dos indivíduos controles incluídos no estudo. As seqüências *antisense*, obtidas por reação utilizando o *primer JAK2 reverse* e visualizadas pelo programa *Chromas* (Technelysium Pty Ltd.) estão representadas na figura 16. A amostra do indivíduo controle apresentou o nucleotídeo citosina (guanina, na fita *sense*), correspondente ao alelo *JAK2* selvagem, enquanto a amostra do paciente portador de PV apresentou, além do alelo selvagem, o nucleotídeo adenina (timina, na fita *sense*), correspondente ao alelo mutado *JAK2 V617F*. Na figura, estão selecionados os códons responsáveis pela codificação do aminoácido valina (alelo *JAK2* selvagem) ou fenilalanina (alelo *JAK2 V617F*).

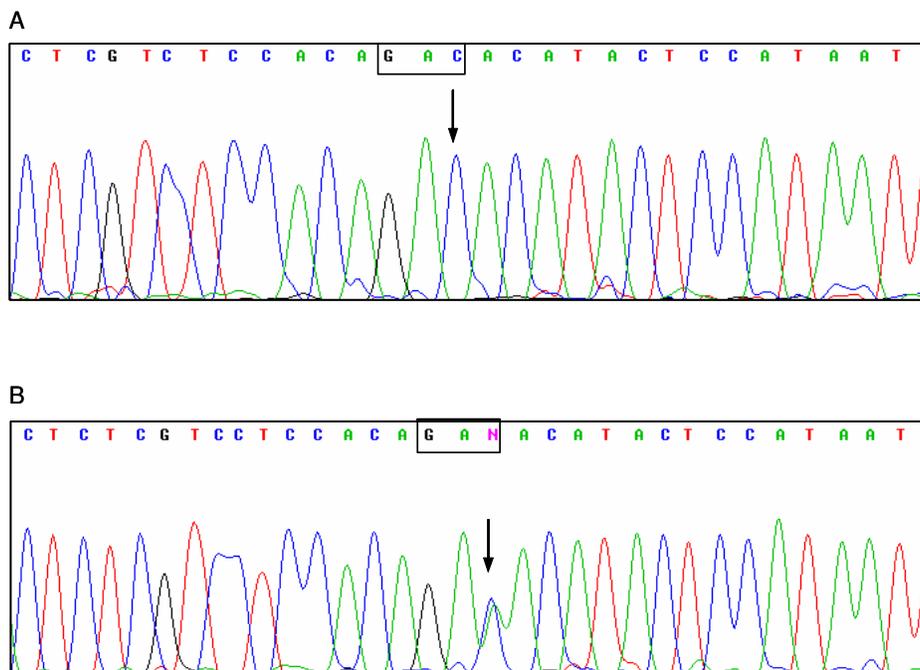


Figura 16- Seqüenciamento de *JAK2* em paciente com policitemia vera e controle. Eletroferogramas dos produtos de PCR do gene *JAK2*, utilizando *primer JAK2 reverse*, visualizados por meio do programa *Chromas* (Technelysium Pty Ltd.). As seqüências apresentadas correspondem à fita *antisense* **A)** Seqüenciamento de amostra de indivíduo controle. O pico indicado pela seta corresponde ao nucleotídeo citosina (guanina, na fita *sense*); o códon seleccionado codifica o aminoácido valina **B)** Seqüenciamento de amostra do paciente portador de policitemia vera. O pico duplo indicado pela seta indica a presença tanto do nucleotídeo citosina (guanina, na fita *sense*), quanto de adenina (timina, na fita *sense*); o códon mutado codifica o aminoácido fenilalanina

C) Bibliotecas SAGE

C.1 - Biblioteca SAGE PV

8µg de RNA total de células da medula óssea do paciente com PV portador da mutação *JAK2 V617F* foram utilizados para construção da biblioteca SAGE de policitemia vera, denominada SAGE PV. Esta biblioteca foi construída conforme descrito e então submetida a seqüenciamento automático.

Após tratamento das seqüências, contou-se, para biblioteca SAGE PV, um total de 68.584 *tags* geradas, representando 21.042 *tags* diferentes, ou *tags* únicas. Na Tabela 4, pode-se observar a distribuição de freqüência, ou seja, o número absoluto de vezes que uma determinada *tag* foi detectada, em relação ao número de *tags* totais e de *tags* únicas. Pode-se verificar que a grande maioria das *tags* foi detectada apenas uma vez (69,11% do total de *tags* únicas), enquanto apenas 46 *tags* foram detectadas 100 vezes ou mais (0,22% do total de *tags* únicas). No entanto, observou-se que as *tags* que apresentam 100 ou mais cópias perfazem 22,48% do número de *tags* totais.

Tabela 4- Distribuição de freqüência das *tags* detectadas na biblioteca de policitemia vera. Na tabela estão indicados número absoluto e porcentagem de *tags* em cada categoria

Freqüência	1	2 - 4	5 - 9	10 - 99	> 100	Total
<i>Tags</i> únicas	14542	4501	1136	817	46	21042
(%)	(69,11%)	(21,39%)	(5,40%)	(3,88%)	(0,22%)	(100,00%)
<i>Tags</i> totais	14542	11403	7186	20023	15410	68564
(%)	(21,21%)	(16,63%)	(10,48%)	(29,20%)	(22,48%)	(100,00%)

Realizando a identificação das 21042 *tags* únicas da biblioteca PV com o banco de dados *CGAP*, observou-se cerca de 31% de *no matches*, 18% de *tags* correspondentes a seqüências preditas e 52% das *tags* (10867) correspondentes a genes conhecidos, representando 7586 transcritos diferentes.

As *tags* mais expressas em PV correspondem a genes como: genes para as cadeias α (*HBA*) e β (*HBB*) da hemoglobina, cadeias leve (*FTL*) e pesada (*FTH1*) da ferritina, complexo maior de histocompatibilidade I, B e C (*HLA-B* e *HLA-C*), *CD74* e lactotransferrina (*LTF*), além de *JUNB*, *ZFP36* e *FOS* (Tabela 5).

Tabela 5- 50 tags mais detectadas na biblioteca de policitemia vera. Para cada *tag* estão indicados a seqüência de nucleotídeos, símbolo, descrição e número no UniGene do gene correspondente, e a freqüência com que foi detectada

<i>Tag</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Gene</i>	<i>Unigene</i>	<i>Freq</i>
GCAAGAAAGT	HBB	Hemoglobin, beta	Hs.654454	1462
GCCTGCTATT	DEFA1	Defensin, alpha 1	Hs.380781	1430
CCCAACGCGC	HBA2	Hemoglobin, alpha 2	Hs.654744	1397
GTGGCCACGG	S100A9	S100 calcium binding protein A9	Hs.112405	1238
TACCTGCAGA	S100A8	S100 calcium binding protein A8	Hs.416073	1113
GAAATAAAGC	IGHG1	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)	Hs.510635	724
GTTGTGGTTA	B2M	Beta-2-microglobulin	Hs.534255	527
TCCCTATTA		Transcribed locus	Hs.615061	398
CTAAGACTTC	LOC645221	Hypothetical LOC645221	Hs.126637	390
CTTCTGCCC	HBA2	Hemoglobin, alpha 2	Hs.654744	339
CTGACCTGTG	HLA-B	Major histocompatibility complex, class I, B	Hs.77961	327
CCCTGGGTTT	FTL	Ferritin, light polypeptide	Hs.433670	323
GCTTTATTTG	ACTB	Actin, beta	Hs.520640	321
TTGGTGAAGG	TMSB4X	Thymosin, beta 4, X-linked	Hs.522584	321
GACTGCTATT	DEFA3	Defensin, alpha 3, neutrophil-specific	Hs.654448	312
AAAACATTCT		CDNA clone IMAGE:5271818	Hs.644254	303
TTGGGGTTTC	FTH1	Ferritin, heavy polypeptide 1	Hs.524910	277
ACCATTCTGC	IFITM2	Interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)	Hs.174195	269
GCCATAAAAT	SRGN	Serglycin	Hs.1908	245
TCCCGTACA		Transcribed locus	Hs.536923	229
TGCAGCACGA	HLA-B	Major histocompatibility complex, class I, B	Hs.654404	226
TGTGTTGAGA	EEF1A1	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	Hs.644639	212
CACCTAATTG				194
CCCATCGTCC		Transcribed locus, weakly similar to XP_688523.2 hypothetical protein [Danio rerio]	Hs.559716	165
CTGTAAATCC	NT5C2	5'-nucleotidase, cytosolic II	Hs.591920	163
ATGTAAAAAA	LYZ	Lysozyme (renal amyloidosis)	Hs.524579	149
CAAGCATCCC		Transcribed locus	Hs.408470	147
GTTCACATTA	CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	Hs.654407	133
AGGGTCCCCG	HLA-C	Major histocompatibility complex, class I, C	Hs.449621	129
ACTAACACCC				124
ACCCACGTCA	JUNB	Jun B proto-oncogene	Hs.25292	122
GCAAAACAAC	LTF	Lactotransferrin	Hs.529517	122
TAGGTTGTCT	TPT1	Tumor protein, translationally-controlled 1	Hs.374596	120
CACAAACGGT	RPS27	Ribosomal protein S27 (metalloprotein 1)	Hs.654475	120
TGATTCACT		CDNA clone IMAGE:5265638	Hs.129283	117
CTAGCCTCAC	ACTG1	Actin, gamma 1	Hs.514581	116
GTGAAACCCC	PAFAH2	Platelet-activating factor acetylhydrolase 2, 40kDa	Hs.590913	116
TTCATACACC				114
ACACAGCAAG	LOC645221	Hypothetical LOC645221	Hs.126637	114
ATGGTGGGGG	ZFP36	Zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)	Hs.534052	114
GATGTAGTGG	MNDA	Myeloid cell nuclear differentiation antigen	Hs.153837	114
TGAAAAGTGA	FOS	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	Hs.25647	111
GGCTGGGGGC	PFN1	Profilin 1	Hs.494691	109
GGGTCAAAAG	H3F3A	H3 histone, family 3A	Hs.533624	107
ACCGCCGTGG	CYBA	Cytochrome b-245, alpha polypeptide	Hs.513803	106
TTGGTCTCT	RPL41	Ribosomal protein L41	Hs.632703	101
GTGCTGAATG	MYL6	Myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	Hs.632717	98
GGCTGGGGCC	ELA2	Elastase 2, neutrophil	Hs.99863	96
CTCCATCCAG	CSF3R	Colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)	Hs.524517	96
CTGGCCCGAG	ARHGDIB	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	Hs.504877	95

C.2 - Biblioteca SAGE MN

3µg de RNA total extraído de células da medula óssea de cada um dos cinco doadores foram combinados, perfazendo um total de 15µg, utilizados então para construção da biblioteca SAGE de medula óssea normal, denominada biblioteca SAGE MN. Foi realizado seqüenciamento automático da biblioteca SAGE MN, conforme anteriormente descrito.

Para biblioteca SAGE MN, seqüenciou-se um total de 58401 *tags*, representando 18926 *tags* únicas. Na Tabela 6, pode-se observar a distribuição de freqüência. Conforme já observado na biblioteca SAGE PV, a grande maioria das *tags* foram detectadas apenas uma vez (70,38% do total de *tags* únicas), enquanto apenas 54 *tags* foram detectadas 100 vezes ou mais (0,29% do total de *tags* únicas). Observou-se também que as *tags* abundantes (100 ou mais cópias) perfazem 24,43% do número de *tags* totais.

Tabela 6- Distribuição de freqüência das *tags* detectadas na biblioteca de medula óssea normal. Na tabela estão indicados número absoluto e porcentagem de *tags* em cada categoria

Freqüência	1	2 - 4	5 - 9	10 - 99	> 100	Total
<i>Tags</i> únicas	13320	4057	889	606	54	18926
(%)	70,38%	21,44%	4,70%	3,20%	0,29%	100,00%
<i>Tags</i> totais	13320	10316	5616	14882	14267	58401
(%)	22,81%	17,66%	9,62%	25,48%	24,43%	100,00%

Observou-se ainda na biblioteca SAGE MN cerca de 30% de *no matches*, 18% de *tags* correspondentes a seqüências preditas e 53% das *tags* (9952) correspondentes a genes conhecidos. Dentre as 9952 *tags* correspondentes a genes conhecidos, foram identificados 7275 transcritos diferentes.

As *tags* mais detectadas da biblioteca SAGE MN estão ilustradas na Tabela 7. Entre os transcritos mais expressos se encontram os genes das cadeias α (*HBA*) e β da hemoglobina (*HBB*), cadeias leve (*FTL*) e pesada da ferritina (*FTH1*), complexo maior de histocompatibilidade I, A (*HLA-A*) e *CD74*. Destacaram-se também as defensinas (*DEFA*)

e proteínas ligadoras de cálcio (*SL100*), além de beta-2-microglobulina (*B2M*), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e de proteínas ribossomais (*RPs*).

Tabela 7- 50 tags mais detectadas na biblioteca de medula óssea normal. Para cada *tag* estão indicados a seqüência de nucleotídeos, símbolo, descrição e número no UniGene correspondentes, e a freqüência com que foi detectada

<i>Tag</i>	Símbolo	Gene	UniGene	Freq
TACCTGCAGA	S100A8	S100 calcium binding protein A8	Hs.416073	2813
GTGGCCACGG	S100A9	S100 calcium binding protein A9	Hs.112405	934
GCCTGCTATT	DEFA1	Defensin, alpha 1	Hs.380781	614
GTTGTGGTTA	B2M	Beta-2-microglobulin	Hs.534255	511
TTGGGGTTTC	FTH1	Ferritin, heavy polypeptide 1	Hs.524910	452
ATAATTCTTT	RPS29	Ribosomal protein S29	Hs.156367	370
ATGTAAAAAA	LYZ	Lysozyme (renal amyloidosis)	Hs.524579	361
GCAAGAAAGT	HBB	Hemoglobin, beta	Hs.654454	346
GACTGCTATT	DEFA3	Defensin, alpha 3, neutrophil-specific	Hs.654448	321
GAAATACAGT	NT5C	5', 3'-nucleotidase, cytosolic	Hs.67201	315
TAGGTTGTCT	TPT1	Tumor protein, translationally-controlled 1	Hs.374596	299
GCATAATAGG	RPL21	Ribosomal protein L21	Hs.381123	294
GGATTGGCC	RPLP2	Ribosomal protein, large, P2	Hs.437594	276
CTTCTTGCCC	HBA2	Hemoglobin, alpha 2	Hs.654744	260
GAAATAAAGC	IGHG1	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)	Hs.510635	238
CCCATCGTCC		Transcribed locus, weakly similar to XP_688523.2 hypothetical protein [Danio rerio]	Hs.559716	232
CCCTGGGTTTC	FTL	Ferritin, light polypeptide	Hs.433670	229
TTGGTGAAGG	TMSB4X	Thymosin, beta 4, X-linked	Hs.522584	216
GAAAAATGGT	RPSA	Ribosomal protein SA	Hs.449909	215
TTCATAAAAA	RPLP1	Ribosomal protein, large, P1	Hs.356502	207
TGTGTTGAGA	EEF1A1	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	Hs.644639	204
TAATAAAGGT	RPS8	Ribosomal protein S8	Hs.512675	202
GAGGGAGTTT	RPL27A	Ribosomal protein L27a	Hs.523463	190
CTGGGTAAAT	RPS19	Ribosomal protein S19	Hs.438429	189
TTCATACACC				187
TACCATCAAT	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs.544577	177
GTTACATTA	CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	Hs.654407	176
CACCTAATTG				166
CCCAACGCGC	HBA2	Hemoglobin, alpha 2	Hs.654744	166
TCAGATCTTT	RPS4X	Ribosomal protein S4, X-linked	Hs.446628	160
GCCATAAAAT	SRGN	Serglycin	Hs.1908	151
CACAACCGGT	RPS27	Ribosomal protein S27 (metalloprotein 1)	Hs.654475	146
TGATTTCACT		CDNA clone IMAGE:5265638	Hs.129283	141
CAATAAATGT	RPL37	Ribosomal protein L37	Hs.558601	138
GGCTGGGGCC	ELA2	Elastase 2, neutrophil	Hs.99863	137
GAGCCAGCC	SPATS2	Spermatogenesis associated, serine-rich 2	Hs.654826	134
GGGCTGGGGT	RPL29	Ribosomal protein L29	Hs.425125	131
TCCCCGTACA		Transcribed locus	Hs.536923	127
GCATTTAAAT	EEF1B2	Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	Hs.421608	123
TGCCCTCAGG	LCN2	Lipocalin 2 (oncogene 24p3)	Hs.204238	123
AGGGCTCCA	RPL10	Ribosomal protein L10	Hs.534404	123
TGCACGTTTT	RPL32	Ribosomal protein L32	Hs.265174	122
TTGGTCTCT	RPL41	Ribosomal protein L41	Hs.632703	122
GAAGCAGGAC	CFL1	Cofilin 1 (non-muscle)	Hs.170622	122
GTGCACTGAG	HLA-A	Major histocompatibility complex, class I, A	Hs.181244	119
GTGAAGGCAG	RPS3A	Ribosomal protein S3A	Hs.356572	118
ATGGCTGGTA	RPS2	Ribosomal protein S2	Hs.506997	116
AGGCTACGGA	RPL13A	Ribosomal protein L13a	Hs.523185	115
AAAACATTCT		CDNA clone IMAGE:5271818	Hs.644254	113
GGACCACTGA	RPL3	Ribosomal protein L3	Hs.119598	110

4.2- Validação dos resultados de SAGE POR QRT-PCR

A) Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada conforme descrito, a partir das amostras de RNA do paciente portador de PV e de três dos cinco doadores de medula óssea estudados por SAGE. A verificação da síntese foi feita por PCR (Figura 17).

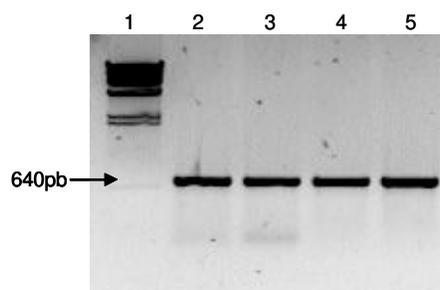


Figura 17- Síntese de DNA complementar. Gel 1% agarose para verificação de síntese de DNA complementar por reação em cadeia da polimerase para amplificação do gene *BAC*: 1 - λ -*Hind* 2 – 5 - amplificações de 640pb obtidas utilizando-se como molde: DNA de paciente portador de policitemia vera (2) ou de doadores de medula óssea para transplante (3-5)

B) Padronizações da qRT-PCR

Dentre os dados obtidos por SAGE, foram selecionados os genes *JUNB*, *BTG2*, *ZFP36* e *C3orf10*. Os *primers* para sua amplificação foram desenhados por meio do programa GeneAmp® 5700 SDS (Applied Biosystems), de onde se obteve também tamanho e temperatura de desnaturação previstas do produto amplificado (Tabela 8).

Tabela 8- Padronização das reações em cadeia da polimerase quantitativas em tempo real. Genes selecionados para análise, seqüências dos *primers* desenhados para sua amplificação, tamanho e temperatura de desnaturação dos produtos, preditas pelo programa GeneAmp® 5700 SDS (Applied Biosystems)

.Gene	Seqüência dos <i>primers</i> desenhados	Produto amplificado	
		Temperatura de desnaturação	Tamanho
ZFP36	F – 5' GCCGACACCCCTCATGG 3' R – 5' ACGTCAGGGCTCAGCGAC 3'	84°C	81pb
BTG2	F – 5' GAGCAGGCAGAGGCTTAAGGT 3' R – 5' GCCCTTGGACGGCTTTTC 3'	84°C	97pb
JUNB	F – 5' TGGAAAAGAAACACGCACTTAGTC 3' R – 5' AACAAACACACACAAACACAAACA 3'	72°C	71pb
C3orf10	F – 5' GCCTGGGACTCTTTGTGAAGGTC 3' R – 5' CAGAAGCAGTGCAAAGGCAAT 3'	78°C	98pb

A especificidade do produto amplificado foi verificada experimentalmente por PCR convencional, pelo tamanho específico do produto. De acordo com o predito pelo programa, na figura 18 está ilustrada a amplificação de 98pb do gene *C3orf10*, visualizada após eletroforese em gel 3% agarose.

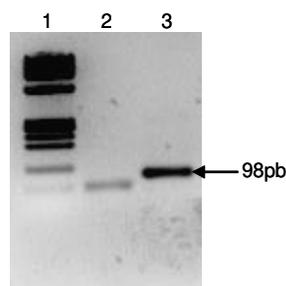


Figura 18- Amplificação do gene *C3orf10*. Gel 3% agarose para verificação de amplificação do gene *C3orf10* por reação em cadeia da polimerase: 1 - ØX174 3 - amplificação de 98pb

Além disso, verificou-se também a especificidade por meio de qRT-PCR, pela temperatura de desnaturação específica do produto amplificado. Na figura 19, está ilustrada a curva de dissociação (derivativa da fluorescência *versus* temperatura) do produto amplificado do gene *BTG2*, gerada pelo programa GeneAmp® 5700 SDS (Applied Biosystems) Observou-se desnaturação à temperatura de 84°C, em concordância com o esperado.

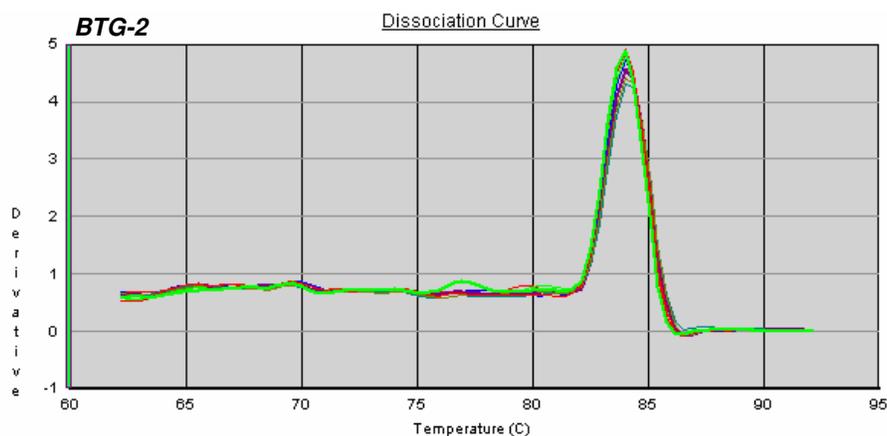


Figura 19- Temperatura de dissociação do produto amplificado de *BTG2*. Curva de dissociação do produto amplificado do gene *BTG2*, gerada pelo programa GeneAmp® 5700 SDS (Applied Biosystems). À temperatura de 84°C ocorre desnaturação do produto amplificado.

Foram então realizadas as reações para determinação da concentração ótima de *primer* a ser utilizada e da eficiência de reação. Na figura 20, está ilustrada a curva padrão da reação de amplificação do gene *ZFP36*, gerada pelo programa GeneAmp® 5700 SDS (Applied Biosystems). O coeficiente de inclinação da reta, ou *slope*, foi dado pelo programa e utilizado na fórmula $E = 10^{(-1/slope)}$ para cálculo da eficiência de reação, que está indicada na caixa ao lado da reta.

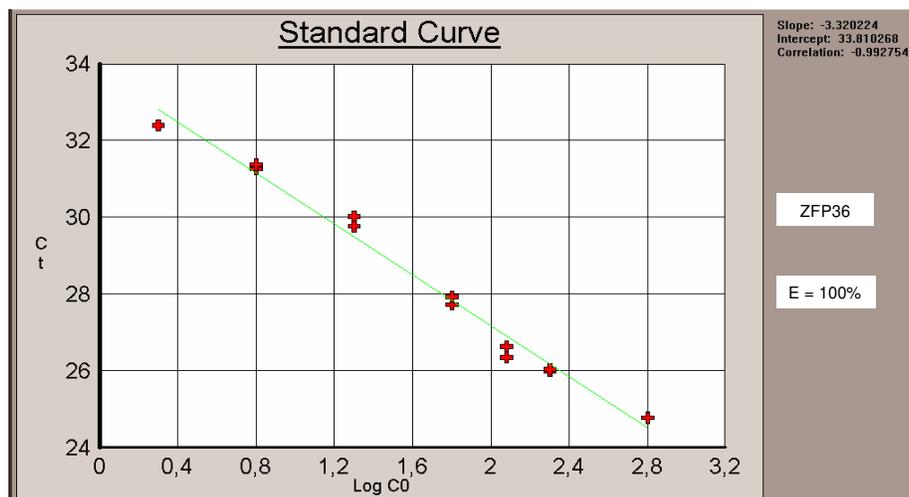


Figura 20- Curva padrão para a reação de amplificação do gene *ZFP36*. Em cada reação foram utilizados os *primers forward e reverse* na concentração final de 300nM e amostra em diluições seriadas de 0,5 log. A curva padrão e o coeficiente de inclinação da reta, ou *slope*, foram gerados pelo programa GeneAmp® 5700 SDS (Applied Biosystems). O *slope* foi utilizado na fórmula $E = 10^{(-1/slope)}$ para cálculo da eficiência de reação, que está indicada na caixa ao lado da reta.

C) Reações

Para validação dos resultados de SAGE, foram selecionados, além dos quatro genes acima citados, sete outros genes de interesse, cujas reações já haviam sido padronizadas no laboratório, para serem avaliadas por qRT-PCR. Como genes calibradores, foram utilizados *BAC*, *GAPDH* e *BCR* e os valores de expressão gênica normalizados foram calculados utilizando-se o *Genorm*. Na figura 21, estão apresentados gráficos com a expressão normalizada de cada gene de interesse (unidades arbitrárias), tanto para a amostra do paciente portador de PV, quanto para cada uma das três amostras controle analisadas.

Os genes *HBA*, *HBB*, *C3orf10*, *PRDX6*, *GPR137B*, *JUNB*, *ZFP36*, *BTG2* e *EGR1* apresentaram-se mais expressos no paciente com PV do que nos três controles (Figura 21). Já a expressão de *AHSP* mostrou-se maior nos controles do que no paciente com PV (Figura 21). Para o gene *CIQB*, se observou grande variação de expressão entre os controles, sendo a expressão no controle 2 maior do que nos outros. A expressão de *CIQB* no paciente com PV é similar à dos controles 1 e 3 (Figura 21).

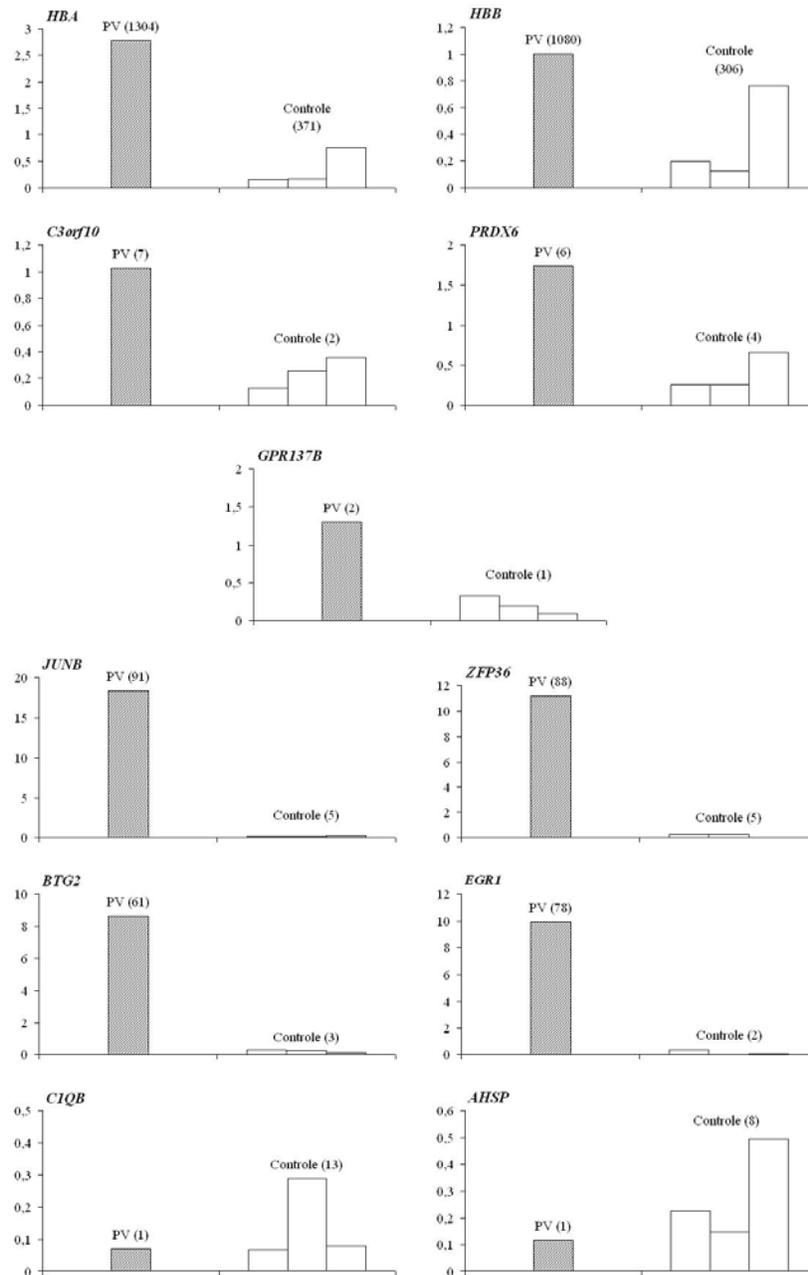


Figura 21- Gráficos de expressão dos genes *HBA*, *HBB*, *C3orf10*, *PRDX6*, *GPR137B*, *JUNB*, *ZFP36*, *BTG2*, *EGR1*, *CIQB* e *AHSP* obtidos por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). A quantidade de expressão de cada gene foi normalizada em relação à média geométrica dos genes calibradores *BAC*, *GAPDH* e *BCR*, por meio do programa *Genorm*. Os valores de expressão gênica normalizada obtidos, em unidades arbitrárias, estão indicados pelas barras, tanto para amostra do paciente portador de policitemia vera (PV), quanto para os indivíduos controle. Entre parênteses estão indicados os números de *tags* (por 50.000) detectadas nas bibliotecas SAGE PV ou SAGE MN.

Na figura 22, estão ilustrados gráficos para comparação dos resultados obtidos por SAGE e por qRT-PCR. Para cada gene, está representada a variação de expressão detectada entre PV e controle: genes mais expressos em PV têm valores positivos e os mais expressos no controle, valores negativos. Tanto por SAGE, quanto por qRT-PCR, observaram-se os genes *HBA*, *HBB*, *C3orf10*, *PRDX6*, *GPR137B*, *JUNB*, *ZFP36*, *BTG2* e *EGR1* mais expressos em PV e *CIQB* e *AHSP*, mais expressos no controle. Por meio de ambas as técnicas, evidenciou-se, dentre os genes mais expressos em PV, um grupo com grande variação de expressão: *JUNB*, *ZFP36*, *BTG2* e *EGR1*.

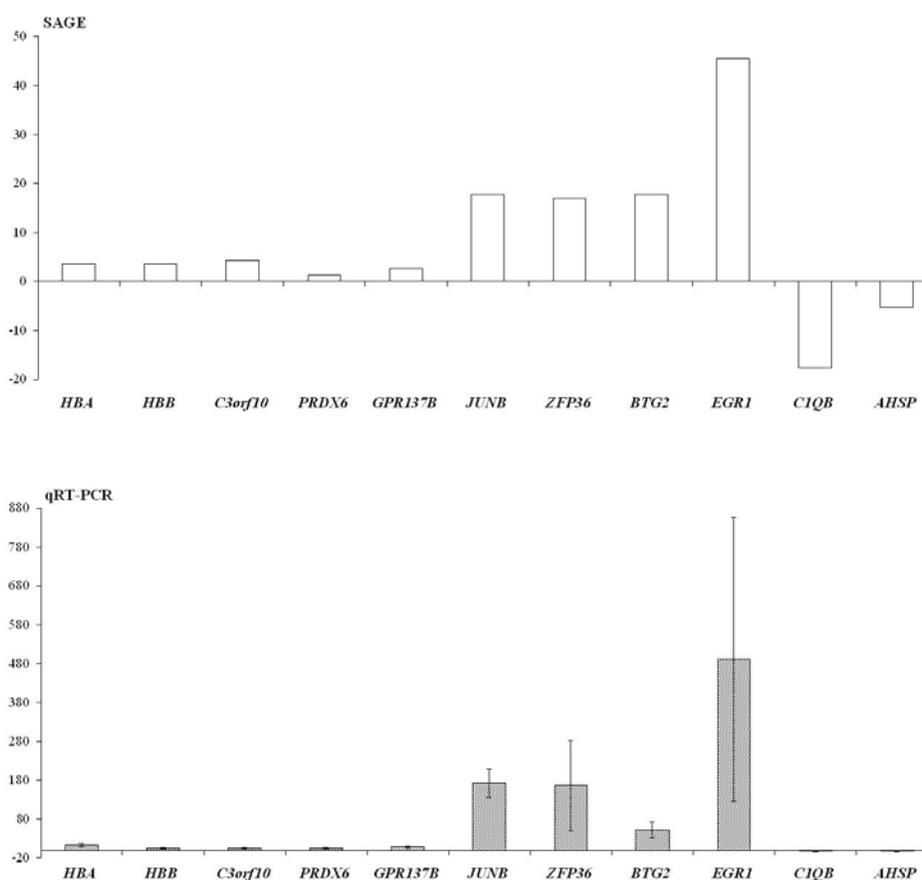


Figura 22- Comparação de resultados obtidos por *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE) e por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Gráficos de expressão dos genes *HBA*, *HBB*, *C3orf10*, *PRDX6*, *GPR137B*, *JUNB*, *ZFP36*, *BTG2*, *EGR1*, *CIQB* e *AHSP* obtidos por SAGE (painel superior) e por qRT-PCR (painel inferior). Os valores correspondem à variação de expressão detectada entre policitemia vera (PV) e controle: valores positivos indicam genes induzidos em PV, valores negativos, genes repressos em PV

4.3- Expressão gênica diferencial: PV X CONTROLE

Tendo sido caracterizados e validados os perfis globais de expressão gênica em PV e medula óssea normal, e dispondo-se ainda de uma biblioteca SAGE no banco de dados *SAGEmap*, também de células de medula óssea normal, estes foram comparados entre si, no intuito de se identificarem alterações que pudessem estar relacionadas à doença.

Usando os critérios descritos, foram encontradas 136 *tags* induzidas e 70 *tags* repressas em PV, estando estas informações resumidas na Tabela 9. Dentre as 136 *tags* induzidas em PV, 107 correspondiam a genes conhecidos, representando 104 transcritos diferentes. Das 70 *tags* repressas em PV, 61 correspondiam a genes conhecidos representando 60 transcritos diferentes.

Tabela 9- Identificação das *tags* diferencialmente expressas entre células da medula óssea de um paciente portador de policitemia vera e controle normal. *Tags* foram classificadas como: *no match* (não apresentam nenhuma identificação no *Unigene*), seqüências preditas (correspondem a ESTs, ORFs, clones de cDNA ou proteínas hipotéticas) ou genes conhecidos

	Expressão elevada em PV	Expressão diminuída em PV
<i>Tags</i> únicas	136	70
<i>No matches</i>	14 (10.3%)	4 (5.7%)
ESTs, ORFs, cDNAs, mRNAs e proteínas hipotéticas	15 (11.0%)	5 (7.1%)
Genes conhecidos	107 (78.7%)	61 (87.1%)
Transcritos diferentes	104	60

PV: policitemia vera, ESTs: *expressed sequence tags*, ORFs: *open reading frames*, cDNAs: DNA complementar, mRNA: RNA mensageiro

Os 104 transcritos induzidos em PV foram analisados segundo o sistema do *Geneontology consortium* (Tabela 10, Anexo7). Observou-se que cerca de 32 genes (33%) participam do processo de transdução de sinal, sendo que 17 fazem transdução de sinal ligada a receptor de superfície celular, 10 participam de cascatas de sinalização intracelular

e 4 têm papel regulador. Identificaram-se 8 genes que contribuem para o processo de diferenciação celular e 8 para proliferação celular. Foram encontrados 7 genes participantes do ciclo celular e 7 genes participantes da apoptose. Ainda, 12 genes participam da modificação de proteínas, dos quais 2 fazem desfosforilação e 6, fosforilação de aminoácidos. Encontrou-se que 25 genes participam da resposta imune, dentre os quais 10 fazem parte da resposta inflamatória. Com relação à regulação da transcrição, foram encontrados 14 genes envolvidos neste processo.

4.4- Gene *JUNB* em PV

Um dos genes implicados em regulação da transcrição foi *JUNB*, que codifica um membro do complexo AP-1. Além do aumento de expressão observado em células de medula óssea de um paciente com PV positivo para *JAK2* V617F, evidências anteriores indicam que *JAK2* pode contribuir para indução de *JUNB* (Sakai I et al., 1995) e que a expressão tardia de *JUNB* está relacionada à diferenciação eritróide (Jacobs-Helber SM et al., 2002). Assim, pareceu interessante investigar a expressão de *JUNB* em células hematopoéticas de outros pacientes com PV *JAK2* V617F-positivos, a relação entre a expressão de *JUNB* e a mutação *JAK2* V617F e o papel do gene na eritropoese.

A) Perfil de expressão gênica de *JUNB* em células hematopoéticas

A quantidade de expressão de *JUNB* foi determinada por qRT-PCR e normalizada em relação à média geométrica dos genes calibradores *BAC* e *GAPDH*, por meio do programa *Genorm*. Os valores de expressão gênica normalizada obtidos, em unidades arbitrárias, para pacientes com PV e controles, estão apresentados em *box plots*.

A.1 – Células totais de medula óssea

Para se confirmar o aumento de expressão de *JUNB* observado por SAGE e qRT-PCR em células de medula óssea de um paciente com PV, dois outros pacientes *JAK2* V617F-positivos foram estudados. Após obtenção de amostra de medula óssea por punção aspirativa, as células totais foram obtidas, o RNA total extraído e transcrito em cDNA, submetido então à qRT-PCR. Ambos os pacientes apresentaram expressão elevada de *JUNB* em relação aos controles. No caso do paciente 1, observou-se que a expressão de

JUNB era cerca de 5 vezes maior no paciente do que nos controles. Já no paciente 2, esta razão era de cerca 150 vezes (Figura 23).

A.2 - Leucócitos totais de sangue periférico

Verificamos, a seguir, se esta diferença estaria também presente em células do sangue periférico. Para tanto, foram estudados seis pacientes com PV portadores da mutação *JAK2* V617F e seis controles. Após obtenção de amostra de sangue periférico, os leucócitos foram separados, o RNA total extraído e transcrito em cDNA, submetido então à qRT-PCR. Foi demonstrada diferença significativa de expressão de *JUNB* entre pacientes e controles (Mann-Whitney, $p = 0,0022$), sendo a expressão cerca de treze vezes maior no grupo de pacientes (Figura 23).

A.3 - Granulócitos

Ainda, com objetivo de avaliar a expressão de *JUNB* em diferentes tipos celulares hematopoéticos, células da linhagem granulocítica foram obtidas a partir de sangue periférico de 14 pacientes com PV portadores da mutação *JAK2* V617F e de 14 controles. As lâminas confeccionadas por citospin foram conferidas em microscópio para se verificar a qualidade da separação. Observou-se que mais de 95% das células eram, de fato, de linhagem granulocítica, como neutrófilos, basófilos e eosinófilos, ilustrados na figura 24. O RNA total foi extraído, transcrito em cDNA, sendo então submetido à qRT-PCR. Analisando-se os resultados, observou-se que a expressão de *JUNB* era ligeiramente menor em granulócitos de pacientes com PV do que nos de controle, no entanto, esta diferença não foi significativa (Mann-Whitney, $p = 0,1636$) (Figura 23).

A.4 - Células mononucleares

Do mesmo modo, a fração mononuclear foi obtida a partir de sangue periférico dos mesmos 13 pacientes com PV portadores da mutação *JAK2* V617F e 14 controles. As lâminas confeccionadas por citospin foram conferidas em microscópio para se verificar a qualidade da separação. Observou-se que mais de 94% das células eram, de fato, mononucleares, como linfócitos e monócitos, ilustrados na figura 25. Nesta fração encontram-se também as células progenitoras hematopoéticas. O RNA total foi extraído,

transcrito em cDNA e submetido à qRT-PCR. Os resultados mostraram diferença significativa (Mann-Whitney, $p = 0,0033$) na expressão de *JUNB*, sendo, em média, três vezes maior em células mononucleares de pacientes com PV do que em controles (Figura 23).

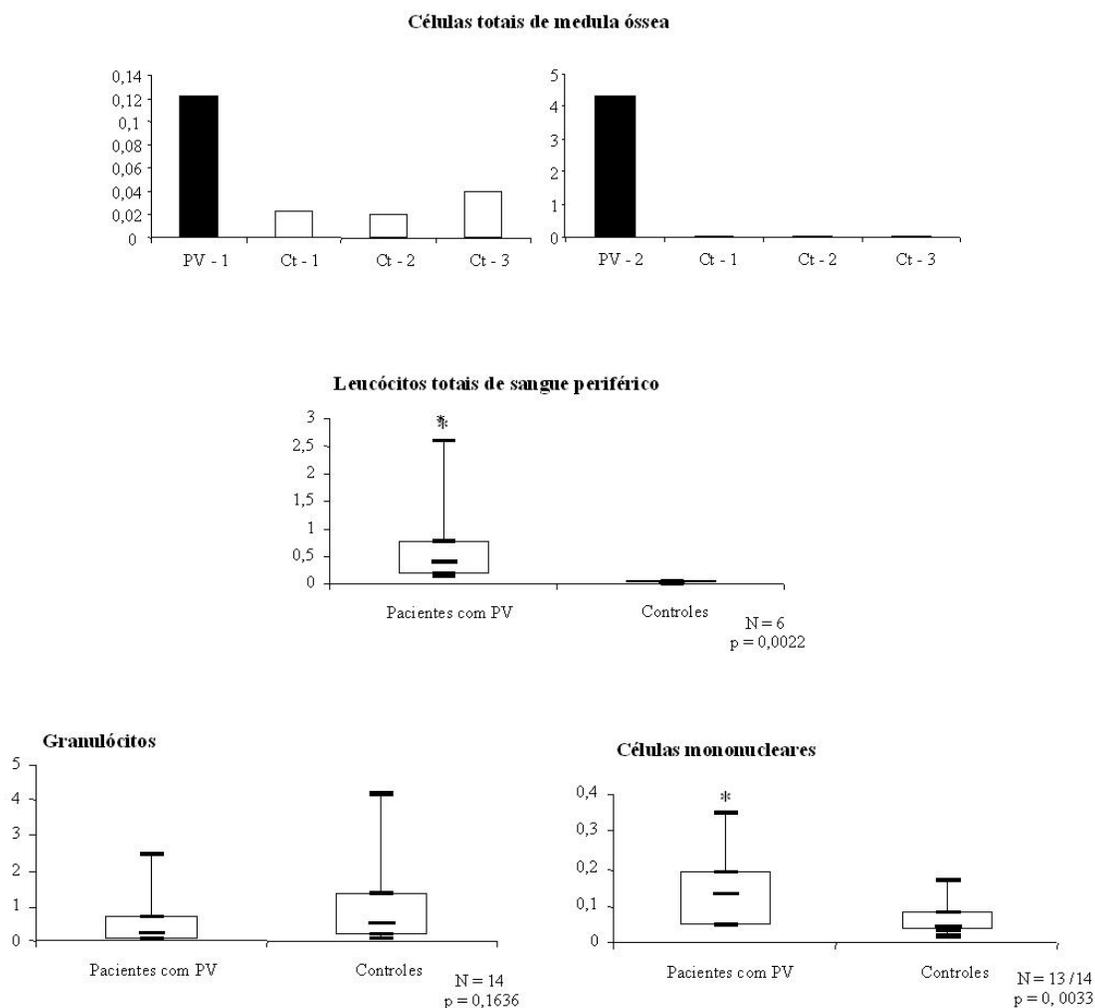


Figura 23- Expressão de *JUNB* em células hematopoéticas. Quantificação de *JUNB* por qRT-PCR. A quantidade de expressão de *JUNB* foi normalizada em relação à média geométrica dos genes calibradores *BAC* e *GAPDH*, por meio do programa *Genorm*. Os valores de expressão gênica normalizada obtidos, em unidades arbitrárias, para pacientes com policitemia vera (PV) e controles, estão apresentados em *box plots*. Analisaram-se células totais de medula óssea de dois pacientes com PV e três controles normais, leucócitos de sangue periférico de seis pacientes com PV e seis controles normais, granulócitos de 14 pacientes com PV e 14 controles normais e células mononucleares de 13 pacientes com PV e 14 controles normais. Todos os pacientes com PV eram positivos para a mutação *JAK2 V617F*

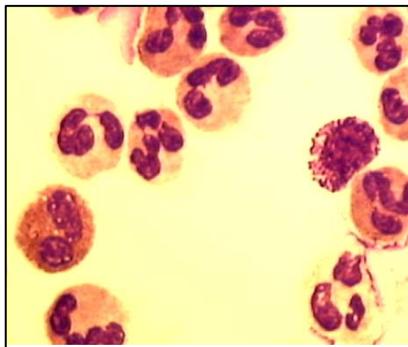


Figura 24- Células da linhagem granulocítica. Fotografia de uma lâmina, visualizada em microscópio óptico sob aumento de 400X, contendo células da linhagem granulocítica, separadas conforme protocolo descrito em Material e Métodos. Observou-se maioria de neutrófilos (células com núcleo multilobulado), mas também se observaram eosinófilos (no meio, à esquerda, célula com citoplasma alaranjado) e basófilos (no meio, à direita, célula com núcleo grande e granulação grosseira)

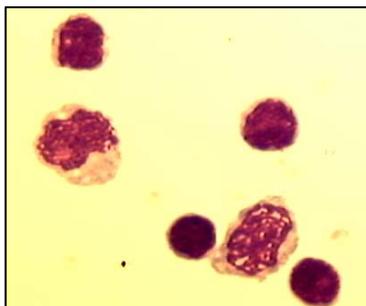


Figura 25- Células mononucleares. Fotografia de uma lâmina, visualizada em microscópio óptico sob aumento de 400X, contendo células da linhagem mononuclear, separadas conforme protocolo descrito em Material e Métodos. Observou-se maioria de linfócitos (células com núcleo condensado, fortemente corado, de citoplasma escasso), mas também se observaram monócitos (células com núcleo maior, cromatina frouxa)

A.5 - Células CD34+

A expressão de *JUNB* foi quantificada por qRT-PCR em células CD34+ purificadas de um controle e quatro pacientes *JAK2* V617F-positivos (dois pacientes com PV e dois pacientes com MF). A expressão do mRNA de *JUNB* parece ser maior em células CD34+ dos pacientes (Figura 26), no entanto, outros controles e pacientes precisariam ser avaliados para confirmação destes resultados.

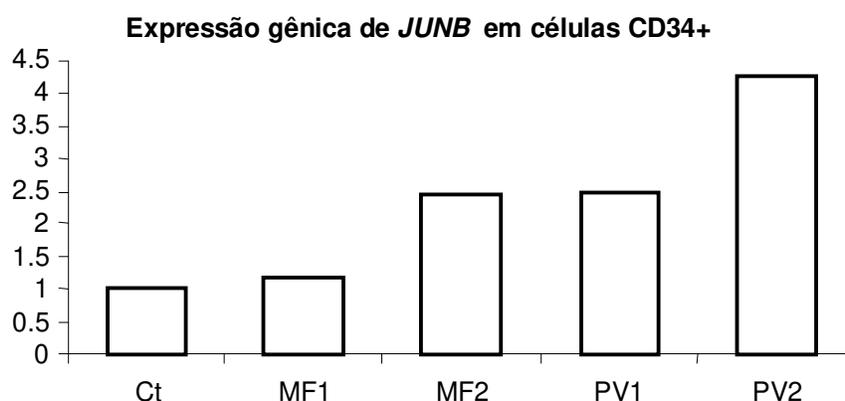


Figura 26- Expressão de *JUNB* em células CD34+. Expressão gênica de *JUNB* detectada por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real em células CD34+ isoladas de um controle (Ct), dois pacientes com mielofibrose idiopática (MF) e dois com policitemia vera (PV). *HPRT* foi usado como gene de referência e a expressão gênica nos pacientes foi referida ao controle, utilizando-se o método delta-delta Ct

B) Expressão gênica e protéica de JunB em resposta à EPO

Para se verificar a cinética de expressão de *JUNB* em resposta à EPO e analisar o efeito da mutação de *JAK2* na expressão de *JUNB*, utilizaram-se como modelos experimentais as células murinas Ba/F3-REPO, responsivas à EPO, e eritrócitos cultivados *in vitro*.

B.1 - Resposta de células Ba/F3-REPO à EPO

Em condições normais de cultura (10% SFB, 1U de EPO/ml), células Ba/F3-REPO transformadas com *JAK2* V617F apresentaram maior expressão da proteína JunB do que células Ba/F3-REPO parentais ou transformadas com *JAK2* WT, como detectado por *Western Blot* (Figura 27A). A expressão da proteína β -actina foi detectada como controle em todas as análises feitas por *Western Blot*. Após seis horas de deprivação de SFB e EPO, a expressão de JunB mostrou-se evidentemente maior em células Ba/F3-REPO transformadas com *JAK2* mutado (Figura 27A). De forma similar, a quantidade de mRNA *JUNB* em células com *JAK2* V617F mostrou-se duas vezes maior do que em células parentais ou com *JAK2* WT, em estado basal e em deprivação (Figure 27B).

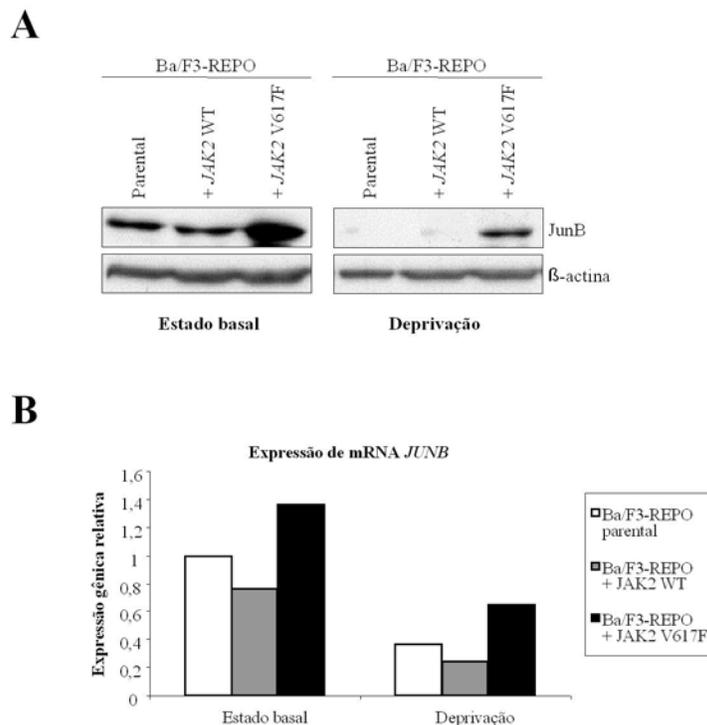


Figura 27- Expressão de *JUNB* em células Ba/F3-REPO em estado basal de cultura e deprivação.

Expressão de *JUNB* em células Ba/F3-REPO parentais, transformadas com *JAK2* WT ou *JAK2* V617F, em estado basal de cultura e após seis horas de deprivação **A**) Expressão protéica, detectada por *Western Blot* **B**) Expressão gênica de *JUNB*, detectada por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real, normalizada em relação à expressão de *GAPDH* e calculada em referência à linhagem Ba/F3-REPO parental, estado basal, pelo método delta-delta Ct.

Após seis horas de deprivação, as células foram restimuladas com 10U de EPO/ml. Observou-se que células Ba/F3-REPO parentais e transformadas com *JAK2* WT responderam rapidamente à EPO, apresentando níveis máximos de mRNA *JUNB* 30min após a restimulação, como detectado por qRT-PCR, utilizando-se *GAPDH* como gene referência (Figura 28A). Células Ba/F3-REPO transformadas com *JAK2* V617F apresentaram resposta similar e níveis máximos de mRNA *JUNB* foram observados 1h após a restimulação. Ao contrário da expressão gênica, mudanças na expressão da proteína JunB devido à EPO, mostraram-se evidentemente diferente entre as linhagens. Observou-se que células Ba/F3-REPO parentais e células transformadas com *JAK2* WT apresentaram expressão máxima três horas após a restimulação com EPO (Figura 28B e 28C). Neste ponto, a quantidade de proteína JunB eram duas vezes maiores que no tempo 0, para as duas linhagens (Figura 28C). Já as células Ba/F3-REPO transformadas com *JAK2* V617F não apresentaram aumento expressivo de JunB após restimulação, uma vez que os níveis basais (deprivação ou tempo 0) de expressão desta proteína já se mostravam elevados (Figura 28B e figura 27A). A fosforilação de STAT5 foi verificada como controle da restimulação, pois esta proteína é rapidamente ativada pelo adição de EPO. Células Ba/F3-REPO transformadas com *JAK2* V617F apresentaram fosforilação constitutiva de STAT5 (Figura 28B).

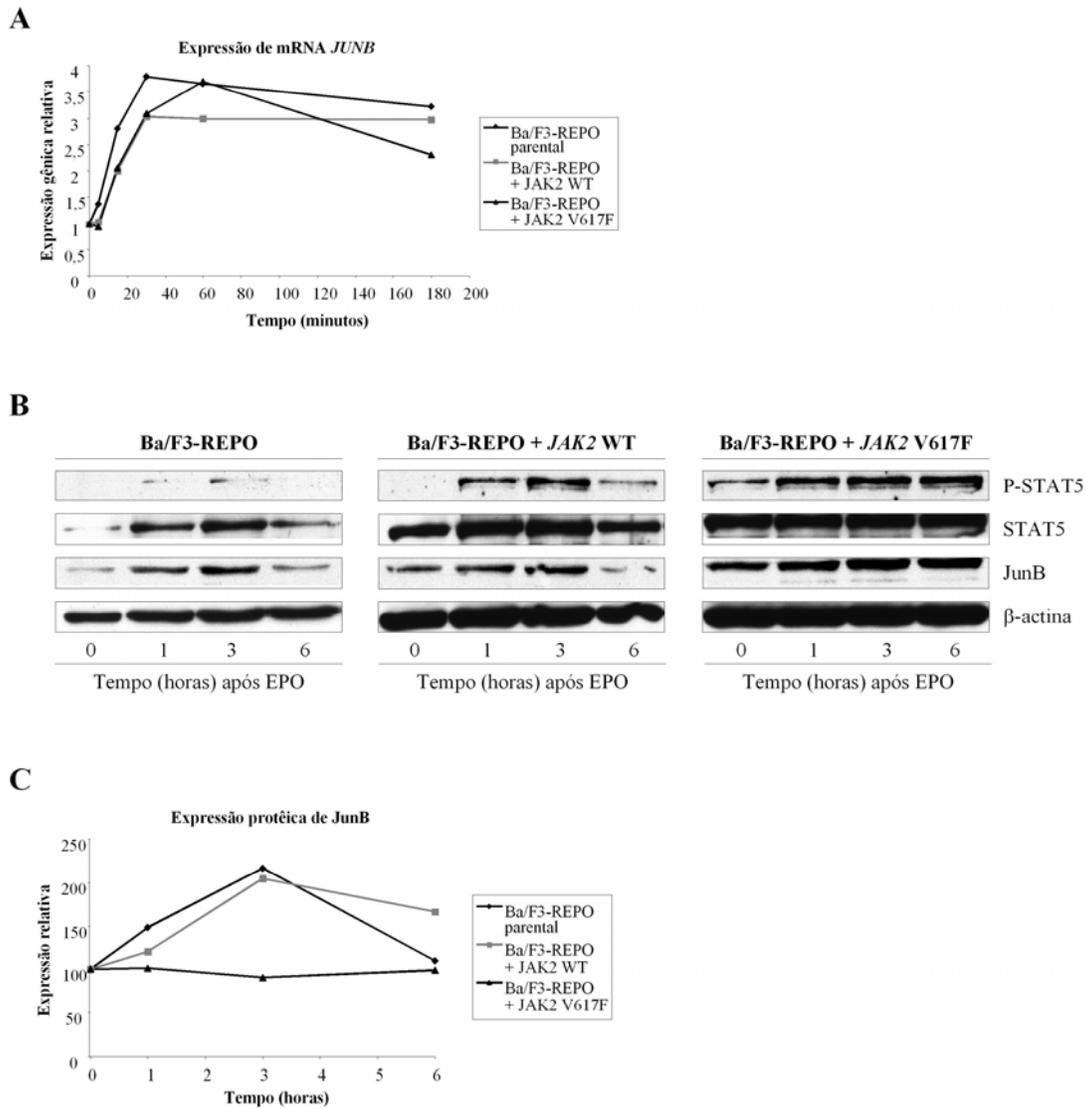


Figura 28- Expressão de *JUNB* em células Ba/F3-REPO em resposta à eritropoetina (EPO). Após seis horas de deprivação de soro e EPO (tempo 0), células Ba/F3-EPOR parentais ou transformadas com *JAK2* WT ou *JAK2* V617F foram restimuladas com 10U de EPO/ml **A)** Expressão gênica de *JUNB*, detectada por reação em cadeia da polimerase em tempo real 5, 15, 30min, 1h e 3h após adição de EPO, normalizada em relação ao gene *GAPDH* e calculada em referência ao tempo 0 de cada linhagem Ba/F3-REPO pelo método delta-delta Ct. **B)** Expressão protéica de JunB, P-STAT5, STAT5 e β -actina, detectada por *Western Blot* 30min, 1h, 3h e 6h após adição de EPO **C)** Aumento na razão JunB/ β -actina, quantificado após *Western Blot*, por meio do programa Image J 30min, 1h, 3h e 6h após adição de EPO (média de dois experimentos)

B.2 - Resposta de eritroblastos à EPO

Para estudo da linhagem eritrocitária, realizou-se a proliferação de eritroblastos *in vitro*, conforme protocolo descrito. A diferenciação das células da linhagem eritróide pode ser acompanhada visualizando-se nas lâminas confeccionadas as mudanças morfológicas ocorridas. No sétimo dia de cultura, a maioria das células eram unidades formadoras de colônia eritróide (CFU-Es) e pró-eritroblastos, células grandes, com núcleo volumoso, cromatina frouxa e nucléolos evidentes (Figura 29A). No décimo dia de cultura, predominaram eritroblastos basófilos, células com citoplasma basofílico e cromatina mais condensada (Figura 29B). Já no décimo terceiro dia, a maioria das células apresentou citoplasma acidofílico, com núcleo condensado. Observaram-se diferentes estágios de maturação, com o núcleo próximo à membrana celular (núcleo periférico) e posterior enucleação (Figura 29C).

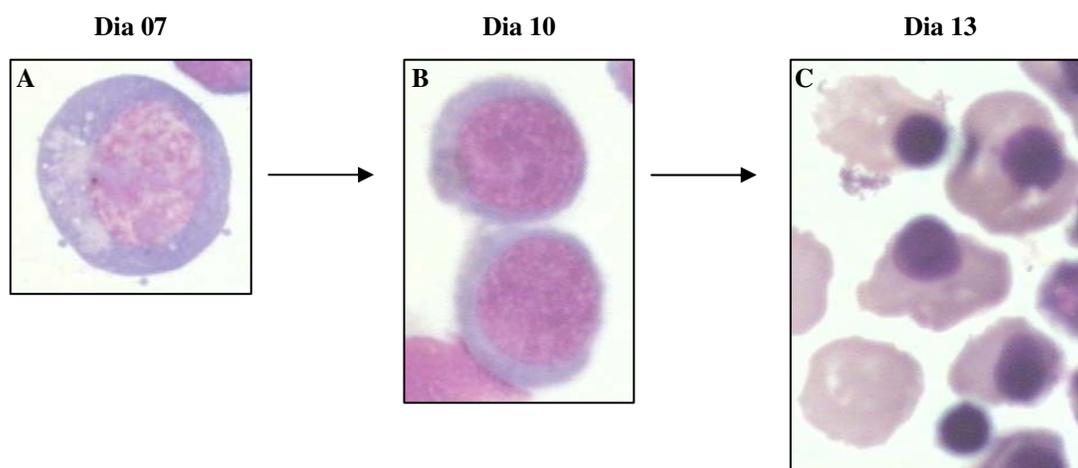


Figura 29- Diferenciação eritróide – morfologia celular. Fotografia de lâminas, visualizadas em microscópio óptico sob aumento de 1000X, contendo células coletadas ao longo de cultura de eritroblastos, ilustrando a diferenciação eritróide **A)** pró-eritroblastos, abundantes no sétimo dia de cultura **B)** eritroblastos basófilos, abundantes no décimo dia de cultura **C)** eritroblastos acidófilos, abundantes no décimo terceiro dia de cultura, quando se observaram células com núcleo periférico e células em que houve enucleação

De outro modo, o processo de diferenciação eritróide pode ser acompanhado visualizando-se por citometria de fluxo as mudanças ocorridas na expressão de marcadores de superfície celular. No sétimo dia de cultura, a maioria das células expressaram o marcador CD36 e uma parte da população já expressava o marcador eritróide de superfície celular glicoforina (Gpa) (Figura 30A). No décimo dia de cultura, a maioria da população apresentou-se fortemente marcada pelos anticorpos anti-CD36 e anti-glicoforina (Figura 30B). Já no décimo terceiro dia, observou-se que uma parte da população eritróide (positiva para Gpa) é composta de células maduras, que perderam o marcador CD36 (Figura 30C).

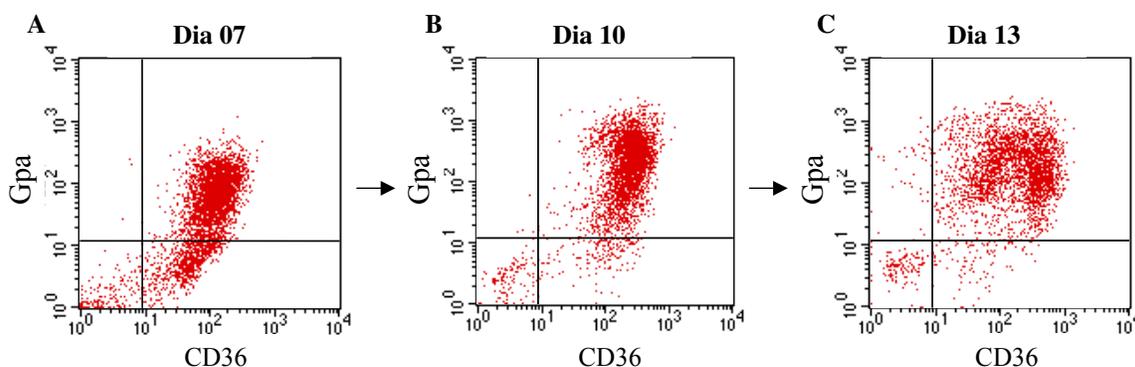


Figura 30- Diferenciação eritróide – marcadores de superfície celular. Citometria de fluxo para análise de células coletadas ao longo de cultura de eritroblastos, ilustrando a diferenciação eritróide **A**) no sétimo dia de cultura a maior parte da população foi marcada por anticorpo anti – CD36, marcador de células jovens **B**) no décimo dia de cultura a maior parte da população foi duplamente marcada, por anticorpo anti – CD36 e anticorpo anti – receptor de glicoforina **A**) no décimo terceiro dia de cultura a população apresentou-se fortemente marcada por anticorpo anti – Gpa e observou-se uma pequena população já negativa para CD36

Células eritróides cultivadas em sistema líquido, por sete ou dez dias, foram analisadas em seu estado basal de cultura (10% SFB, 50ng/ml SCF, 1U/ml IL3, 1U/ml EPO), quatro horas após deprivação (sem SFB, sem citocinas) e três horas após restimulação com EPO (10U/ml) com relação à expressão protéica de JunB. A expressão de β -actina foi quantificada como controle. A fosforilação de STAT5 (P-STAT5) foi

verificada como controle da restimulação com EPO. Células eritróides obtidas de dois controles não portador de síndrome mieloproliferativa apresentaram diminuição da expressão de JunB devido à deprivação, enquanto células eritróide obtidas de dois pacientes com PV e um paciente com MF, positivos para a mutação *JAK2 V617F* apresentaram expressão constante de JunB. Além disso, nas células obtidas dos pacientes com PV ou MF positivos para *JAK2 V617F*, observou-se fosforilação de STAT5 mesmo em deprivação (Figura 31).

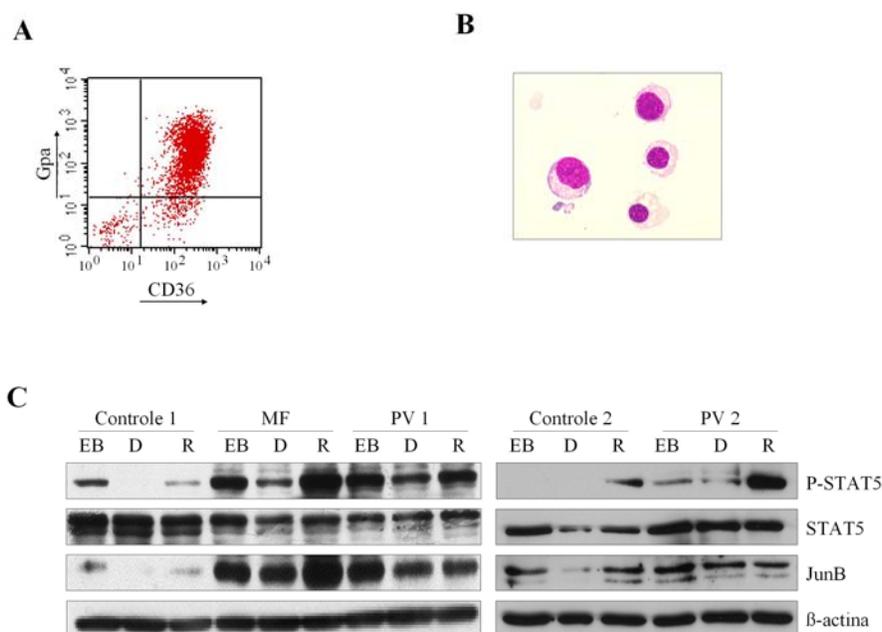


Figura 31- Expressão de JunB em eritroblastos, em estado basal de cultura, deprivação e em resposta à eritropoetina (EPO). Células CD34+ de 2 controles e de 3 pacientes *JAK2 V617F*-positivos: 2 com policitemia vera (PV) e 1 com mielofibrose (MF) foram cultivadas em sistema de cultura líquida eritróide por 7 ou 10 dias **A**) Análise por citometria de células eritróides no dia 10, onde se vêem células duplo-positivas para os anticorpos CD36 e Gpa **B**) Citospin de eritroblastos no dia 10, após coloração May-Grunwald-Giemsa **C**) Expressão protéica de JunB, β-actina, P-STAT5 e STAT5 em eritroblastos cultivados por 7 ou 10 dias. As células foram analisadas em estado basal (1U de EPO/ml) (SS), após quatro horas de deprivação de EPO (D) e três horas após restimulação com EPO (10U de EPO/ml) (R)

C) Inibição de vias de sinalização

Dadas as evidências de que a expressão de *JUNB* poderia estar relacionada ao *status* de *JAK2*, investigou-se diretamente a relação entre a expressão de JunB e a mutação. Para tanto, células Ba/F3-EPOR expressando *JAK2* V617F foram estudadas em deprivação de EPO. Nestas condições a forma ativa de *JAK2* é *JAK2* V617F.

C.1 - AG490: inibidor de JAK2

Células Ba/F3-REPO transformadas com *JAK2* V617F foram incubadas durante seis horas em deprivação e em presença de concentrações crescentes de AG490 (0, 10, 25, 50, 75 or 100 μ M). AG490 é um inibidor da fosforilação de *JAK2* e, portanto, de sua atividade. Como a principal molécula ativada por *JAK2* em resposta à EPO é STAT5, realizou-se a quantificação de sua forma fosforilada (P-STAT5) como controle da inibição de *JAK2*. Observou-se neste experimento que quanto maior a concentração do inibidor de *JAK2*, menor a expressão de JunB detectada (Figura 32A). Na concentração de 25 μ M AG490, observaram-se aproximadamente 50% dos níveis basais de JunB (Figura 32B).

C.2 - LY294002: inibidor da via PI3K/AKT

Duas das vias acionadas por *JAK2* ativada e que estão constitutivamente ativas em presença da mutação são PI3K/AKT e MEK/ERK (James C et al., 2005). Para investigar o papel destas vias na expressão de JunB, células Ba/F3-REPO transformadas com *JAK2* V617F foram incubadas durante seis horas em deprivação e em presença de concentrações crescentes de LY294002 (0, 5, 10 or 25 μ M). LY294002 é um inibidor da via PI3K/AKT, uma das vias mais ativadas por *JAK2* em resposta à EPO. A quantidade de proteína AKT fosforilada (P-AKT) foi verificada como controle. Também neste caso observou-se que quanto maior a concentração do inibidor, menor a quantidade de JunB detectada (Figura 32C).

C.3 - PD98059: inibidor da via MEK/ERK

Células Ba/F3-REPO transformadas com *JAK2* V617F foram incubadas durante seis horas em deprivação e em presença de concentrações crescentes de PD98059 (0, 5 or 10 μ M). PD98059 é um inibidor da via MEK/ERK, outra importante via de

sinalização ativada por JAK2. A quantidade de proteína ERK fosforilada (P-ERK) foi verificada como controle. Conforme já observado para os outros inibidores, quanto maior a concentração de PD98059, menor a quantidade de JunB detectada (Figura 32D).

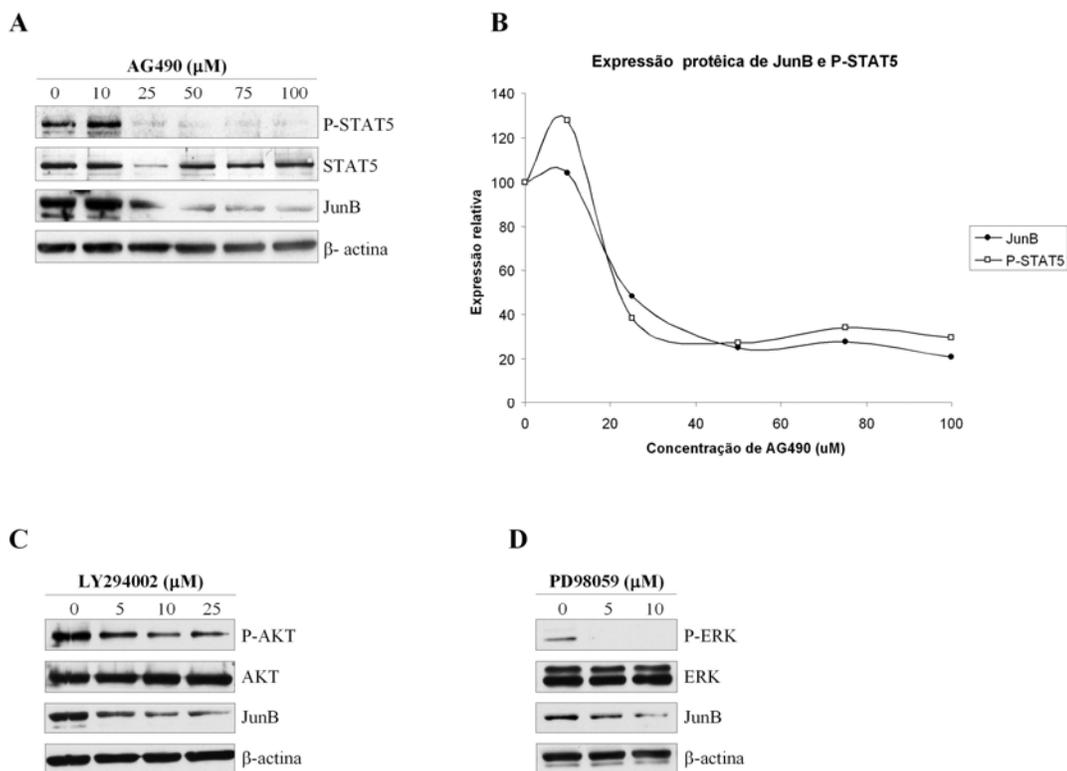


Figura 32- Expressão de JunB em células Ba/F3-REPO transformadas com JAK2 V617F em resposta a inibidores de vias de sinalização. Células Ba/F3-EPOR expressando JAK2 V617F foram incubadas por seis horas em deprivação de EPO, com concentrações crescentes de AG490 (inibidor de JAK2), LY294002 (inibidor de PI3K) ou PD98059 (inibidor de MEK) **A**) Expressão protéica de JunB, β-actina, P-STAT5 e STAT5, na presença de 0, 10, 25, 50, 75 ou 100μM AG490, detectada por *Western blot* **B**) Diminuição na razão JunB/β-actina devido à concentrações crescentes de AG490, quantificada após *Western Blot* por meio do programa Image J **C**) Expressão protéica de JunB, β-actina, P-AKT e AKT, na presença de 0, 5, 10 ou 25μM LY294002 **D**) Expressão protéica de JunB, β-actina, P-ERK e ERK, na presença de 0, 5 ou 10μM PD98059

D) O papel de *JUNB* na eritropoese

Para se avaliar o papel de JunB na eritropoese, precursores eritróides cultivados *in vitro* por 4 dias foram infectados com vetor lentiviral contendo shRNA para *JUNB*. No dia seguinte (dia 5), células GFP⁺/CD34⁺/CD36⁺ e GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻ foram separadas por citometria de fluxo após imunomarcagem e foram analisadas quanto a seu potencial proliferativo e clonogênico. A redução na expressão de JunB foi confirmada por *Western Blot*, mostrando cerca de 11% e 61% de inibição de proteína JunB com o sh*JUNB2* e sh*JUNB3*, respectivamente, comparados ao shSCR (Figura 33A).

Para o ensaio de proliferação, número iguais de células sh*JUNB*- ou SCR- GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻ foram cultivadas no sistema de cultura líquida eritróide descrito. Após nove dias, o sh*JUNB3* provocou uma amplificação das células muito menor do que o shSCR nas células derivadas do controle, enquanto o sh*JUNB2* não apresentou efeitos significativos (Figura 33B). No entanto, ambos os shRNAs foram capazes de inibir a proliferação eritróide dos dois pacientes *JAK2* V617F-positivos analisados (um paciente com PV, um paciente com MF) (Figura 33B). Este resultado sugere que a eritropoese em presença de *JAK2* V617F é mais sensível à inibição de JunB que a eritropoese normal.

Além disso, estudou-se também a formação de colônias eritróides, plaqueando-se células progenitoras GFP⁺/CD34⁺/CD36⁺ ou GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻ em metilcelulose, na presença de EPO (Figura 34). Após quatorze dias, observou-se que o sh*JUNB3* inibiu o crescimento de colônias eritróides, tanto para controles, quanto para pacientes (Figura 33C). O sh*JUNB2* inibiu a formação de colônias apenas em dois dos três pacientes estudados e não teve efeito nas células dos controles (Figura 33C). Ainda, investigou-se o status de *JAK2* das colônias eritróides de um paciente, após tratamento com shRNAs. A diminuição dos níveis de JunB causada pelo sh*JUNB3* reduziu drasticamente o crescimento de progenitores *JAK2* V617F homozigotos e aumentou o crescimento de colônias *JAK2* WT, quando comparado ao status das colônias infectadas por shSCR (Figura 33D). Para confirmar estes resultados, estudou-se o efeito do sh*JUNB3* na formação de colônias eritróides endógenas (CEE), que na maioria das vezes derivam de progenitores homozigotos para a mutação. Para isso, células GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻ de três pacientes *JAK2* V617F-positivos foram plantadas em metilcelulose, na ausência de EPO. Observou-se que

o sh*JUNB3* causou uma redução marcante da formação de CEE (Figura 33E). Considerando que dados anteriores mostraram que o silenciamento de Bcl-xL e STAT5 inibem a diferenciação terminal independente de EPO de células de pacientes com PV (Garçon L et al., 2006), especulou-se se *JUNB* não regularia Bcl-xL. Para se investigar esta hipótese, analisou-se a expressão protéica de Bcl-xL em precursores eritróides de um paciente com PV, infectados com shSCR, sh*JUNB2*, ou sh*JUNB3*, 10 dias após a infecção. O silenciamento de JunB com sh*JUNB2* ou sh*JUNB3* causou diminuição da expressão de Bcl-xL (Figura 33F). Este resultado sugere que *JUNB* seria responsável pelos níveis protéicos de Bcl-xL na eritropoese.

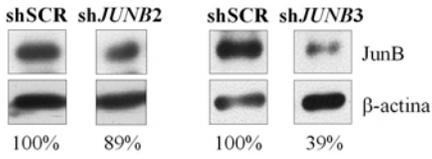
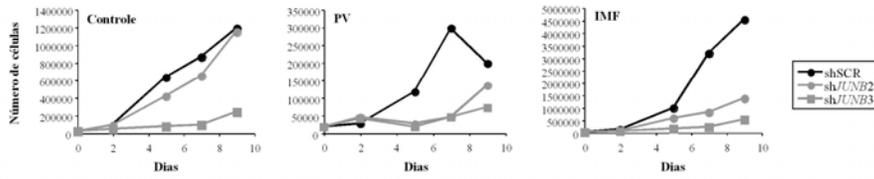
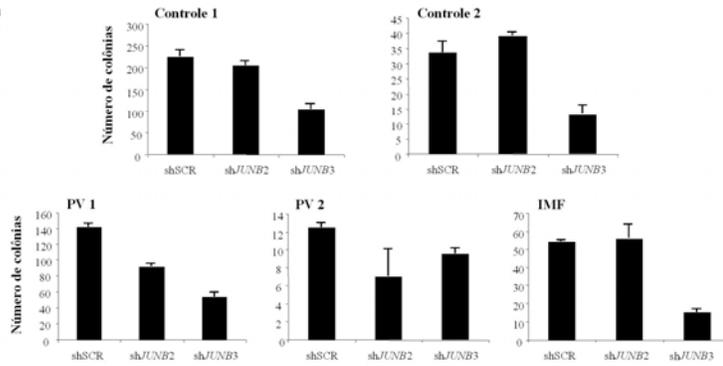
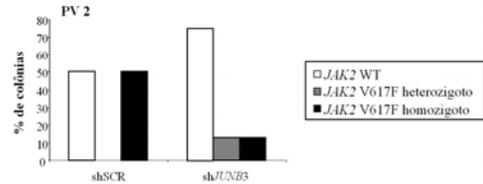
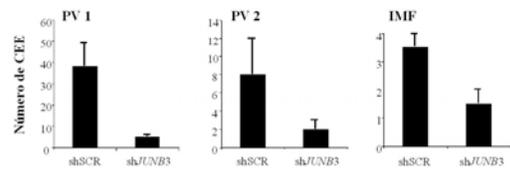
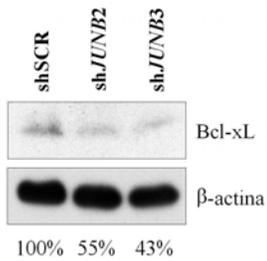
A**B****C****D****E****F**

Figura 33- Efeito da inibição da expressão de JunB sobre a proliferação e potencial clonogênico de progenitores eritróides humanos e formação de colônias eritróides endógenas (CEE). Precusores eritróides foram infectados ao quarto dia de cultura com vetores lentivirais contendo shRNA para interferência de *JUNB* ou shRNA SCR (controle). No dia seguinte (dia 5), células GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻ foram selecionadas por citometria de fluxo após imunomarcção

A) Expressão de JunB em células eritróides, analisadas por *Western blot* nove dias após infecção com shSCR, sh*JUNB2* ou sh*JUNB3*. A quantificação foi feita utilizando-se o programa ImageJ

B) Taxa de proliferação verificada por nove dias em células eritróides de um controle e dois pacientes: um paciente com policitemia vera (PV) e um paciente com mielofibrose (MF), infectadas com shSCR, sh*JUNB2* ou sh*JUNB3*

C) Formação de colônias eritróides em dois controles e três pacientes (PV1, PV2, MF). Mil células GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻, infectadas com shSCR, sh*JUNB2* ou sh*JUNB3*, foram plantadas em metilcelulose. Colônias eritróides foram contadas após quatorze dias

D) Quantificação de *JAK2* V617F em colônias eritróides de um paciente com PV, utilizando-se sondas fluorescentes competitivas para reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

E) Formação de CEE em três pacientes (PV1, PV2, IMF). Cinco mil progenitores GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻, infectados com shSCR, sh*JUNB2* ou sh*JUNB3*, foram plantadas em metilcelulose. Colônias eritróides foram contadas após quatorze dias

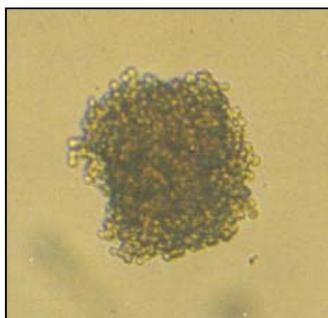


Figura 34- Colônias eritróides. Fotografia realizada por visualização em microscópio óptico sob aumento de 100X de colônias eritróides, formadas em metilcelulose suplementada com soro fetal bovino, *stem cell factor* e eritropoetina, após 14 dias de cultivo de progenitores GFP⁺/CD34⁺/CD36⁺ ou GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻

5- DISCUSSÃO

“Quando o dedo aponta o céu, o tolo olha para o dedo”

**Provérbio chinês,
no filme “O fabuloso destino d’Amélie Poulin”**

Durante décadas de pesquisas em SMPs, diversos aspectos biológicos e moleculares dos progenitores hematopoéticos de pacientes foram revelados. No entanto, foi apenas em 2005 que se identificou a primeira mutação recorrente em pacientes com PV, TE e MF.

A descoberta de *JAK2* V617F em pacientes com SMP impactou de forma direta e imediata a pesquisa nesta área. Neste sentido, tornou-se imprescindível para este estudo, já em andamento, a padronização rápida de uma técnica para detecção de *JAK2* V617F. Desta forma, por sua simplicidade e baixo custo, dentre as metodologias descritas nos primeiros artigos, escolheu-se a PCR seguida de digestão. Atualmente, diversas técnicas para detecção de *JAK2* V617F têm sido desenvolvidas, testadas e validadas quanto a sua sensibilidade e especificidade (Campbell PJ et al., 2006c; James C et al., 2006; Jones AV et al., 2005; McClure R et al., 2006). Estima-se que a sensibilidade do teste possa ser afetada tanto pelo tipo celular (neutrófilos *versus* outras células), quanto pelo ácido nucleico extraído (DNA genômico *versus* RNA) da amostra a ser analisada (Tefferi A e Pardanani A, 2006). Espera-se que comparações entre as técnicas sejam realizadas para esclarecimento destas questões.

A genotipagem de *JAK2* deverá em breve tornar-se fundamental para a prática clínica, ou seja, diagnóstico, prognóstico e terapia destas doenças. Por isso, até que uma técnica mais sensível seja implantada, a metodologia padronizada neste estudo vem sendo testada e aplicada como potencial exame de rotina em pacientes com SMP atendidos no Hemocentro da UNICAMP. Um resultado positivo para *JAK2* V617F tem significado claramente distinto para PV, TE e MF, porém parece ser relevante para o estabelecimento de novos critérios diagnósticos para as três doenças. Recentemente, clínicos, cientistas e patologistas especializados na área propuseram uma revisão dos critérios da OMS (Tefferi A et al., 2007). Conforme previamente exposto, a mutação *JAK2* V617F é específica para doenças mielóides neoplásicas, e sua detecção exclui policitemia secundária ou trombocitose/mielofibrose decorrentes de outras doenças (Tefferi A et al., 2007). *JAK2* V617F ou mutações no éxon 12 de *JAK2* estão presentes em virtualmente todos os pacientes com PV. Por isso, na nova proposta, é considerada como um critério maior, substituindo a maioria dos critérios A e B atuais da OMS (Tefferi A et al., 2007) e

simplificando drasticamente o diagnóstico desta doença. Por outro lado, em TE e MF a mutação está presente em cerca de 50% dos pacientes e sua detecção é sugerida como um teste complementar, não excluindo a necessidade de biópsia de medula óssea (Tefferi A et al., 2007).

Também de grande importância para a prática clínica é a compreensão do papel de *JAK2 V617F* no prognóstico dos pacientes SMP. Demonstrou-se que a mutação está relacionada a marcadores biológicos como formação de CEE (Goerttler PS et al., 2005) e superexpressão de PRV-1 (Goerttler PS et al., 2005; Tefferi A et al., 2005) anteriormente descritos em SMPs (Klippel S et al., 2002; Prchal JF e Axelrad AA, 1974). Também está associada à ativação de plaquetas (Arellano-Rodrigo E et al., 2006) e granulócitos (Passamonti F et al., 2006) e à mobilização constitutiva de células CD34+ (Passamonti F et al., 2006). Paralelamente, estudos mostram que, em TE, a mutação está associada a altos níveis de hemoglobina, contagem de neutrófilos e taxa de transformação para PV (Campbell PJ et al., 2005; Wolanskyj AP et al., 2005), baixos níveis de EPO sérica e ferritina (Campbell PJ et al., 2005), além de maior risco de eventos trombóticos (Finazzi G et al., 2007). Já em pacientes com PV, observou-se que homozigotos para a mutação têm maior incidência de prurido, maiores níveis de hemoglobina ao diagnóstico e taxa de transformação fibrótica (Tefferi A et al., 2006). Tanto em pacientes com PV quanto em pacientes com TE, a homozigose para *JAK2 V617* está associada à maior frequência de transformação mielofibrótica (Vannucchi AM et al., 2007). Em MF, achou-se que *JAK2 V617F* está associada a contagens mais elevadas de neutrófilos e leucócitos, menor necessidade de transfusão e pior sobrevida (Campbell PJ et al., 2006b).

No que concerne o tratamento de SMPs, descreveu-se que pacientes com TE positivos para a mutação, fenotipicamente similares a pacientes com PV, são mais sensíveis ao tratamento com hidroxiuréia do que pacientes com TE *JAK2 V617F*-negativos (Campbell PJ et al., 2005), o que poderia sugerir mudanças em protocolos de tratamento em função da presença da mutação. A quantificação de *JAK2 V617F* seria uma maneira, como Bcr-Abl em LMC, de se avaliar a intensidade da doença em um paciente, sendo realizada ao diagnóstico e sequencialmente testada ao longo do tratamento (Villevall JL et al., 2006), como já mostrado para pacientes com PV tratados com interferon- α (Kiladjian JJ et al.,

2006) e um paciente MF que recebeu transplante de células tronco alogênicas (Ruiz-Arguelles GJ et al., 2007). Obviamente, referindo-se ao tratamento de pacientes, o principal benefício esperado, observada a inibição específica de Bcr-Abl por imatinib e sua eficácia no tratamento de LMC (Mauro MJ et al., 2001), é o desenvolvimento de terapia molecular também para SMPs *JAK2* V617F-positivas. De fato, já se relata o desenvolvimento e início de testes de pequenas moléculas inibidoras, seletivas ou não, de *JAK2* (Pardanani A, 2007; Pardanani A et al., 2007).

Dada a importância da mutação *JAK2* V617F para o fenótipo de SMPs, pareceu-nos importante para realização deste estudo que os pacientes incluídos fossem positivos para a mutação. Para a construção da biblioteca SAGE PV, selecionou-se um paciente ao diagnóstico, antes que tivesse recebido qualquer medicação. Considerando-se a baixa frequência com que um caso novo de PV é diagnosticado, optou-se por fazer a biblioteca a partir de células de um só paciente, para posteriormente confirmar possíveis variações de expressão gênica em outros indivíduos. Já a biblioteca SAGE MN, foi feita a partir de células de cinco doadores saudáveis.

Após a construção, sequenciamento e análise dos dados obtidos por SAGE em células totais de medula óssea de pacientes com PV e de controles, observou-se que os perfis transcricionais são compostos por um grande número de genes pouco expressos e um pequeno número de genes muito expressos. Este padrão é similar àqueles descritos para os progenitores hematopoéticos CD34+ e progenitores mielóides CD15+ normais, também determinados pela metodologia de SAGE (Lee S et al., 2001; Zhou G et al., 2001).

Com relação ao caráter qualitativo da expressão gênica, notou-se que cerca de 25% das *tags* eram “*no matches*” e poderiam corresponder a transcritos ainda desconhecidos. O potencial da técnica de SAGE para identificação de novos genes pode ser ilustrado pela caracterização do gene denominado *High in normal-1 (HIN-1)*, ao se observar que uma *tag* não identificada apresentou expressão diminuída em câncer de mama humano (Krop IE et al., 2001). Ainda, observou-se que as 50 *tags* mais sequenciadas nas duas bibliotecas correspondiam a genes codificantes das cadeias α - (*HBA*) e β - (*HBB*) globina, polipeptídeos leve (*FTL*) e pesado (*FTH1*) da ferritina, cadeia de imunoglobulina

(*IGHG1*), moléculas do complexo maior de histocompatibilidade: classes I (cadeias pesadas: *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C* e leve: *B2M*) e II (*CD74*), além de defensinas (*DEFA1* e *DEFA3*) e serglicina (*SRGN*). De fato, expressão elevada destes genes reflete a atividade hematopoética das células estudadas e estão de acordo com o tipo de amostra obtida. Achou-se também que células de medula óssea normal expressaram uma grande variedade de proteínas ribossomais, ao contrário das células de PV, que apresentaram níveis abundantes de fatores de transcrição.

A comparação entre as duas bibliotecas construídas neste estudo, e também à biblioteca controle obtida na internet, permitiu que se delineasse um perfil de expressão gênica diferencial entre PV e controle, identificando-se 204 genes diferencialmente expressos. Os genes com expressão elevada em PV (104) estão envolvidos em processos biológicos que estão conhecidamente alterados nesta doença.

O mais relevante deles foi transdução de sinal, atribuído a 33% (32) dos genes. Mais especificamente, 17 genes fazem parte da transdução de sinal ligada a receptores de superfície celular, como *CD69*, *CSF2RB*, *PILRA* e genes codificando receptores ligados a proteína G (*FPRL1*, *GPR109A*, *GPR97*, *IL8RA* and *IL8RB*). *CD69* transcreve uma glicoproteína de superfície celular (Hamann J et al., 1993) e *CSF2RB* codifica a cadeia β comum aos receptores de IL-3, IL-5 e CSF (van Dijk TB et al., 1998). Ambas as proteínas são largamente expressas em células hematopoéticas, desempenham sinalização intracelular em diferentes populações e desencadeiam diversos tipos de resposta celular (de Groot RP et al., 1998; Militi S et al., 2000; Natarajan K et al., 2000; Testi R et al., 1994). Desta forma, pode-se imaginar que aumento na expressão de *CD69* e *CSF2RB* em presença da mutação *JAK2* V617F afetaria múltiplas linhagens em PV. Com relação a *PILRA*, sabe-se que este gene codifica uma proteína contendo um motivo imunoreceptor inibidor baseado em tirosina, expressa em leucócitos humanos. Esta proteína recruta SHP-1 e parece ter potencial inibidor celular (Mousseau DD et al., 2000). SHP-1 é uma tirosino-fosfatase que regula negativamente a eritropoese, interagindo não só com o receptor de EPO (Klingmuller U et al., 1995), mas também com a própria proteína *JAK2* (Jiao H et al., 1996). Como *PILRA* e *JAK2* dividem um regulador comum, seria interessante determinar os efeitos exatos da superexpressão de *PILRA* em células *JAK2*

V617F-positivas. Adicionalmente, observou-se neste estudo que dez genes participam em cascatas de sinalização intracelular, como *FGR*, *HCK* e *CSK*. *FGR* e *HCK*, dois membros da família Src de tirosino-quinases, se ligam diretamente a e ativam *STAT3* (Schreiner SJ et al., 2002), uma molécula de sinalização constitutivamente ativa em alguns pacientes com PV (Roder S et al., 2001). *CSK*, ao contrário, é uma tirosino-quinase que regula negativamente membros da família Src (Nada S et al., 1991; Okada M et al., 1991). Ainda, foi visto que quatro genes estão implicados na regulação da transdução de sinal, como o regulador de sinalização por proteína G, *RGS2*.

Outro processo biológico identificado foi diferenciação celular, relacionado a oito genes com expressão aumentada em PV. *PTGS2*, por exemplo, codifica a enzima ciclooxigenase-2 (*COX-2*), envolvida em megacariocitopoese (Tanaka N et al., 2004). Além disso, oito genes participam na proliferação celular, como as *PROK2*, o gene responsável pela produção de Bv8. Esta proteína funciona como uma citocina hematopoética, aumentando o número de colônias granulocíticas e monocíticas *in vitro* (LeCouter J et al., 2004). Ainda, sete genes com expressão aumentada em PV foram relacionados ao ciclo celular, como *MAP2K6*, e sete à apoptose, como *MCL1*. A proteína anti-apoptótica *MCL1* é altamente expressa em células tronco hematopoéticas e é necessária à sobrevivência destes progenitores (Opferman JT et al., 2005).

Doze genes com expressão elevada em PV foram implicados em modificação de proteínas, dois deles em desfosforilação de aminoácidos de proteínas e seis em fosforilação. Uma das fosfatases identificadas, codificada por *PTPRC*, é *CD45*, que, suprimindo a atividade *JAK*, regula negativamente a sinalização desencadeada por citocinas (Irie-Sasaki J et al., 2001). Assim, aumento da expressão deste gene em células *JAK2* V617F-positivas poderia ser interpretada com um sistema de controle da célula (*feedback* negativo).

Foi observado que 25 genes com expressão aumentada em PV estão envolvidos em resposta imune, 10 dos quais fazem parte da resposta inflamatória. Um estudo anterior mostrou que, para os dezesseis marcadores analisados, os níveis de mRNA eram similares entre granulócitos *JAK2* V617F e granulócitos de pacientes com septemia ou neutrofilia pós-cirúrgica (Kralovics R et al., 2005b). Isso poderia indicar que alguns genes seriam

modulados pela via JAK/STAT, ativada por estímulos exógenos (neutrofilia secundária) ou endógenos (*JAK2* V617F) (Kralovics R et al., 2005b).

Finalmente, quatorze genes com expressão elevada em PV estão implicados em regulação da transcrição, como os genes de resposta imediata *BTG2*, *EGR1*, *ZFP36* e *JUNB*. *EGR1* é importante para diferenciação da linhagem macrófágica (Nguyen HQ et al., 1993) e sugeriu-se que promova a diferenciação de macrófagos em detrimento da diferenciação eritróide e granulocítica (Krishnaraju K et al., 2001).

Já com relação ao gene *JUNB*, observa-se que sua expressão é rapidamente estimulada por soro e fatores de crescimento hematopoéticos (Adachi K e Saito H, 1992; Jacobs-Helber SM et al., 2002; Kang LY e Yang YC, 1995; Lord KA et al., 1990; Perez-Albuerne ED et al., 1993) e já foi descrito que a ativação de *JAK2* poderia contribuir para indução de *JUNB* (Sakai I et al., 1995). Também foi observado que a expressão induzida de *JUNB* em uma linhagem celular dependente de EPO está relacionada ao aumento da expressão dos marcadores eritróides β -globina, espectrina- α e TER119 (Jacobs-Helber SM et al., 2002).

Assim, pareceu-nos interessante estudar mais detalhadamente o perfil de expressão deste gene e sua relação com a mutação. Por meio de qRT-PCR, foi possível confirmar o aumento de expressão de *JUNB* em células de medula óssea de dois outros pacientes com PV, ao diagnóstico, portadores da mutação. Este achado também foi observado em leucócitos totais de sangue periférico e células mononucleares de pacientes com PV positivos para mutação, comparados a controles normais. Estes resultados sugerem que a expressão de *JUNB* poderia estar relacionada ao genótipo de *JAK2*. No entanto, nenhuma diferença significativa de expressão de *JUNB* foi detectada entre granulócitos maduros normais e de PV, ainda que estes derivem do clone mutado em PV. Pode-se especular que variações na expressão de *JUNB* nas várias linhagens hematopoéticas possam depender do contexto celular. Em linhagens celulares, foi demonstrado que a expressão deste gene é induzida por G-CSF (Adachi K e Saito H, 1992), porém isso pode ser diferente nos granulócitos. Na verdade, sugere-se que a própria função de *JUNB* dependa da regulação de sua expressão ao longo do tempo e do espaço e também da

expressão relativa de outras proteínas do complexo, especialmente *JUN* (Passegue E et al., 2002).

Para avaliar a expressão de *JUNB* em linhagem eritróide e sua relação com EPO, utilizou-se a linhagem murina Ba/F3-REPO parental, responsiva a esta citocina. Observou-se que EPO foi capaz de estimular um aumento na expressão do mRNA *JUNB* e nos níveis da proteína JunB. Estes resultados estão de acordo com descrições anteriores, que mostram uma indução transitória de JunB por EPO em progenitores eritróides murinos primários infectados com a cepa indutora de anemia do vírus *Friend spleen focus-forming* e na linhagem de células eritróides HCD-57 (Jacobs-Helber SM et al., 2002; Muszynski KW et al., 1998).

Neste estudo, se observou expressão de JunB independente de EPO em células Ba/F3-REPO *JAK2 V617F* e em células eritróides de pacientes com PV ou MF *JAK2 V617F*-positivos. Estes resultados concordam com a descrição na literatura de expressão de mRNA *JUNB* independente de EPO em células HCD-57 infectadas com o vírus *Friend spleen focus-forming SFFV* (Muszynski KW et al., 1998), que, assim como a mutação em *JAK2*, induz crescimento de células eritróides na ausência de EPO (Ruscetti SK et al., 1990). Ainda, notou-se que nas células Ba/F3-REPO, assim como nas outras linhagens, EPO induziu um aumento de quatro vezes nos níveis de transcritos *JUNB*. No entanto, não houve mudança significativa na quantificação de proteína JunB, sugerindo que haja regulação pós-transcricional.

Tomados em conjunto, os resultados de quantificação de expressão indicam, pela primeira vez, que JunB possa ser regulado por *JAK2 V617F*. Esta hipótese foi confirmada pela diminuição de expressão de proteína JunB após o tratamento de células Ba/F3-REPO *JAK2 V617F* com concentrações crescentes de um inibidor de *JAK2*. Além disso, também se utilizando inibidores (LY294002 e PD98059), foi observado que a expressão constitutiva de JunB em células *JAK2 V617F* é dependente das vias PI3K e MAPK. Este resultado está de acordo com o resultado obtido com uma outra quinase constitutivamente ativa, NPM-ALK, que também causa aumento nos níveis de mRNA *JUNB* e de proteína JunB (Staber PB et al., 2007). Como mostrado neste trabalho para *JAK2 V617F*, NPM-ALK ativa ERK e PI3K e a expressão de JunB depende de ambas as

vias. Mais especificamente, células positivas para NPM-ALK tratadas com inibidor de ERK apresentaram níveis menores de mRNA *JUNB*, enquanto mTOR, proteína alvo da PI3K, regulou a tradução de JunB (Staber PB et al., 2007).

Considerando estes achados, decidiu-se investigar o papel de *JUNB* na eritropoese. Com relação às funções descritas para *JUNB* na hematopoese, foi demonstrado que este gene tem papel fundamental nos primeiros passos da mielopoese, visto que deficiência de JunB leva à uma doença mieloproliferativa transplantável, por expansão do número de progenitores hematopoéticos de longa duração e progenitores granulocíticos/macrofágicos (Passegue E et al., 2004). A fim de melhor se compreender o papel de JunB na eritropoese, utilizaram-se shRNAs para diminuir a expressão deste gene. O nível da proteína JunB pode ser eficientemente diminuído em progenitores eritróides humanos cultivados por quatro dias. Diminuição da expressão de *JUNB* causou uma redução nos potenciais proliferativo e clonogênico dos precursores eritróides, indicando um papel proliferativo para JunB na eritropoese. Por isso, estes resultados diferem de uma descrição anterior da literatura que sugere que JunB seja responsável pela apoptose induzida pela ausência de EPO e c-jun esteja envolvido na proliferação induzida por EPO na linhagem HCD-57 (Jacobs-Helber SM et al., 1998). No entanto, este efeito oposto descrito para os dois membros da família jun foi aventado somente com base em suas expressões em resposta à EPO, e não em experimentos funcionais (por exemplo, interferência ou superexpressão). Os resultados aqui apresentados mostram que um mesmo gene pode ter efeitos opostos em estágios diferentes da hematopoese. Deficiência de JunB em células tronco hematopoéticas induzem uma doença mieloproliferativa semelhante a CML, mas interferência em progenitores e precursores granulo-monocíticos tem um efeito mínimo na proliferação (Passegue E et al., 2004). Ao contrário, JunB parece ser uma molécula ativada por EPO importante para eritropoese.

Com respeito à eritropoese desencadeada por *JAK2* V617F em PV, esta pareceu especialmente sensível à diminuição de expressão de JunB. De fato, diminuição de JunB de apenas 10% com o shRNA2 foi suficiente para inibir a diferenciação eritróide de amostras de PV. Ainda, CEE de pacientes PV foi quase completamente bloqueada devido a uma redução de JunB de 60% e o estudo do genótipo de colônias eritróides crescidas em

presença de EPO após a inibição de JunB mostrou enriquecimento em colônias *JAK2* WT. Isso poderia significar que a expressão de JunB é um mecanismo molecular importante para a eritropoese sustentada por *JAK2* V617F. Dados anteriores mostraram que inibidores de *JAK2*, assim como silenciamento de Bcl-xl e STAT5 inibem a diferenciação terminal EPO-independente de células de PV (Garçon L et al., 2006). Neste estudo, observou-se que a expressão de *JUNB* é necessária à expressão de Bcl-xL em células eritróides de um paciente com PV. Considerando que a expressão de Bcl-xL é essencial para a sobrevivência de progenitores eritróides (Silva M et al., 1996), este resultado indica que JunB teria um papel antiapoptótico em células com a mutação *JAK2* V617F. Esta hipótese contrasta com o papel pró-apoptótico atribuído a JunB em células HCD57, sob deprivação de EPO. Estas funções opostas de JunB poderiam ser causadas por composições diferentes do complexo AP-1 ou expressão gênica diferencial de outras proteínas da família Jun.

Considerando os resultados deste estudo e os dados da literatura, pode-se levantar a hipótese de que a formação de CEE em SMPs seria causada pela ativação constitutiva de STAT5 e expressão constitutiva de Bcl-xl e JunB, ocasionadas pela atividade quinase de *JAK2* V617F.

Investigações futuras envolvendo JunB em SMPs causadas por *JAK2* V617F poderiam esclarecer o papel do gene na doença e especificamente determinar se JunB induz proliferação eritróide limitando expansão das células tronco hematopoéticas e de progenitores granulo-monocíticos o que explicaria o fenótipo destas doenças.

6- CONCLUSÕES

*“I am turned into a sort of machine for observing facts &
grinding out conclusions”*

Charles Darwin

1. Acredita-se que este seja o primeiro trabalho descrito na literatura que utiliza a metodologia de SAGE para traçar o perfil transcricional de células totais de medula óssea de paciente com PV, portador da mutação *JAK2* V617F. Foram identificados diversos genes potencialmente relevantes para a fisiopatologia da de PV, como aqueles envolvidos em processos biológicos alterados na doença.
2. O aumento de expressão de *JUNB* em PV, observado por SAGE, foi confirmado por qRT-PCR em células totais de medula óssea de dois outros pacientes com PV positivos para *JAK2* V617F, em leucócitos totais de sangue periférico e em células mononucleares. Os estudos funcionais sugerem fortemente que JunB tenha um papel fundamental no desenvolvimento de SMPs causadas por *JAK2* V617F e investigações futuras poderiam esclarecer o papel do gene nas SMPs e especificamente determinar se JunB induz proliferação eritróide limitando expansão das células tronco hematopoéticas e de progenitores granulo-monocíticos, o que explicaria o fenótipo destas doenças.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

“Para Tereza, o livro era o santo e a senha de uma
irmandade secreta.”

Milan Kundera – A insustentável leveza do ser

Adachi K,Saito H. Induction of junB expression, but not c-jun, by granulocyte colony-stimulating factor or macrophage colony-stimulating factor in the proliferative response of human myeloid leukemia cells. *J Clin Invest* 1992; 89(5): 1657-61.

Adachi M, Fischer EH, Ihle J, Imai K, Jirik F, Neel B et al. Mammalian SH2-containing protein tyrosine phosphatases. *Cell* 1996; 85(1): 15.

Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF,Steinmann L. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med* 1976; 295(17): 913-6.

Andrieux JL, Demory JL. Karyotype and molecular cytogenetic studies in polycythemia vera. *Curr Hematol Rep* 2005; 4(3): 224-9.

Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larran A, Reverter JC, Villamor N, Colomer D,Cervantes F. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica* 2006; 91(2): 169-75.

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM et al. Geneontology: toll for the unification of biology. The gene ontology consortium. *Nat. Genet.* 2000; 25 (25-29).

Asimakopoulos FA, Hinshelwood S, Gilbert JG, Delibrias CC, Gottgens B, Fearon DT et al. The gene encoding hematopoietic cell phosphatase (SHP-1) is structurally and transcriptionally intact in polycythemia vera. *Oncogene* 1997; 14(10): 1215-22.

Audic S,Claverie JM. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res* 1997; 7(10): 986-95.

Axelrad AA, Eskinazi D, Correa PN,Amato D. Hypersensitivity of circulating progenitor cells to megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu MGDF) in essential thrombocythemia. *Blood* 2000; 96(10): 3310-21.

Barosi G, Ambrosetti A, Finelli C, Grossi A, Leoni P, Liberato NL et al. The Italian Consensus Conference on Diagnostic Criteria for Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *Br J Haematol* 1999; 104(4): 730-7.

Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365(9464): 1054-61.

Bellanne-Chantelot C, Chaumarel I, Labopin M, Bellanger F, Barbu V, De Toma C et al. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006; 108(1): 346-52.

Bench AJ, Pahl HL. Chromosomal abnormalities and molecular markers in myeloproliferative disorders. *Semin Hematol* 2005; 42(4): 196-205.

Berlin NI. Diagnosis and classification of the polycythemias. *Semin Hematol* 1975; 12(4): 339-51.

Berthebaud M, Riviere C, Jarrier P, Foudi A, Zhang Y, Compagno D et al. RGS16 is a negative regulator of SDF-1-CXCR4 signaling in megakaryocytes. *Blood* 2005; 106(9): 2962-8.

Boon K, Osorio EC, Greenhut SF, Schaefer CF, Shoemaker J, Polyak K et al. An anatomy of normal and malignant gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(17): 11287-92.

Campbell PJ, Baxter EJ, Beer PA, Scott LM, Bench AJ, Huntly BJ et al. Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation. *Blood* 2006a; 108(10): 3548-55.

Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2006; 355(23): 2452-66.

Campbell PJ, Griesshammer M, Dohner K, Dohner H, Kusec R, Hasselbalch HC et al. V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2006b; 107(5): 2098-100.

Campbell PJ, Scott LM, Baxter EJ, Bench AJ, Green AR, Erber WN. Methods for the detection of the JAK2 V617F mutation in human myeloproliferative disorders. *Methods Mol Med* 2006c; 125: 253-64.

Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005; 366(9501): 1945-53.

Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, Stover EH, Legare RD, Cortes J et al. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348(13): 1201-14.

Correa PN, Eskinazi D, Axelrad AA. Circulating erythroid progenitors in polycythemia vera are hypersensitive to insulin-like growth factor-1 in vitro: studies in an improved serum-free medium. *Blood* 1994; 83(1): 99-112.

Dai C, Chung IJ, Krantz SB. Increased erythropoiesis in polycythemia vera is associated with increased erythroid progenitor proliferation and increased phosphorylation of Akt/PKB. *Exp Hematol* 2005; 33(2): 152-8.

Dai C, Krantz SB. Increased expression of the INK4a/ARF locus in polycythemia vera. *Blood* 2001; 97(11): 3424-32.

Dai CH, Krantz SB, Dessypris EN, Means RT, Jr., Horn ST, Gilbert HS. Polycythemia vera. II. Hypersensitivity of bone marrow erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocyte progenitor cells to interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1992; 80(4): 891-9.

Dai CH, Krantz SB, Green WF, Gilbert HS. Polycythaemia vera. III. Burst-forming units-erythroid (BFU-E) response to stem cell factor and c-kit receptor expression. *Br J Haematol* 1994a; 86(1): 12-21.

Dai CH, Krantz SB, Koury ST, Kollar K. Polycythaemia vera. IV. Specific binding of stem cell factor to normal and polycythaemia vera highly purified erythroid progenitor cells. *Br J Haematol* 1994b; 88(3): 497-505.

Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951; 6(4): 372-5.

de Groot RP, Coffey PJ, Koenderman L. Regulation of proliferation, differentiation and survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. *Cell Signal* 1998; 10(9): 619-28.

de Klerk G, Rosengarten PC, Vet RJ, Goudsmit R. Serum erythropoietin (ESF) titers in polycythemia. *Blood* 1981; 58(6): 1171-4.

de la Chapelle A, Traskelin AL, Juvonen E. Truncated erythropoietin receptor causes dominantly inherited benign human erythrocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(10): 4495-9.

Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96(10): 3343-56.

Delhommeau F, Dupont S, Tonetti C, Masse A, Godin I, Le Couedic JP et al. Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2007; 109(1): 71-7.

Delhommeau F, Pisani DF, James C, Casadevall N, Constantinescu S, Vainchenker W. Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63(24): 2939-53.

Emanuel PD, Eaves CJ, Broudy VC, Papayannopoulou T, Moore MR, D'Andrea AD et al. Familial and congenital polycythemia in three unrelated families. *Blood* 1992; 79(11): 3019-30.

Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, Vaidya K, Murphy S. Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. *Blood* 1981; 58(5): 916-9.

Fialkow PJ, Gartler SM, Yoshida A. Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1967; 58(4): 1468-71.

Finazzi G, Rambaldi A, Guerini V, Carobbo A, Barbui T. Risk of thrombosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera according to JAK2 V617F mutation status. *Haematologica* 2007; 92(1): 135-6.

Garcon L, Rivat C, James C, Lacout C, Camara-Clayette V, Ugo V et al. Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. *Blood* 2006; 108(5): 1551-4.

Goerttler PS, Steimle C, Marz E, Johansson PL, Andreasson B, Griesshammer M et al. The Jak2V617F mutation, PRV-1 overexpression, and EEC formation define a similar cohort of MPD patients. *Blood* 2005; 106(8): 2862-4.

Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 1994; 77(2): 307-16.

Griesinger F, Hennig H, Hillmer F, Podleschny M, Steffens R, Pies A et al. A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11.2) translocation in a patient with a clinically typical chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44(3): 329-33.

Guasch G, Delaval B, Arnoulet C, Xie MJ, Xerri L, Sainty D et al. FOP-FGFR1 tyrosine kinase, the product of a t(6;8) translocation, induces a fatal myeloproliferative disease in mice. *Blood* 2004; 103(1): 309-12.

Hamann J, Fiebig H, Strauss M. Expression cloning of the early activation antigen CD69, a type II integral membrane protein with a C-type lectin domain. *J Immunol* 1993; 150(11): 4920-7.

Hess G, Rose P, Gamm H, Papadileris S, Huber C, Seliger B. Molecular analysis of the erythropoietin receptor system in patients with polycythaemia vera. *Br J Haematol* 1994; 88(4): 794-802.

Hookham MB, Elliott J, Suessmuth Y, Staerk J, Ward AC, Vainchenker W et al. The myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant escapes negative regulation by suppressor of cytokine signaling 3. *Blood* 2007; 109(11): 4924-9.

Huang LJ, Constantinescu SN, Lodish HF. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol Cell* 2001; 8(6): 1327-38.

Ihle JN, Witthuhn BA, W. QF, K. Y, Silvennoinen O. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Ann. Rev. Immunol.* 1995; 13:369-98.

Irie-Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, Opavsky A, Cheng M, Welstead G et al. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* 2001; 409(6818): 349-54.

Jacobs-Helber SM, Abutin RM, Tian C, Bondurant M, Wickrema A, Sawyer ST. Role of JunB in erythroid differentiation. *J Biol Chem* 2002; 277(7): 4859-66.

Jacobs-Helber SM, Wickrema A, Birrer MJ, Sawyer ST. AP1 regulation of proliferation and initiation of apoptosis in erythropoietin-dependent erythroid cells. *Mol Cell Biol* 1998; 18(7): 3699-707.

Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ. Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood* 1978; 51(2): 189-94.

Jaffee ES, Harris NL, et al. Pathology and Genetics of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. In: World Health Organization Classification of Tumors. Lyon: I. Press; 2001.

James C, Delhommeau F, Marzac C, Teyssandier I, Couedic JP, Giraudier S et al. Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. *Leukemia* 2006; 20(2): 350-3.

James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434(7037): 1144-8.

Jamieson CH, Gotlib J, Durocher JA, Chao MP, Mariappan MR, Lay M et al. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(16): 6224-9.

Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, Bueso-Ramos C, Prchal JT, Verstovsek S et al. JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood* 2005; 106(10): 3370-3.

Jiao H, Berrada K, Yang W, Tabrizi M, Platanius LC, Yi T. Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Mol Cell Biol* 1996; 16(12): 6985-92.

Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106(6): 2162-8.

Kang LY, Yang YC. Activation of junB and c-myc primary response genes by interleukin 9 in a human factor-dependent cell line. *J Cell Physiol* 1995; 163(3): 623-30.

Kaushansky K. On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. *Blood* 2005; 105(11): 4187-90.

Kiladjian JJ, Cassinat B, Turlure P, Cambier N, Roussel M, Bellucci S et al. High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon alpha-2a. *Blood* 2006; 108(6): 2037-40.

Klingmuller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* 1995; 80(5): 729-38.

Klippel S, Strunck E, Busse CE, Behringer D, Pahl HL. Biochemical characterization of PRV-1, a novel hematopoietic cell surface receptor, which is overexpressed in polycythemia rubra vera. *Blood* 2002; 100(7): 2441-8.

Koury MJ, Bondurant MC. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* 1990; 248(4953): 378-81.

Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol* 2002; 30(3): 229-36.

Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005a; 352(17): 1779-90.

Kralovics R, Teo SS, Buser AS, Brutsche M, Tiedt R, Tichelli A et al. Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2. *Blood* 2005b; 106(10): 3374-6.

Krishnaraju K, Hoffman B, Liebermann DA. Early growth response gene 1 stimulates development of hematopoietic progenitor cells along the macrophage lineage at the expense of the granulocyte and erythroid lineages. *Blood* 2001; 97(5): 1298-305.

Krop IE, Sgroi D, Porter DA, Lunetta KL, LeVangie R, Seth P et al. HIN-1, a putative cytokine highly expressed in normal but not cancerous mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(17): 9796-801.

Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Gachelin FM, Vainchenker W, Villeval JL. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood* 2006; 108(5): 1652-60.

LeCouter J, Zlot C, Tejada M, Peale F, Ferrara N. Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(48): 16813-8.

Lee JW, Kim YG, Soung YH, Han KJ, Kim SY, Rhim HS et al. The JAK2 V617F mutation in de novo acute myelogenous leukemias. *Oncogene* 2006; 25(9): 1434-6.

Lee S, Zhou G, Clark T, Chen J, Rowley JD, Wang SM. The pattern of gene expression in human CD15+ myeloid progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(6): 3340-5.

Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, Zahrieh D, Lee S, Chagnon P et al. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood* 2006; 107(10): 4139-41.

Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ, Loh ML, Beran M, Stoffregen E et al. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005a; 106(10): 3377-9.

Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005b; 7(4): 387-97.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.

Lord KA, Abdollahi A, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. Dissection of the immediate early response of myeloid leukemia cells to terminal differentiation and growth inhibitory stimuli. *Cell Growth Differ* 1990; 1(12): 637-45.

Lu X, Levine R, Tong W, Wernig G, Pikman Y, Zarnegar S et al. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(52): 18962-7.

Margulies EH, Innis JW. eSAGE: managing and analysing data generated with serial analysis of gene expression (SAGE). *Bioinformatics* 2000; 16(7): 650-1.

Mauro MJ, O'Dwyer ME, Druker BJ. ST1571, a tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia: validating the promise of molecularly targeted therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001; 48 Suppl 1:S77-8.

McClure R, Mai M, Lasho T. Validation of two clinically useful assays for evaluation of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2006; 20(1): 168-71.

Means RT, Jr., Krantz SB, Sawyer ST, Gilbert HS. Erythropoietin receptors in polycythemia vera. *J Clin Invest* 1989; 84(4): 1340-4.

Michiels JJ, Barbui T, Finazzi G, Fuchtmann SM, Kutti J, Rain JD et al. Diagnosis and treatment of polycythemia vera and possible future study designs of the PVSG. *Leuk Lymphoma* 2000; 36(3-4): 239-53.

Militi S, Riccioni R, Parolini I, Sposi NM, Samoggia P, Pelosi E et al. Expression of interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor common chain beta_c, beta_{IT} in normal haematopoiesis: lineage specificity and proliferation-independent induction. *Br J Haematol* 2000; 111(2): 441-51.

Mirza AM, Correa PN, Axelrad AA. Increased basal and induced tyrosine phosphorylation of the insulin-like growth factor I receptor beta subunit in circulating mononuclear cells of patients with polycythemia vera. *Blood* 1995; 86(3): 877-82.

Moliterno AR, Hankins WD, Spivak JL. Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* 1998; 338(9): 572-80.

Moliterno AR, Spivak JL. Posttranslational processing of the thrombopoietin receptor is impaired in polycythemia vera. *Blood* 1999; 94(8): 2555-61.

Moliterno AR, Williams DM, Gutierrez-Alamillo LI, Salvatori R, Ingersoll RG, Spivak JL. Mpl Baltimore: a thrombopoietin receptor polymorphism associated with thrombocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(31): 11444-7.

Mousseau DD, Banville D, L'Abbe D, Bouchard P, Shen SH. PILRalpha, a novel immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing protein, recruits SHP-1 upon tyrosine phosphorylation and is paired with the truncated counterpart PILRbeta. *J Biol Chem* 2000; 275(6): 4467-74.

Muszynski KW, Ohashi T, Hanson C, Ruscetti SK. Both the polycythemia- and anemia-inducing strains of Friend spleen focus-forming virus induce constitutive activation of the Raf-1/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Virol* 1998; 72(2): 919-25.

Nada S, Okada M, MacAuley A, Cooper JA, Nakagawa H. Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src. *Nature* 1991; 351(6321): 69-72.

Natarajan K, Sawicki MW, Margulies DH, Mariuzza RA. Crystal structure of human CD69: a C-type lectin-like activation marker of hematopoietic cells. *Biochemistry* 2000; 39(48): 14779-86.

Nguyen HQ, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. The zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell* 1993; 72(2): 197-209.

Okada M, Nada S, Yamanashi Y, Yamamoto T, Nakagawa H. CSK: a protein-tyrosine kinase involved in regulation of src family kinases. *J Biol Chem* 1991; 266(36): 24249-52.

Opferman JT, Iwasaki H, Ong CC, Suh H, Mizuno S, Akashi K et al. Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science* 2005; 307(5712): 1101-4.

Pahl HL. Towards a molecular understanding of polycythemia rubra vera. *Eur J Biochem* 2000; 267(12): 3395-401.

Pardanani A. JAK2 inhibitor therapy in myeloproliferative disorders: rationale, preclinical studies and ongoing clinical trials. *Leukemia* 2007; in press.

Pardanani A, Hood J, Lasho T, Levine RL, Martin MB, Noronha G et al. TG101209, a small molecule JAK2-selective kinase inhibitor potently inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2V617F and MPLW515L/K mutations. *Leukemia* 2007; 21(8): 1658-68.

Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006; 108(10): 3472-6.

Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 1998; 93(3): 385-95.

Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Della Porta MG, Boveri E, Pascutto C et al. Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood* 2006; 107(9): 3676-82.

Passegue E, Jochum W, Behrens A, Ricci R, Wagner EF. JunB can substitute for Jun in mouse development and cell proliferation. *Nat Genet* 2002; 30(2): 158-66.

Passegue E, Wagner EF, Weissman IL. JunB deficiency leads to a myeloproliferative disorder arising from hematopoietic stem cells. *Cell* 2004; 119(3): 431-43.

Perez-Albuerne ED, Schatteman G, Sanders LK, Nathans D. Transcriptional regulatory elements downstream of the JunB gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(24): 11960-4.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): e45.

Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006; 3(7): e270.

Pontius JU, Wagner L, Schuler GD. UniGene: a unified view of the transcriptome. In: *Information NCfB. The NCBI Handbook. Bethesda (MD); 2003.*

Prchal JF, Axelrad AA. Letter: Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N Engl J Med* 1974; 290(24): 1382.

Roder S, Steimle C, Meinhardt G, Pahl HL. STAT3 is constitutively active in some patients with Polycythemia rubra vera. *Exp Hematol* 2001; 29(6): 694-702.

Royer Y, Staerk J, Costuleanu M, Courtoy PJ, Constantinescu SN. Janus kinases affect thrombopoietin receptor cell surface localization and stability. *J Biol Chem* 2005; 280(29): 27251-61.

Ruiz-Arguelles GJ, Garces-Eisele J, Reyes-Nunez V, Ruiz-Delgado GJ, Rosillo C, Camoriano JK. Clearance of the Janus kinase 2 (JAK2) V617F mutation after allogeneic stem cell transplantation in a patient with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Am J Hematol* 2007; 82(5): 400-2.

Ruscetti SK, Janesch NJ, Chakraborti A, Sawyer ST, Hankins WD. Friend spleen focus-forming virus induces factor independence in an erythropoietin-dependent erythroleukemia cell line. *J Virol* 1990; 64(3): 1057-62.

Sakai I, Nabell L, Kraft AS. Signal transduction by a CD16/CD7/Jak2 fusion protein. *J Biol Chem* 1995; 270(31): 18420-7.

Schreiner SJ, Schiavone AP, Smithgall TE. Activation of STAT3 by the Src family kinase Hck requires a functional SH3 domain. *J Biol Chem* 2002; 277(47): 45680-7.

Scott LM, Campbell PJ, Baxter EJ, Todd T, Stephens P, Eddins S et al. The V617F JAK2 mutation is uncommon in cancers and in myeloid malignancies other than the classic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106(8): 2920-1.

Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, Green AR. Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood* 2006; 108(7): 2435-7.

Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007; 356(5): 459-68.

Sharpless NE, DePinho RA. The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9(1): 22-30.

Silva M, Grillot D, Benito A, Richard C, Nunez G, Fernandez-Luna JL. Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood* 1996; 88(5): 1576-82.

Silva M, Richard C, Benito A, Sanz C, Olalla I, Fernandez-Luna JL. Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* 1998; 338(9): 564-71.

Spivak JL. The chronic myeloproliferative disorders: clonality and clinical heterogeneity. *Semin Hematol* 2004; 41(2 Suppl 3): 1-5.

Spivak JL, Barosi G, Tognoni G, Barbui T, Finazzi G, Marchioli R et al. Chronic myeloproliferative disorders. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2003; 200-24.

Staber PB, Vesely P, Haq N, Ott RG, Funato K, Bambach I et al. The oncoprotein NPM-ALK of anaplastic large cell lymphoma induces JUNB transcription via ERK1/2 and JunB translation via mTOR signaling. *Blood* 2007; in press.

Staerk J, Kallin A, Demoulin JB, Vainchenker W, Constantinescu SN. JAK1 and Tyk2 activation by the homologous polycythemia vera JAK2 V617F mutation: cross-talk with IGF1 receptor. *J Biol Chem* 2005; 280(51): 41893-9.

Staerk J, Kallin A, Royer Y, Diaconu CC, Dusa A, Demoulin JB et al. JAK2, the JAK2 V617F mutant and cytokine receptors. *Pathol Biol (Paris)* 2007; 55(2): 88-91.

Sui X, Krantz SB, Zhao Z. Identification of increased protein tyrosine phosphatase activity in polycythemia vera erythroid progenitor cells. *Blood* 1997; 90(2): 651-7.

Tanaka N, Sato T, Fujita H, Morita I. Constitutive expression and involvement of cyclooxygenase-2 in human megakaryocytopoiesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(3): 607-12.

Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Strand JS, Elliott M, Mesa R et al. The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera. *Cancer* 2006; 106(3): 631-5.

Tefferi A, Pardanani A. Clinical, genetic, and therapeutic insights into systemic mast cell disease. *Curr Opin Hematol* 2004; 11(1): 58-64.

Tefferi A, Pardanani A. Mutation screening for JAK2V617F: when to order the test and how to interpret the results. *Leuk Res* 2006; 30(6): 739-44.

Tefferi A, Sirhan S, Lasho TL, Schwager SM, Li CY, Dingli D et al. Concomitant neutrophil JAK2 mutation screening and PRV-1 expression analysis in myeloproliferative disorders and secondary polycythaemia. *Br J Haematol* 2005; 131(2): 166-71.

Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* 2007; in press.

Temerinac S, Klippel S, Strunck E, Roder S, Lubbert M, Lange W et al. Cloning of PRV-1, a novel member of the uPAR receptor superfamily, which is overexpressed in polycythemia rubra vera. *Blood* 2000; 95(8): 2569-76.

Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today* 1994; 15(10): 479-83.

Theocharides A, Boissinot M, Girodon F, Garand R, Teo SS, Lippert E et al. Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation. *Blood* 2007; 110(1): 375-79.

Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, Larbret F, Lecluse Y, Debili N et al. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol* 2004; 32(2): 179-87.

van Dijk TB, Baltus B, Caldenhoven E, Handa H, Raaijmakers JA, Lammers JW et al. Cloning and characterization of the human interleukin-3 (IL-3)/IL-5/ granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor betac gene: regulation by Ets family members. *Blood* 1998; 92(10): 3636-46.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A 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.

Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R et al. Clinical profile of homozygous JAK2V617F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood* 2007; in press.

Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100(7): 2292-302.

Villevall JL, James C, Pisani DF, Casadevall N, Vainchenker W. New insights into the pathogenesis of JAK2 V617F-positive myeloproliferative disorders and consequences for the management of patients. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32(4 Pt 2): 341-51.

Ward AC, Touw I, Yoshimura A. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* 2000; 95(1): 19-29.

Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH, Gilliland DG. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 2006; 107(11): 4274-81.

Wickrema A, Chen F, Namin F, Yi T, Ahmad S, Uddin S et al. Defective expression of the SHP-1 phosphatase in polycythemia vera. *Exp Hematol* 1999; 27(7): 1124-32.

Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, McClure RF, Wadleigh M, Lee SJ et al. JAK2 mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol* 2005; 131(2): 208-13.

Xu MJ, Sui X, Zhao R, Dai C, Krantz SB, Zhao ZJ. PTP-MEG2 is activated in polycythemia vera erythroid progenitor cells and is required for growth and expansion of erythroid cells. *Blood* 2003; 102(13): 4354-60.

Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Policitemia Vera. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. *Hematologia: Fundamentos e Práticas*. São Paulo: Atheneu; 2001. p.352-56.

Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB et al. Identification of an Acquired JAK2 Mutation in Polycythemia Vera. *J Biol Chem* 2005; 280(24): 22788-92.

Zhou G, Chen J, Lee S, Clark T, Rowley JD, Wang SM. The pattern of gene expression in human CD34(+) stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(24): 13966-71.

8- ANEXOS



ANEXO 1



Termo de consentimento livre e esclarecido a ser obtido de pacientes para a participação no projeto de estudo intitulado

“ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA NA POLICITEMIA VERA POR “*SERIAL ANALYSIS OF GENE EXPRESSION*” (SAGE)”

Nome do paciente

Idade:..... anos RG: HC:.....

Endereço:.....

Nome do responsável legal (se paciente menor de idade):.....

RG:.....Grau de Parentesco:.....

Endereço:.....

Estou ciente de que para realizar o diagnóstico da minha doença necessito ser submetido à punção de medula óssea. Este procedimento é realizado por meio de punção por agulha no osso esterno ou em osso da bacia. Trata-se de um procedimento de rápida duração (cerca de 5 minutos), cujo único efeito indesejável a ser considerado é a dor no local de punção, que é tratada com analgésicos comuns. Estou ciente que parte da amostra colhida para o diagnóstico da minha doença será utilizada para a avaliação da expressão dos genes de medula óssea. Desta forma, estarei participando do estudo intitulado “Análise da expressão gênica na Policitemia vera por “*Serial Analysis Of Gene Expression*” (SAGE)”. Ainda não são conhecidos os principais genes envolvidos nesta doença, por isso o objetivo deste estudo é avaliar a diferença entre os genes expressos na medula óssea dos pacientes com Policitemia Vera e em indivíduos controle. Estou ciente de que o material obtido será utilizado apenas para esta pesquisa. Estou ciente de que não terei prejuízos com a realização destes exames. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o meu tratamento na UNICAMP. Sei ainda, que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Se tiver quaisquer dúvidas sobre o estudo poderei procurar Dr. Fernando

Ferreira Costa (fone 3521-8734) no Hemocentro da UNICAMP, a rua Carlos Chagas no. 480, Campus da Cidade Universitária. CEP: 13081-970.

Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo, poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Tel: 3521 8936; Fax: 3521 8925.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

.....
Assinatura do paciente

RG:

.....
Assinatura do responsável legal

RG:

.....
Assinatura da aluna de doutorado

Bárbara da Costa Reis Monte-Mór
RG: 12081917-2

.....
Assinatura do médico responsável

Dr. Fernando Ferreira Costa
RG: 4607982

Campinas,/...../.....



ANEXO 2



Termo de consentimento livre e esclarecido a ser obtido dos indivíduos controle, para participação no projeto de estudo intitulado

“ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA NA POLICITÊMIA VERA POR “*SERIAL ANALYSIS OF GENE EXPRESSION*” (SAGE)”

Nome do paciente

Idade:..... anos **RG:** **HC:**.....

Endereço:.....

Nome do responsável legal (se paciente menor de idade):.....

RG:..... **Grau de Parentesco:**.....

Endereço:.....

Estou ciente de que para doar uma parte de minha medula óssea para um dos meus familiares, que apresenta uma doença hematológica e necessita de transplante de medula óssea, necessito ser submetido à punção de medula óssea. Este procedimento é realizado por meio de punção por agulha em osso da bacia. O único efeito indesejável a ser considerado é a dor no local de punção, que pode ser tratada com analgésicos comuns. Estou ciente de que parte da amostra (volume: 30 ml) será utilizada para a avaliação da expressão normal de genes em medula óssea. Desta forma, estarei participando do estudo intitulado “Análise da expressão gênica na Policitemia vera por “*Serial Analysis Of Gene Expression*” (SAGE)”. Ainda não são conhecidos os principais genes envolvidos nesta doença, por isso o objetivo deste estudo é avaliar a diferença entre os genes expressos na medula óssea dos pacientes com Policitemia Vera e em indivíduos controle. Estou ciente de que não terei prejuízos com a realização destes exames. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o tratamento de meu familiar na UNICAMP. Sei ainda, que meus dados

personais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Se tiver quaisquer dúvidas sobre o estudo poderei procurar o Dr. Fernando Ferreira Costa (fone 3521-8734) no Hemocentro – UNICAMP, a rua Carlos Chagas no. 480, Campus da Cidade Universitária. CEP: 13081-970.

Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo, poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Tel: 3521 8936; Fax: 3521 8925.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

.....
Assinatura do paciente

RG:

.....
Assinatura do responsável legal

RG:

.....
Assinatura da aluna de doutorado

Bárbara da Costa Reis Monte-Mór
RG: 12081917-2

.....
Assinatura do médico responsável

Dr. Fernando Ferreira Costa
RG: 4607982

Campinas,/...../.....



ANEXO 3



Termo de consentimento livre e esclarecido a ser obtido de pacientes para a participação no projeto de estudo intitulado

“FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO *JAK2* V617F EM PACIENTES PORTADORES DE POLICITEMIA VERA, MIELOFIBROSE PRIMÁRIA E TROMBOCITEMIA ESSENCIAL NO BRASIL”

Nome do paciente

Idade:..... anos **RG:** **HC:**.....

Endereço:.....

Nome do responsável legal (se paciente menor de idade):.....

RG:.....**Grau de Parentesco:**.....

Endereço:.....

Recentemente foi descoberta uma mutação no DNA, no gene *JAK2*, em parte dos pacientes com policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária. Estou ciente que parte da amostra de sangue, colhida para o hemograma antes da minha consulta, será utilizada para avaliar a presença desta alteração. Desta forma, estarei participando do estudo intitulado “Frequência da mutação *JAK2* V617F em pacientes portadores de policitemia vera, mielofibrose primária e trombocitemia essencial no Brasil”. Estou ciente de que o material obtido será utilizado apenas para esta pesquisa. Estou ciente de que não terei prejuízos com a realização destes exames. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o meu tratamento na UNICAMP. Sei ainda, que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Se tiver quaisquer dúvidas sobre o estudo poderei procurar Dr. Fernando Ferreira Costa (fone 3521-8734) no

Hemocentro da UNICAMP, a rua Carlos Chagas no. 480, Campus da Cidade Universitária. CEP: 13081-970.

Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo, poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Tel: 3521 8936; Fax: 3521 8925.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

.....
Assinatura do paciente

RG:

.....
Assinatura do responsável legal

RG:

.....
Assinatura da aluna de doutorado

Bárbara da Costa Reis Monte-Mór

RG: 12081917-2

.....
Assinatura do médico responsável

Dr. Fernando Ferreira Costa

RG: 4607982

Campinas,/...../.....



ANEXO 4



Termo de consentimento livre e esclarecido a ser obtido dos indivíduos controle, para participação no projeto de estudo intitulado

“FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO *JAK2* V617F EM PACIENTES PORTADORES DE POLICITEMIA VERA, MIELOFIBROSE PRIMÁRIA E TROMBOCITEMIA ESSENCIAL NO BRASIL”

Nome:

RG: **Idade:** anos

Endereço residencial:

.....

Endereço comercial:

.....

Recentemente foi descoberta uma mutação no DNA, no gene *JAK2*, em parte dos pacientes com policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária. Esta alteração não acontece em pessoas que não têm essas doenças. Estou ciente de que parte do volume de sangue doado (volume: 500µl) será utilizada como controle. Desta forma, estarei participando do estudo intitulado “Frequência da mutação *JAK2* V617F em pacientes portadores de policitemia vera, mielofibrose primária e trombocitemia essencial no Brasil”.. Estou ciente de que o material obtido será utilizado apenas para esta pesquisa e de que nenhum material adicional será coletado. Estou ciente de que não terei prejuízos com a realização destes exames. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o tratamento de meu familiar na UNICAMP. Sei ainda, que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Se tiver quaisquer dúvidas sobre o

estudo poderei procurar o Dr. Fernando Ferreira Costa (fone 3521-8734) no Hemocentro – UNICAMP, a rua Carlos Chagas no. 480, Campus da Cidade Universitária. CEP: 13081-970.

Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo, poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Tel: 3521 8936; Fax: 3521 8925.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

.....
Assinatura do paciente

RG:

.....
Assinatura do responsável legal

RG:

.....
Assinatura da aluna de doutorado

Bárbara da Costa Reis Monte-Mór
RG: 12081917-2

.....
Assinatura do médico responsável

Dr. Fernando Ferreira Costa
RG: 4607982

Campinas,/...../.....

ANEXO 5

Tabela10- Processos biológicos atribuídos aos genes com expressão elevada em policitemia vera.
Na tabela estão indicados processos biológicos, símbolo e nome dos genes

Processo biológico	Símbolo	Gene
1 – Transdução de sinal	ARHGAP26	Rho GTPase activating protein 26
	CD69	CD69 molecule
	CDC42SE1	CDC42 small effector 1
	CSF2RB	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)
	CSK	c-src tyrosine kinase
	ECGF1	endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)
	FGR	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog
	FPRL1	formyl peptide receptor-like 1
	FYB	FYN binding protein (FYB-120/130)
	GPR109A	G protein-coupled receptor 109A
	GPR97	G protein-coupled receptor 97
	HCK	hemopoietic cell kinase
	HMHA1	histocompatibility (minor) HA-1
	IL1B	interleukin 1, beta
	IL4R	interleukin 4 receptor
	IL8RA	interleukin 8 receptor, alpha
	IL8RB	interleukin 8 receptor, beta
	IMPA2	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2
	ITGA2B	integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41)
	ITGAX	integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)
	LITAF	lipopolysaccharide-induced TNF factor
	MAP2K6	mitogen-activated protein kinase kinase 6
	MICAL1	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 1
	PF4	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)
	PILRA	paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha
	PROK2	prokineticin 2
	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
	RASGRP4	RAS guanyl releasing protein 4
	RGS2	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa
	TAGAP	T-cell activation GTPase activating protein
TLE3	transducin-like enhancer of split 3 (E(sp1) homolog, Drosophila)	
TLR1	toll-like receptor 1	
1.1 – Transdução de sinal ligada a receptor de superfície celular	CD69	CD69 molecule
	CSF2RB	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)
	ECGF1	endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)
	FPRL1	formyl peptide receptor-like 1

GPR109A	G protein-coupled receptor 109A
GPR97	G protein-coupled receptor 97
IL8RA	interleukin 8 receptor, alpha
IL8RB	interleukin 8 receptor, beta
ITGA2B	integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41)
ITGAX	integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)
PF4	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)
PILRA	paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha
PROK2	prokineticin 2
PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
RASGRP4	RAS guanyl releasing protein 4
RGS2	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa
TLE3	transducin-like enhancer of split 3 (E(sp1) homolog, Drosophila)

1.2 – Cascata de sinalização intracelular

CSK	c-src tyrosine kinase
FGR	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog
FYB	FYN binding protein (FYB-120/130)
HCK	hemopoietic cell kinase
HMHA1	histocompatibility (minor) HA-1
IL8RB	interleukin 8 receptor, beta
LITAF	lipopolysaccharide-induced TNF factor
PROK2	prokineticin 2
RASGRP4	RAS guanyl releasing protein 4
TLR1	toll-like receptor 1

1.3 – Regulação da transdução de sinal

LITAF	lipopolysaccharide-induced TNF factor
PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
RASGRP4	RAS guanyl releasing protein 4
RGS2	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa

2 – Diferenciação celular

ECGF1	endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)
MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
PF4	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
RASGRP4	RAS guanyl releasing protein 4
SEMA4A	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphoring) 4A
TNFAIP2	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2

3 – Proliferação celular

BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)
BTG2	BTG family, member 2
IL1B	interleukin 1, beta
IL8RB	interleukin 8 receptor, beta

	PROK2	prokineticin 2
	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
	RASGRP4	RAS guanyl releasing protein 4
	WARS	tryptophanyl-tRNA synthetase
4- Ciclo celular	CSK	c-src tyrosine kinase
	DUSP1	dual specificity phosphatase 1
	IL1B	interleukin 1, beta
	MAP2K6	mitogen-activated protein kinase kinase 6
	PPP1R15A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A
	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
	RGS2	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa
5 – Apoptose	CASP4	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase
	IL1B	interleukin 1, beta
	LITAF	lipopolysaccharide-induced TNF factor
	MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
	PPP1R15A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A
	PROK2	prokineticin 2
	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
6 – Modificação de proteínas	ATG3	ATG3 autophagy related 3 homolog (S. cerevisiae)
	CD37	CD37 molecule
	CSK	c-src tyrosine kinase
	DUSP1	dual specificity phosphatase 1
	FGR	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog
	FYB	FYN binding protein (FYB-120/130)
	HCK	hemopoietic cell kinase
	LIMK2	LIM domain kinase 2
	MAP2K6	mitogen-activated protein kinase kinase 6
	PPT1	palmitoyl-protein thioesterase 1 (ceroid-lipofuscinosis, neuronal 1, infantile)
	PSMB9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2)
	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
6.1 – Desfosforilação de aminoácidos de proteínas	DUSP1	dual specificity phosphatase 1
	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
6.2 - Fosforilação de aminoácidos de proteínas	CSK	c-src tyrosine kinase
	FGR	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog
	FYB	FYN binding protein (FYB-120/130)
	HCK	hemopoietic cell kinase
	LIMK2	LIM domain kinase 2
	MAP2K6	mitogen-activated protein kinase kinase 6

7 – Resposta imune

ADAR	adenosine deaminase, RNA-specific
AQP9	aquaporin 9
BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)
CD55	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group)
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
CLEC2B	C-type lectin domain family 2, member B
FCGR3B	Fc fragment of IgG, low affinity IIIb, receptor (CD16b)
FPRL1	formyl peptide receptor-like 1
FYB	FYN binding protein (FYB-120/130)
GBP2	guanylate binding protein 2, interferon-inducible
GNLY	Granulysin
IFITM2	interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)
IGHG1	immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)
IL16	interleukin 16 (lymphocyte chemoattractant factor)
IL1B	interleukin 1, beta
IL4R	interleukin 4 receptor
IL8RA	interleukin 8 receptor, alpha
IL8RB	interleukin 8 receptor, beta
PF4	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)
PROK2	prokineticin 2
PSMB9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2)
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial
TLR1	toll-like receptor 1

7.1 – Resposta inflamatória

BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
FPRL1	formyl peptide receptor-like 1
IL1B	interleukin 1, beta
IL8RA	interleukin 8 receptor, alpha
IL8RB	interleukin 8 receptor, beta
PF4	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)
PROK2	prokineticin 2
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
TLR1	toll-like receptor 1

8 – Regulação da transcrição

BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)
BTG2	BTG family, member 2
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
EGR1	early growth response 1
JUNB	jun B proto-oncogene
LITAF	Lipopolysaccharide-induced TNF factor

NRBF2	nuclear receptor binding factor 2
PNRC1	proline-rich nuclear receptor coactivator 1
SF1	splicing factor 1
SNW1	SNW domain containing 1
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial
TLE3	transducin-like enhancer of split 3 (E(sp1) homolog, Drosophila)
ZFP36	zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)
ZNF467	zinc finger protein 467

9- APÊNDICES



Short Communication

JAK2 V617F prevalence in Brazilian patients with polycythemia vera, idiopathic myelofibrosis and essential thrombocythemia

Bárbara da Costa Reis Monte-Mór, Anderson Ferreira da Cunha, Kátia Bórgia Barbosa Pagnano, Sara Terezinha Saad, Irene Lorand-Metze and Fernando Ferreira Costa

Centro de Hematologia e Hemoterapia, Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

Abstract

Polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and idiopathic myelofibrosis (IMF) are myeloproliferative disorders (MPD) that arise from the clonal proliferation of a pluripotent hematopoietic progenitor, leading to the overproduction of one or more myeloid lineages. Recently, a specific mutation in the *JAK2* gene, which encodes a tyrosine kinase, has been shown to be associated with the myeloproliferative phenotype observed in PV, ET and IMF. In this study of Brazilian patients, the *JAK2* V617F mutation [c.1887G > T] was detected in four out of 49 patients with PV (96%), 14 out of 25 patients with IMF (56%), and in eight out of 29 patients with ET, which is in accordance with previous screenings of this mutation in other populations.

Key words: *JAK2* V617F, myeloproliferative disorders, polycythemia vera, idiopathic myelofibrosis, essential thrombocythemia.

Received: July 14, 2006; Accepted: November 26, 2006.

Polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), idiopathic myelofibrosis (IMF) and chronic myelocytic leukemia (CML) are myeloproliferative disorders (MPD) that have been shown to arise clonally from a pluripotent hematopoietic stem cell (Fialkow *et al.*, 1967; Adamson *et al.*, 1976; Jacobson *et al.*, 1978; Fialkow *et al.*, 1981). Important manifestations of these disorders are bone marrow hypercellularity and pan-myeloid myeloproliferation, leading to overproduction of one or more hematopoietic lineages (Spivak *et al.*, 2003). In addition, constant hallmarks of MPD bone marrow cells are their hypersensitivity to several cytokines (Prchal and Axelrad, 1974; Dai *et al.*, 1992; Correa *et al.*, 1994; Dai *et al.*, 1994) and their ability to generate EPO-independent erythroid colonies *in vitro* (Prchal and Axelrad, 1974), commonly referred to as endogenous erythroid colonies (EECs). Recently, gene *JAK2*, which encodes a tyrosine kinase required for effective signaling in response to several cytokines (Parganas *et al.*, 1998), was found mutated in these conditions. A somatic mutation, c.1887G > T (p.Val617Phe), ref. sequence NM_004972, commonly known as *JAK2* V617F, has been described in the majority of patients with PV and in a subset of patients with ET and IMF (Baxter *et al.*, 2005; James *et al.*, 2005; Kralovics *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005; Zhao

et al., 2005). It is noteworthy that among the growth factors to which MPD hematopoietic progenitors are hypersensitive, EPO, SCF, GM-CSF, IL3, TPO and IGF-1 use *JAK2* for signaling (Kaushansky, 2005). It has been demonstrated that the valine-to-phenylalanine substitution at amino acid position 617 leads to constitutive tyrosine phosphorylation activity and promotes cytokine hypersensitivity (James *et al.*, 2005; Kralovics *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005). Moreover, EEC colonies cloned from PV patients were all shown to carry the mutation (Baxter *et al.*, 2005), and lethally-irradiated mice transplanted with *JAK2* V617F-expressing bone marrow developed substantial erythrocytosis (James *et al.*, 2005). These observations indicate that this mutation contributes to the myeloproliferative phenotype, a finding with direct implications in the establishment of diagnosis protocols and the patient management (Campbell and Green, 2005). Establishing the prevalence of this mutation in patients with PV, ET and IMF is of practical importance. This prompted us to carry out what is, to our knowledge, the first screening of the *JAK2* V617F mutation in Brazilian patients with PV, ET and IMF.

Peripheral blood samples were obtained from 49 patients with PV, 25 patients with IMF, and 29 patients with ET, seen at the Haematology and Haemotherapy Centre (UNICAMP, Brazil), from July through December, 2005. The diagnoses of PV, IMF and ET were made according to the World Health Organization (WHO) criteria, based on peripheral blood counts and bone marrow histology. Pe-

Send correspondence to Fernando F. Costa. Rua Carlos Chagas 480, Barão Geraldo, 13083-97 Campinas, SP, Brazil. E-mail: ferreira@unicamp.br.

ripheral blood samples from eight healthy volunteers were used as controls, since no healthy individuals have been shown to harbor the *JAK2* V617F mutation (Baxter *et al.*, 2005; James *et al.*, 2005; Kralovics *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005). The study protocol was approved by the local ethics committee, and informed consent was obtained from all patients. Genomic DNA was extracted using the GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham-Life Science). The presence of the *JAK2* V617F mutation was assessed as previously described (Baxter *et al.*, 2005). *JAK2* amplicons were obtained using primers *JAK2* forward (5'-GGGTTTCCTCAGAACGTTGA-3') and *JAK2* reverse (5'-TCATTGCTTTCCCTTTT CACAA-3'). PCR amplifications were performed in 50 µL reaction mixes containing 50-100 ng of genomic DNA, 0.2 mM dNTP's, 2 mM MgCl₂, 0.2 pmol of each primer, 1X PCR buffer, and 1U Taq DNA polymerase. The cycling parameters were as follows: 96 °C for 2 min followed by 45 cycles at 96 °C for 30 s, 57 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min. The 460 bp PCR product (Figure 1A) was submitted to *Bsa* XI (New England BioLabs inc.) digestion, for 16 h at 37 °C, and analyzed on a 2% agarose gel. The *JAK2* wild-type allele yields 241 bp, 189 bp and 30 bp *Bsa* XI fragments, while the *JAK2* V617F allele remains undigested, since the mutation causes loss of the enzyme site. The *Bsa* XI digestion pattern in *JAK2* V617F-negative patients and healthy controls is shown in Figure 1B, lanes 1 and 4. Patients who are positive for the mutation have both the undigested 460 bp fragment, corresponding to the *JAK2* V617F allele, and the *Bsa* XI fragments of the *JAK2* wild-type allele (Figure 1B, lanes 2 and 3). The intensity of the digested fragments visualized on the agarose gel varies from patient to patient, due to differences in the homozygous or heterozygous status of the mutation and in the proportion of clonal cells in the total population. This appears to be a time- and cost-effective methodology for the detection of the *JAK2* V617F mutation.

Among the 49 patients with PV studied, the *JAK2* V617F mutation was detected in 47 (96%). Among the patients with IMF, 14 out of 25 (56%) had the mutation, while eight (28%) of the 29 ET patients were positive. These frequencies are in agreement with those previously reported (Table 1).

There are already studies in the literature on the contribution of the *JAK2* mutation to clinical status and disease

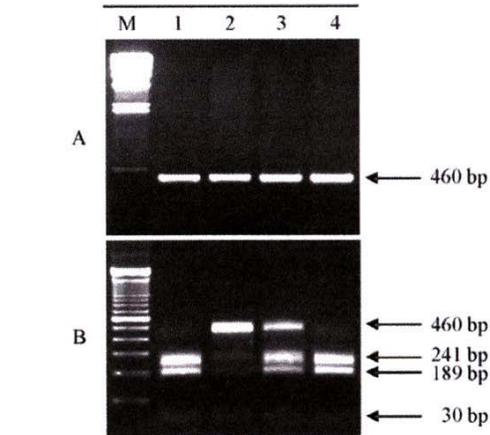


Figure 1 - *JAK2* V617F screening by PCR and *Bsa* XI digestion. Lanes 1-3: Patients with (1) essential thrombocythemia, ET; (2) polycythemia vera, PV; (3) idiopathic myelofibrosis, IMF. Lane 4: Control individual. (A) 460 bp undigested PCR product; lane M, λ -Hind III fragments (New England BioLabs Inc.); (B) *Bsa* XI digestion of the 460 bp PCR product yields 241 bp, 189 bp and 30 bp fragments from the wild-type allele; the fragment corresponding to the *JAK2* V617F mutation remains undigested: normal alleles in a patient with ET (1); a normal and a mutated allele in patients with PV (2) and IMF (3); normal alleles in a control individual (4). Lane M, 100 bp molecular weight ladder (New England BioLabs Inc.).

severity. A prospective study suggests that two ET subtypes can be defined according to the *JAK2* genotype, and that ET patients carrying the *JAK2* V617F mutation have phenotypic similarities with PV patients (Campbell *et al.*, 2005). A multicentric study of IMF patients demonstrated that there is no correlation between many of the clinical features and the presence of the *JAK2* V617F mutation, but, interestingly, *JAK2* V617F-positive patients had a decreased survival (Campbell *et al.*, 2006). It has been shown that, while most of the clinical characteristics of PV did not differ between *JAK2* V617F homozygous and heterozygous patients, the former had higher hemoglobin levels at the time of diagnosis, increased incidence of pruritus, higher rates of fibrotic transformation, and higher PRV-1 transcript levels in granulocytes (Tefferi *et al.*, 2006).

The discovery of this mutation has direct implications in the establishment of diagnosis protocols and in the management of patients (Campbell and Green, 2005), and has a great potential for the classification of MPDs and for the development of target therapy (Vainchenker and

Table 1 - Frequencies of the *JAK2* V617F mutation in Brazilian patients and in patients from the literature presenting with polycythemia vera, idiopathic myelofibrosis and essential thrombocythemia.

Myeloproliferative disorders	This study	Baxter <i>et al.</i> (2005)	James <i>et al.</i> (2005)	Kralovics <i>et al.</i> (2005)	Levine <i>et al.</i> (2005)	Zhao <i>et al.</i> (2005)
Polycythemia vera	47/49 (96%)	71/73 (97%)	40/45 (89%)	83/128 (65%)	121/164 (74%)	20/24 (84%)
Idiopathic myelofibrosis	14/25 (56%)	8/16 (50%)	3/7 (43%)	13/23 (57%)	16/46 (35%)	-
Essential thrombocythemia	8/29 (28%)	29/51 (57%)	9/21 (43%)	21/93 (23%)	37/115 (33%)	-

Constantinescu, 2005). *JAK2* genotyping of patients with PV, IMF and ET is likely to become a clinically useful assay, and sensitive, effective techniques for the routine detection of *JAK2* V617F are being developed and tested (James *et al.*, 2006; McClure *et al.*, 2006). Among the questions to be addressed in the investigation of the molecular pathogenesis of MPDs is how a single mutation can give rise to three phenotypically different diseases.

Acknowledgments

This study was supported by grants from FAPESP and CAPES.

References

- Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF and Steinmann L (1976) Polycythemia vera: Stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med* 295:913-916.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN and Green AR (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365:1054-1061.
- Campbell PJ and Green AR (2005) Management of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*: 201-208.
- Campbell PJ, Griesshammer M, Dohner K, Dohner H, Kusec R, Hasselbalch HC, Larsen TS, Pallisgaard N, Giraudier S, Le Bousse-Kerdiles MC, Desterke C, Guerton B, Dupriez B, Bordessoule D, Fenaux P, Kiladjian JJ, Viallard JF, Briere J, Harrison CN, Green AR and Reilly JT (2006) V617F mutation in *JAK2* is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. *Blood* 107:2098-2100.
- Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, Duffy A, Boyd EM, Bench AJ, Scott MA, Vassiliou GS, Milligan DW, Smith SR, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Harrison CN and Green AR (2005) Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on *JAK2* V617F mutation status: A prospective study. *Lancet* 366:1945-1953.
- Correa PN, Eskinazi D and Axelrad AA (1994) Circulating erythroid progenitors in polycythemia vera are hypersensitive to insulin-like growth factor-1 *in vitro*: Studies in an improved serum-free medium. *Blood* 83:99-112.
- Dai CH, Krantz SB, Dessypris EN, Means Jr. RT, Horn ST and Gilbert HS (1992) Polycythemia vera. II. Hypersensitivity of bone marrow erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocyte progenitor cells to interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 80:891-899.
- Dai CH, Krantz SB, Green WF and Gilbert HS (1994) Polycythemia vera. III. Burst-forming units-erythroid (BFU-E) response to stem cell factor and c-kit receptor expression. *Br J Haematol* 86:12-21.
- Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, Vaidya K and Murphy S (1981) Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. *Blood* 58:916-919.
- Fialkow PJ, Gartler SM and Yoshida A (1967) Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 58:1468-1471.
- Jacobson RJ, Salo A and Fialkow PJ (1978) Agnogenic myeloid metaplasia: A clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood* 51:189-194.
- James C, Delhommeau F, Marzac C, Teyssandier I, Couedic JP, Giraudier S, Roy L, Saulnier P, Lacroix L, Maury S, Tulliez M, Vainchenker W, Ugo V and Casadevall N (2006) Detection of *JAK2* V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. *Leukemia* 20:350-353.
- James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N and Vainchenker W (2005) A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434:1144-1148.
- Kaushansky K (2005) On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: It all makes sense. *Blood* 105:4187-4190.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M and Skoda RC (2005) A gain-of-function mutation of *JAK2* in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352:1779-1790.
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Frohling S, Dohner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ and Gilliland DG (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase *JAK2* in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7:387-397.
- McClure R, Mai M and Lasho T (2006) Validation of two clinically useful assays for evaluation of *JAK2* V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia* 20:168-171.
- Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, Vanin EF, Bodner S, Colamonici OR, van Deursen JM, Grosveld G and Ihle JN (1998) *Jak2* is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 93:385-395.
- Prchal JF and Axelrad AA (1974) Letter: Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N Engl J Med* 290:1382.
- Spivak JL, Barosi G, Tognoni G, Barbui T, Finazzi G, Marchioli R and Marchetti M (2003) Chronic myeloproliferative disorders. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*: 200-224.
- Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Strand JS, Elliott M, Mesa R, Li CY, Wadleigh M, Lee SJ and Gilliland DG (2006) The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous *JAK2*V617F in polycythemia vera. *Cancer* 106:631-635.
- Vainchenker W and Constantinescu SN (2005) A unique activating mutation in *JAK2* (V617F) is at the origin of polycythemia vera and allows a new classification of Myeloproliferative diseases. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*: 195-200.
- Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB and Zhao ZJ (2005) Identification of an Acquired *JAK2* Mutation in Polycythemia Vera. *J Biol Chem* 280:22788-22792.

Associate Editor: Peter L. Pearson

Artigo de revisão aceito para publicação na Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia

A mutação *JAK2* V617F e as síndromes mieloproliferativas

(*JAK2* V617F mutation and the myeloproliferative disorders)

Bárbara da Costa Reis Monte-Mór e Fernando Ferreira Costa

Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro)

Faculdade de Ciências Médicas (FCM)

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Campinas, SP – Brasil

Palavras-chave: *JAK2* V617F, síndromes mieloproliferativas, policitemia vera, trombocitemia essencial, mielofibrose idiopática

Keywords: *JAK2* V617F, myeloproliferative disorders, polycythemia vera, essential thrombocythemia, idiopathic myelofibrosis

Correspondência: Fernando F. Costa

Rua Carlos Chagas, 480 – Cidade Universitária

Barão Geraldo, Campinas, SP

13083-970 – Brazil

Phone: +55 19 37888734

FAX: +55 19 32891089

Email: ferreira@unicamp.br

Resumo

Síndromes mieloproliferativas (SMPs) são doenças hematopoéticas de origem clonal que apresentam amplificação de uma ou mais linhagens mielóides. Policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE), mielofibrose idiopática (MF) e leucemia mielóide crônica (LMC) são consideradas SMPs clássicas e apresentam características clínicas e biológicas comuns. Ao contrário de LMC, cuja etiologia está relacionada à proteína constitutivamente ativa Bcr-Abl, o mecanismo molecular de PV, TE e MF permaneceu por muito tempo desconhecido. Esta revisão se foca na recente descoberta da mutação *JAK2* V617F em pacientes com PV, TE e MF, sua relação com o fenótipo mieloproliferativo e implicações na abordagem clínica de pacientes.

Abstract

Myeloproliferative disorders (MPDs) are clonal hematopoietic diseases that show amplification of one or more myeloid lineages. Polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), idiopathic myelofibrosis (IMF) and chronic myeloid leukemia (CML) are considered classic MPDs and share common clinical and biological features. While the genetic basis of CML is shown to be the constitutive active protein Bcr-Abl, the main molecular lesion of PV, ET and IMF has long remained unknown. This review focuses on the recent discovery of the *JAK2* V617F mutation, its relation to the myeloproliferative phenotype and implications to the clinical approach of patients.

SÍNDROMES MIELOPROLIFERATIVAS

“Síndromes mieloproliferativas” (SMPs) foi o termo cunhado em 1951, quando William Dameshed observou que policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE), mielofibrose idiopática (MF) e leucemia mielóide crônica (LMC) apresentavam várias características clínicas e biológicas similares (1). Já em 2002, além das SMPs clássicas, a Organização Mundial de Saúde (OMS) incluiu em sua classificação doenças

mieloproliferativas menos freqüentes, como leucemia neutrofílica crônica (LNC), síndrome hipereosinofílica / leucemia eosinofílica crônica (SHE/LEC) e outras, não classificáveis (2).

As SMPs se originam por proliferação clonal de um progenitor hematopoético pluripotencial (3-6), levando à hematopoese exacerbada com expansão de uma ou mais linhagens (7). Entre as manifestações clínicas comuns às SMPs estão hiperplasia de medula óssea, hematopoese extramedular ocasionando esplenomegalia, transformação para leucemia aguda, desenvolvimento de mielofibrose e alto risco de hemorragia e trombose (7).

Progenitores hematopoéticos de SMPs possuem características biológicas marcantes, como hipersensibilidade a diversas citocinas, incluindo eritropoetina (EPO), interleucina 3 (IL-3), stem cell factor (SCF), insulin like growth factor (IGF-1), granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) e trombopoetina (TPO) (8-12) e a habilidade de gerar, in vitro, colônias eritróides independentes de eritropoetina, conhecidas como colônias eritróides endógenas (8).

A DESCOBERTA DE *JAK2 V617F*

Apesar de compartilharem aspectos clínicos e biológicos comuns, as etiologias da PV, da TE e da MF permaneceram por muito tempo desconhecidas, enquanto a fisiopatologia de outras SMPs e de algumas neoplasias mielóides relacionadas já indicavam papel importante de tirosino-quinases alteradas. Proteínas fusionadas hiperativas, resultantes de translocações, forneceram a base genética de SMPs, como Bcr-Abl na LMC (13) e FIP1L1-PDGFRalpha em alguns casos de SHE (14). Da mesma forma, FOP-FGFR1 e BCR-JAK2 foram associadas à LMC atípica (15, 16), e tel-PDGFRbeta à leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) (17), duas síndromes mielodisplásicas / mieloproliferativas. Ainda, mutações relevantes para a patologia de mastocitose sistêmica (MS) foram descritas nos genes *KIT* e *PDGFRA* (18).

O grande número de estudos concernentes as SMPs finalmente resultou, entre março e abril de 2005, na descrição de uma única mutação no gene *JAK2*, recorrente em pacientes com SMPs clássicas, Bcr-Abl negativas (19-23). A proteína *JAK2*, pertencente à família das Janus quinases, é também uma tirosina-quinase, fosforilada em resposta à ação

de diversas citocinas, ativando assim diferentes vias de sinalização intracelular e participando do processo de transdução do sinal (24). Trata-se de uma mutação pontual, a substituição de uma guanina por timina ($G \rightarrow T$) no éxon 14 do gene *JAK2*, levando à substituição de uma valina por fenilalanina ($V \rightarrow F$) na posição 617 da proteína codificada (*JAK2* V617F). Esta alteração é somática, adquirida, sendo detectada em células de linhagem eritróide e mielóide, mas não em células T (19-21) ou células da mucosa bucal (22).

Métodos sensíveis demonstram a mutação em mais de 95% de pacientes com PV e em 50-60% de pacientes com TE ou MF (25). Em nosso estudo com pacientes brasileiros, utilizando metodologia de reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de digestão enzimática, detectamos a mutação em 96% de pacientes com PV, 28% de pacientes com TE e 56% de pacientes com MF (26). A mutação *JAK2* V617F pode também ser encontrada em outras doenças mielóides, incluindo leucemia mieloide aguda (LMA), síndromes mielodisplásicas (SMD), LMMC, leucemia monomielocítica juvenil (LMMJ), LNC, SHE/LEC, MS e SMPs atípicas (27-29). No entanto, *JAK2* V617F não é encontrada em eritrocitose secundária (20), em casos de SMP com alteração molecular definida, como Bcr-Abl ou outras tirosino-quinases hiperativas (27, 28), em doenças linfóides agudas ou crônicas (28-31) ou em neoplasias não-hematológicas (32).

***JAK2* V617F E O FENÓTIPO MIELOPROLIFERATIVO**

Desde sua descoberta, a relevância da mutação *JAK2* V617F na gênese das SMPs foi intensivamente estudada. Com relação à atividade tirosino-quinase e sinalização intracelular induzidas pela mutação, experimentos com diferentes linhagens celulares transfectadas com *JAK2* V617F demonstraram autofosforilação constitutiva de *JAK2*, fosforilação constitutiva do fator de transcrição STAT5 e ativação das vias ERK e PI(3)K/Akt (20, 22, 23), além da indução de transcrição dependente de STAT5 na ausência de EPO (20).

Esta sinalização exacerbada levaria tanto à hipersensibilidade quanto à independência de fatores de crescimento, como demonstrado em curvas de crescimento de linhagens transfectadas com *JAK2* V617F na ausência ou em concentrações crescentes de IL-3 ou EPO (20-22).

Ensaio de siRNA com redução de expressão de JAK2 mostraram diminuição de diferenciação eritróide normal em células de pacientes portadores de PV, assim como inibição da formação de colônias eritróides espontâneas (20). Concentrações crescentes de um inibidor de JAK2 também causaram diminuição da proliferação de células da linhagem HEL, portadoras da mutação *JAK2* V617F (22). Camundongos letalmente irradiados que tiveram seu sistema hematopoético reconstituído por células contendo a mutação desenvolveram eritrocitose, com aumento de hematócrito a 60% (20).

Além deste achados, compatíveis com o fenótipo observado nas SMPs, nota-se que a mutação ativadora de JAK2 explicaria outras alterações, também descritas em SMPs:

1- Dos fatores de crescimento aos quais os progenitores SMP são hipersensíveis, EPO, TPO, IL-3, GM-CSF e SCF utilizam JAK2 para sinalização intracelular (33).

2- Alterações observadas em diversas moléculas de sinalização intracelular ativadas pela via JAK2, como ativação constitutiva de STAT3 (34), superexpressão de Bcl-x1 (35) e aumento de atividade Akt (36),

3- Envolvimento da via JAK2 na diferenciação eritróide terminal (37).

4- Perda de heterozigose devido à recombinação mitótica no braço curto do cromossomo 9 (38), onde se localiza o gene *JAK2*.

Como colocado por Kaushansky: “tudo faz sentido!” (39). No entanto, esta descoberta permitiu que outras importantes questões fossem levantadas, por exemplo, como uma única mutação pode desencadear três doenças com características distintas (PV, TE e MF)? Que mecanismos moleculares são ativados nas diferentes linhagens hematopoéticas? Que mecanismos determinam a doença nos pacientes em que não se detecta a mutação?

Como uma única mutação pode desencadear três doenças distintas?

Atualmente três hipóteses são propostas para se compreender como a mesma mutação poderia dar origem a três doenças fenotipicamente distintas. A primeira postula que o fenótipo da doença dependeria da natureza da célula progenitora afetada pela mutação. Uma segunda hipótese seria de que o nível da atividade quinase gerada pela

mutação determinaria o perfil da doença. Ainda uma terceira considera que eventos alternativos e / ou adicionais poderiam ser responsáveis pela variedade clínica ou mesmo preceder a mutação (40, 41).

1. Natureza da célula progenitora

Os fenótipos de PV, TE e MF variam pela extensão com que as linhagens eritrocitária, megacariocítica ou granulocítica estão envolvidas (42). Na PV, há aumento proeminente de massa eritrocitária, enquanto em TE a contagem de plaquetas aumenta dramaticamente (43). Em mielofibrose a hiperproliferação de células mielóides e megacariocíticas na medula óssea estimulam a proliferação de fibroblastos residentes, levando à deposição de colágeno e fibrose da medula óssea (43). Poderia-se, portanto, especular que a clínica destas doenças é determinada pela capacidade da célula progenitora afetada pela mutação de se diferenciar nas diferentes linhagens. No entanto, esta hipótese parece ser pouco provável, uma vez que evidências recentes demonstram que, ao menos em PV e MF, a célula mutada tem caráter multipotencial (44, 45).

2. Nível de atividade JAK2 V617F

Esta segunda hipótese sugere que baixos níveis de atividade quinase favoreceriam um fenótipo megacariocítico (TE) e altos níveis, um fenótipo eritróide (PV). Atividade quinase sustentada, dependendo do nível e tempo de exposição, levariam à mielofibrose (40, 41). Diversas evidências parecem suportar este mecanismo proposto, como experimentos em modelos animais e análises de zigose em pacientes.

Em camundongos letalmente irradiados que tiveram seu sistema hematopoético reconstituídos por células com superexpressão de *JAK2 V617F*, observou-se rápido aparecimento de eritrocitose e, após alguns meses de exposição, aparecimento de mielofibrose, mimetizando a evolução natural da doença no homem (46, 47). Ainda, trombocitose transitória só foi observada no grupo expressando baixos níveis de *JAK2 V617F* (46).

Já em pacientes com SMPs, a zigose parece ter papel importante na determinação do fenótipo. A homozigose aumenta a atividade quinase mutada não só por duplicação gênica decorrente de recombinação mitótica (21), como provavelmente também pela falta de competição com a proteína selvagem (20), e o clone homozigoto teria uma vantagem proliferativa (40). De fato, em alguns pacientes com PV se observou transição de uma população mista heterozigota / homozigota para uma população predominantemente homozigota (48, 49).

Quantificações de *JAK2* V617F em SMPs mostraram que a grande maioria de pacientes com TE é heterozigota para a mutação (93-100%), enquanto 28% (21-35%) de pacientes com PV e 14% de pacientes com MF (0-21%) são homozigotos (29).

A avaliação da clínica de pacientes com SMPs à luz destas observações indica que pacientes com TE positivos para a mutação poderiam ser vistos como uma manifestação incompleta de PV. Comparados a pacientes com TE *JAK2* V617F-negativos, a mutação confere à TE características de PV, incluindo nível aumentado de hemoglobina e resposta similar a tratamento (50). Em PV, observou-se que pacientes homozigotos apresentaram níveis de hemoglobina e taxas de transformação fibrótica maiores que pacientes heterozigotos para a mutação (51). Ainda, pacientes com fibrose apresentaram maior quantidade de alelo mutado que indivíduos sem fibrose, e pacientes com PV cuja doença evoluiu para MF têm granulócitos predominantemente homozigotos (49), sugerindo que altos níveis de atividade *JAK2* quinase poderiam levar à fibrose.

Assim, sugere-se que PV, TE e MF poderiam ser interpretadas como etapas diferentes da mesma doença, cujo processo se iniciaria pela mutação em heterozigose levando à TE, sendo a progressão para PV e MF regulada por eventos que aumentariam a atividade quinase e pelo tempo de exposição (40, 41). Nota-se também que este modelo seria compatível com o padrão geral de evolução clínica, severidade e prevalência das três doenças (41).

Entre os eventos que aumentam a atividade *JAK2* V617F poderiam estar a duplicação do alelo mutado por recombinação mitótica (21), trissomia 9p (52) ou outros, como desregulação de fosfatases (53), proteínas supressoras de sinalização de citocinas (SOCS) (54) e polimorfismos ou mutações em receptores de citocinas (55). Neste sentido,

haveria uma sobreposição entre as hipóteses “nível de atividade *JAK2 V617F*” e “eventos adicionais e / ou alternativos”, para explicar a diversidade clínica em SMPs.

3. Eventos adicionais e / ou alternativos

Uma terceira hipótese seria de que outros eventos, que não a mutação *JAK2 V617F*, poderiam determinar o fenótipo final da doença ou mesmo preceder à mutação.

Além das já citadas alterações que afetam diretamente a atividade *JAK2 V617F*, destacam-se outros modificadores. De uma forma geral, o contexto genético parece influenciar no desenvolvimento da doença induzida pela mutação, como observado em diferentes linhagens de camundongos letalmente irradiados que tiveram seu sistema hematopoético reconstituído por células *JAK2 V617F* (47). Sugere-se também que o sexo poderia ser um outro fator, pois nota-se que TE é mais comum em mulheres e PV, em homens (50). Ainda, pacientes com MF apresentam alta frequência de anormalidades cromossômicas (56), que poderiam contribuir para o fenótipo da doença.

De outro modo, um estudo com SMPs familiares mostra que também nestes casos, a mutação *JAK2 V617F* é adquirida, sugerindo que poderiam haver fatores genéticos anteriores, precedendo e favorecendo a ocorrência da mutação (57). A observação de clones leucêmicos *JAK2 V617F*-negativos em pacientes SMP *JAK2 V617F*-positivos indicariam que a mutação pode não ser o evento clonogênico inicial da doença (58, 59).

Que mecanismos moleculares são ativados nas diferentes linhagens hematopoéticas?

Como anteriormente discutido, os estudos iniciais mostram que *JAK2 V617F* é uma quinase constitutivamente ativa, porém os exatos mecanismos moleculares pelos quais esta mutação induz sinalização independente de citocina não são conhecidos (60).

A hipótese atualmente mais aceita para explicar os efeitos de *JAK2 V617F* prediz que a proteína mutante interaja com o receptores normalmente ligados por *JAK2*, ou seja, receptor para EPO (EPOR), receptor para TPO (TPOR ou Mpl), receptor para granulocyte-specific colony-stimulating factor (G-CSF) (G-CSFR) e outros, e que estes

complexos sejam as entidades constitutivamente ativas (60). Estudos sobre a interação entre a proteína mutada e os receptores parecem suportar esta hipótese.

Primeiramente, ensaios *in vitro* mostraram que células portando somente JAK2 mutada respondem à presença de citocinas e, ainda que os mecanismos possam não ser os mesmos induzidos por JAK2 WT ativada, sugerem que JAK2 V617F tem capacidade de ligar aos receptores e ativar sinalização via domínios citosólicos do receptor (61).

A seguir, com relação à maturação e ao tráfego intracelular de receptores, sabe-se que JAK2 WT promove estes processos para EPOR (62) e TPOR (63). JAK2 WT é também necessária à estabilização da forma madura de TPOR, sua localização na superfície celular e reciclagem (63). Evidências iniciais mostraram que JAK2 V617F promove eficientemente o tráfego de EPOR, mas não de TPOR (Staerk et al, manuscript in preparation) e (60). Infere-se, deste modo, que pacientes homocigotos para a mutação tenham baixa expressão de TPOR na superfície celular (60). Esta hipótese concordaria com observações anteriores de que plaquetas e megacariócitos de pacientes com PV e pacientes com MF apresentam níveis baixos de TPOR na superfície celular (64) e maturação deficiente deste receptor (65).

Um terceiro aspecto relevante é a observação de que a proteína mutada, expressa em níveis endógenos, requer co-expressão de receptor homodimérico de tipo 1, como EPOR, TPOR ou G-CSFR para independência de fatores de crescimento e ativação constitutiva da via JAK-STAT (66). Este fenômeno poderia contribuir para a restrição da patogênese induzida por JAK2 V617F à linhagem mielóide, uma vez que a linhagem linfóide não expressa receptores do tipo 1 (40).

Ainda com relação à atividade da mutação, descreveu-se interação de JAK2 V617F com a via do receptor IGF-1 (IGF1R) (61), fato este que explicaria a hipersensibilidade a IGF-1 descrita em progenitores SMPs (10).

Apesar destes achados indicarem que haveria uma interação diferencial da proteína mutada com os receptores expressos nas diferentes linhagens hematopoéticas, ainda permanece desconhecido o papel destes complexos JAK2 V617F-receptor no desenvolvimento de PV, TE e MF.

Que alteração são responsáveis pelo desenvolvimento da doença em paciente *JAK2 V617F*-negativos?

Mesmo que diversos estudos relacionem a mutação *JAK2 V617F* a SMPs, nota-se que uma proporção significativa de pacientes com TE e pacientes com MF são negativos para a mutação. No intuito de se identificarem, nestes pacientes, os mecanismos reponsáveis pelo desenvolvimento da doença, descobriu-se recentemente uma mutação ativadora somática no domínio transmembrana de Mpl (*MPL W515L*) em 9% de pacientes com MF *JAK2 V617F*-negativos (67). A mutação *MPL W515L* conferiu crescimento independente de citocinas e hipersensibilidade à TPO, além de sinalização intracelular aumentada (67). No modelo animal expressando a mutação, observou-se fenótipo mieloproliferativo, com trombocitose marcante, hematopoese extramedular levando à esplenomegalia e fibrose (67). Um estudo posterior descreveu uma nova mutação *MPL (MPL W515K)* e concluiu que mutações *MPL* estão presentes em 5% de pacientes com MF e 1% de pacientes com TE, mas não em PV ou outras doenças mielóides (68). Tomados em conjunto estes trabalhos sugerem que mutações *MPL* sejam relevantes para fisiopatologia de TE e MF.

Ainda, quatro novas mutações foram descritas no éxon 12 do gene *JAK2* em 10 pacientes com PV negativos para *JAK2 V617F*. Todas elas parecem ser mutações somáticas, presente apenas em pacientes com fenótipo policitêmico *JAK2 V617F*-negativos e não em pacientes com TE (69). Curiosamente, diferente da mutação *JAK2 V617F*, que está presente em homozigose na maioria das dos progenitores hematopoéticos em PV (48), as recém-descritas mutações no éxon 12 de *JAK2* estão presentes em heterozigose nestas células (69). Ainda assim, são responsáveis por hipersensibilidade a fatores de crescimento e ativação de vias associadas a sinalização de EPO, sendo que três delas, contendo a substituição K539L, geraram níveis de fosforilação *JAK2* e vias associadas notadamente mais altos que *JAK2 V617F* (69). Os modelos animais reproduziram fenótipos similares ao observado em pacientes portando as mutações K539L, ou seja, hematócrito elevado e contagem de leucócitos e de plaquetas mais baixas que as observadas para células *JAK2 V617F* (69). Estes resultados parecem concordar com a hipótese de que baixos níveis de atividade *JAK2 V617F* estariam associados à TE e altos, à PV.

JAK2 V617F E A ABORDAGEM CLÍNICA EM SMPS

A descoberta de mutações, principalmente *JAK2* V617F, em pacientes SMP tem implicações diretas para a abordagem clínica, ou seja, diagnóstico, prognóstico e terapia destas doenças.

Neste sentido, um aspecto relevante a ser considerado é a detecção de *JAK2* V617F. Variações marcantes na frequência da mutação são observadas entre os diferentes estudos, e acredita-se que um dos fatores responsáveis por estas diferenças seja a sensibilidade do método utilizado (29). Atualmente, diversas técnicas para detecção de *JAK2* V617F têm sido desenvolvidas, testadas e validadas quanto a sua sensibilidade e especificidade (27, 70-72). A sensibilidade do teste pode também ser afetada tanto pelo tipo celular (neutrófilos X outras células) quanto pelo ácido nucleico extraído (DNA genômico X RNA) da amostra a ser analisada (29). Espera-se que, em breve, comparações entre as técnicas sejam realizadas para esclarecimento destas questões.

Um resultado positivo para *JAK2* V617F tem significado claramente distinto para PV, TE e MF, porém parece ser relevante para o estabelecimento de novos critérios diagnósticos para as três doenças. Recentemente, clínicos, cientistas e patologistas especializados na área propuseram uma revisão dos critérios da OMS (73). Conforme previamente exposto, a mutação *JAK2* V617F é específica para doenças mielóides neoplásicas, e sua detecção exclui policitemia secundária ou trombocitose / mielofibrose decorrentes de outras doenças (73). *JAK2* V617F ou mutações no éxon 12 de *JAK2* estão presentes em virtualmente todos os pacientes com PV. Por isso, na nova proposta, é considerada como um critério maior, substituindo a maioria dos critérios A e B atuais da OMS (73) e simplificando drasticamente o diagnóstico de PV. Por outro lado, em TE e MF a mutação está presente em cerca de 50% dos pacientes e sua detecção é sugerida como um teste complementar, não excluindo a necessidade de biópsia de medula óssea (73).

Também de grande importância para a prática clínica é a compreensão do papel de *JAK2* V617F no prognóstico dos pacientes SMP. Demonstrou-se que a mutação está relacionada a marcadores biológicos como formação de CEE (74) e superexpressão de PRV-1 (74, 75) anteriormente descritos em SMPs (8, 76). Também está associada à ativação de plaquetas (77) e granulócitos (49) e à mobilização constitutiva de células

CD34+ (49). Paralelamente, estudos mostram que, em TE, a mutação está associada a altos níveis de hemoglobina, contagem de neutrófilos e taxa de transformação para PV (50, 78), baixos níveis de EPO sérica e ferritina (50), além de maior risco de eventos trombóticos (79). Já em pacientes com PV, observou-se que homozigotos para a mutação têm maior incidência de prurido, maiores níveis de hemoglobina ao diagnóstico e taxa de transformação fibrótica (51). Tanto em pacientes com PV quanto em pacientes com TE, a homozigose para *JAK2* V617F está associada à maior frequência de transformação mielofibrótica (80). Em MF, achou-se que *JAK2* V617F está associada a contagens mais elevadas de neutrófilos e leucócitos, menor necessidade de transfusão e pior sobrevida (81).

No que concerne o tratamento de SMPs, descreveu-se que pacientes com TE positivos para a mutação, fenotipicamente similares a pacientes com PV, são mais sensíveis ao tratamento com hidroxiuréia do que pacientes com TE *JAK2* V617F-negativos (50), o que poderia sugerir mudanças em protocolos de tratamento em função da presença da mutação. A quantificação de *JAK2* V617F por técnicas de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR), seria uma maneira, como Bcr-Abl em LMC, de se avaliar a intensidade da doença em um paciente, sendo realizada ao diagnóstico e seqüencialmente testada ao longo do tratamento (41), como já mostrado para pacientes com PV tratados com interferon alfa (82) e um paciente MF que recebeu transplante de células tronco alogênicas (83). Obviamente, referindo-se ao tratamento de pacientes, o principal benefício esperado, observada a inibição específica de Bcr-Abl por imatinib e sua eficácia no tratamento de LMC (84), é o desenvolvimento de terapia molecular também para SMPs *JAK2* V617F-positivas.

CONCLUSÃO

A recente descoberta da mutação *JAK2* V617F contribuiu significativamente para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos de SMPs Bcr-Abl negativas. Diversas evidências *in vitro* e *in vivo* associam a mutação à sinalização intracelular exacerbada e proliferação eritróide. Estudos atuais procuram compreender como um única mutação poderia estar envolvida na gênese de três doenças fenotipicamente distintas como PV, TE e MF, além de caracterizar os exatos mecanismos moleculares desencadeados. De outro

modo, outras mutações em *JAK2* e *MPL* já foram identificadas em pacientes negativos para mutação *JAK2* V617. Além disso, destaca-se o impacto imediato com relação à abordagem clínica das SMPs, no que concerne o diagnóstico, prognóstico e tratamento dos pacientes. Assim, torna-se evidente a expectativa de avanços no esclarecimento da fisiopatologia das SMPs, na detecção rotineira da mutação para diagnóstico e acompanhamento dos pacientes e no desenvolvimento de terapia alvo específica para *JAK2* V617F.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951;6(4):372-5.
2. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100(7):2292-302.
3. Fialkow PJ, Gartler SM, Yoshida A. Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1967;58(4):1468-71.
4. Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinmann L. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med* 1976;295(17):913-6.
5. Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ. Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood* 1978;51(2):189-94.
6. Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, Vaidya K, Murphy S. Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. *Blood* 1981;58(5):916-9.
7. Spivak JL, Barosi G, Tognoni G, Barbui T, Finazzi G, Marchioli R, et al. Chronic myeloproliferative disorders. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2003:200-24.
8. Prchal JF, Axelrad AA. Letter: Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N Engl J Med* 1974;290(24):1382.
9. Dai CH, Krantz SB, Dessypris EN, Means RT, Jr., Horn ST, Gilbert HS. Polycythemia vera. II. Hypersensitivity of bone marrow erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocyte progenitor cells to interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1992;80(4):891-9.
10. Correa PN, Eskinazi D, Axelrad AA. Circulating erythroid progenitors in polycythemia vera are hypersensitive to insulin-like growth factor-1 in vitro: studies in an improved serum-free medium. *Blood* 1994;83(1):99-112.

11. Dai CH, Krantz SB, Green WF, Gilbert HS. Polycythaemia vera. III. Burst-forming units-erythroid (BFU-E) response to stem cell factor and c-kit receptor expression. *Br J Haematol* 1994;86(1):12-21.
12. Axelrad AA, Eskinazi D, Correa PN, Amato D. Hypersensitivity of circulating progenitor cells to megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu MGDF) in essential thrombocythemia. *Blood* 2000;96(10):3310-21.
13. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;96(10):3343-56.
14. Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, Stover EH, Legare RD, Cortes J, et al. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med* 2003;348(13):1201-14.
15. Guasch G, Delaval B, Arnoulet C, Xie MJ, Xerri L, Sainty D, et al. FOP-FGFR1 tyrosine kinase, the product of a t(6;8) translocation, induces a fatal myeloproliferative disease in mice. *Blood* 2004;103(1):309-12.
16. Griesinger F, Hennig H, Hillmer F, Podleschny M, Steffens R, Pies A, et al. A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11.2) translocation in a patient with a clinically typical chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;44(3):329-33.
17. Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 1994;77(2):307-16.
18. Tefferi A, Pardanani A. Clinical, genetic, and therapeutic insights into systemic mast cell disease. *Curr Opin Hematol* 2004;11(1):58-64.
19. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365(9464):1054-61.

20. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434(7037):1144-8.
21. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352(17):1779-90.
22. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7(4):387-97.
23. Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, et al. Identification of an Acquired JAK2 Mutation in Polycythemia Vera. *J Biol Chem* 2005;280(24):22788-92.
24. Ihle JN, Witthuhn BA, W. QF, K. Y, Silvennoinen O. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Ann. Rev. Immunol.* 1995;13:369-398.
25. Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2006;355(23):2452-66.
26. Monte-Mór BCR, Cunha AF, Pagnano, K.B.B. S, S. T., Lorand-Metze I, Costa FF. JAK2 V617F prevalence in Brazilian patients with polycythemia vera, idiopathic myelofibrosis and essential thrombocythemia. *Genetics and Molecular Biology* 2007;30(2):336-338.
27. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005;106(6):2162-8.
28. Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, Bueso-Ramos C, Prchal JT, Verstovsek S, et al. JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood* 2005;106(10):3370-3.
29. Tefferi A, Pardanani A. Mutation screening for JAK2V617F: when to order the test and how to interpret the results. *Leuk Res* 2006;30(6):739-44.

30. Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ, Loh ML, Beran M, Stoffregen E, et al. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005;106(10):3377-9.
31. Scott LM, Campbell PJ, Baxter EJ, Todd T, Stephens P, Edkins S, et al. The V617F JAK2 mutation is uncommon in cancers and in myeloid malignancies other than the classic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005;106(8):2920-1.
32. Lee JW, Kim YG, Soung YH, Han KJ, Kim SY, Rhim HS, et al. The JAK2 V617F mutation in de novo acute myelogenous leukemias. *Oncogene* 2006;25(9):1434-6.
33. Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 1998;93(3):385-95.
34. Roder S, Steimle C, Meinhardt G, Pahl HL. STAT3 is constitutively active in some patients with Polycythemia rubra vera. *Exp Hematol* 2001;29(6):694-702.
35. Silva M, Richard C, Benito A, Sanz C, Olalla I, Fernandez-Luna JL. Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* 1998;338(9):564-71.
36. Dai C, Chung IJ, Krantz SB. Increased erythropoiesis in polycythemia vera is associated with increased erythroid progenitor proliferation and increased phosphorylation of Akt/PKB. *Exp Hematol* 2005;33(2):152-8.
37. Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, Larbret F, Lecluse Y, Debili N, et al. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol* 2004;32(2):179-87.
38. Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol* 2002;30(3):229-36.
39. Kaushansky K. On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. *Blood* 2005;105(11):4187-90.

40. Delhommeau F, Pisani DF, James C, Casadevall N, Constantinescu S, Vainchenker W. Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. *Cell Mol Life Sci* 2006;63(24):2939-53.
41. Villeval JL, James C, Pisani DF, Casadevall N, Vainchenker W. New insights into the pathogenesis of JAK2 V617F-positive myeloproliferative disorders and consequences for the management of patients. *Semin Thromb Hemost* 2006;32(4 Pt 2):341-51.
42. Spivak JL. The chronic myeloproliferative disorders: clonality and clinical heterogeneity. *Semin Hematol* 2004;41(2 Suppl 3):1-5.
43. Pahl HL. Towards a molecular understanding of polycythemia rubra vera. *Eur J Biochem* 2000;267(12):3395-401.
44. Delhommeau F, Dupont S, Tonetti C, Masse A, Godin I, Le Couedic JP, et al. Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2007;109(1):71-7.
45. Jamieson CH, Gotlib J, Durocher JA, Chao MP, Mariappan MR, Lay M, et al. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(16):6224-9.
46. Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Gachelin FM, Vainchenker W, Villeval JL. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood* 2006;108(5):1652-60.
47. Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH, Gilliland DG. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 2006;107(11):4274-81.
48. Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, Green AR. Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood* 2006;108(7):2435-7.

49. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Della Porta MG, Boveri E, Pascutto C, et al. Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood* 2006;107(9):3676-82.
50. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005;366(9501):1945-53.
51. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Strand JS, Elliott M, Mesa R, et al. The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera. *Cancer* 2006;106(3):631-5.
52. Andrieux JL, Demory JL. Karyotype and molecular cytogenetic studies in polycythemia vera. *Curr Hematol Rep* 2005;4(3):224-9.
53. Xu MJ, Sui X, Zhao R, Dai C, Krantz SB, Zhao ZJ. PTP-MEG2 is activated in polycythemia vera erythroid progenitor cells and is required for growth and expansion of erythroid cells. *Blood* 2003;102(13):4354-60.
54. Hookham MB, Elliott J, Suessmuth Y, Staerk J, Ward AC, Vainchenker W, et al. The myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant escapes negative regulation by suppressor of cytokine signaling 3. *Blood* 2007;109(11):4924-9.
55. Moliterno AR, Williams DM, Gutierrez-Alamillo LI, Salvatori R, Ingersoll RG, Spivak JL. Mpl Baltimore: a thrombopoietin receptor polymorphism associated with thrombocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(31):11444-7.
56. Bench AJ, Pahl HL. Chromosomal abnormalities and molecular markers in myeloproliferative disorders. *Semin Hematol* 2005;42(4):196-205.
57. Bellanne-Chantelot C, Chaumarel I, Labopin M, Bellanger F, Barbu V, De Toma C, et al. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006;108(1):346-52.

58. Campbell PJ, Baxter EJ, Beer PA, Scott LM, Bench AJ, Huntly BJ, et al. Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation. *Blood* 2006;108(10):3548-55.
59. Theocharides A, Boissinot M, Girodon F, Garand R, Teo SS, Lippert E, et al. Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation. *Blood* 2007;110(1):375-379.
60. Staerk J, Kallin A, Royer Y, Diaconu CC, Dusa A, Demoulin JB, et al. JAK2, the JAK2 V617F mutant and cytokine receptors. *Pathol Biol (Paris)* 2007;55(2):88-91.
61. Staerk J, Kallin A, Demoulin JB, Vainchenker W, Constantinescu SN. JAK1 and Tyk2 activation by the homologous polycythemia vera JAK2 V617F mutation: cross-talk with IGF1 receptor. *J Biol Chem* 2005;280(51):41893-9.
62. Huang LJ, Constantinescu SN, Lodish HF. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol Cell* 2001;8(6):1327-38.
63. Royer Y, Staerk J, Costuleanu M, Courtoy PJ, Constantinescu SN. Janus kinases affect thrombopoietin receptor cell surface localization and stability. *J Biol Chem* 2005;280(29):27251-61.
64. Moliterno AR, Hankins WD, Spivak JL. Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* 1998;338(9):572-80.
65. Moliterno AR, Spivak JL. Posttranslational processing of the thrombopoietin receptor is impaired in polycythemia vera. *Blood* 1999;94(8):2555-61.
66. Lu X, Levine R, Tong W, Wernig G, Pikman Y, Zarnegar S, et al. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(52):18962-7.
67. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006;3(7):e270.

68. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006;108(10):3472-6.

69. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007;356(5):459-68.

70. James C, Delhommeau F, Marzac C, Teyssandier I, Couedic JP, Giraudier S, et al. Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. *Leukemia* 2006;20(2):350-3.

71. McClure R, Mai M, Lasho T. Validation of two clinically useful assays for evaluation of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2006;20(1):168-71.

72. Campbell PJ, Scott LM, Baxter EJ, Bench AJ, Green AR, Erber WN. Methods for the detection of the JAK2 V617F mutation in human myeloproliferative disorders. *Methods Mol Med* 2006;125:253-64.

73. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* In press 2007.

74. Goerttler PS, Steimle C, Marz E, Johansson PL, Andreasson B, Griesshammer M, et al. The Jak2V617F mutation, PRV-1 overexpression, and EEC formation define a similar cohort of MPD patients. *Blood* 2005;106(8):2862-4.

75. Tefferi A, Sirhan S, Lasho TL, Schwager SM, Li CY, Dingli D, et al. Concomitant neutrophil JAK2 mutation screening and PRV-1 expression analysis in myeloproliferative disorders and secondary polycythaemia. *Br J Haematol* 2005;131(2):166-71.

76. Klippel S, Strunck E, Busse CE, Behringer D, Pahl HL. Biochemical characterization of PRV-1, a novel hematopoietic cell surface receptor, which is overexpressed in polycythemia rubra vera. *Blood* 2002;100(7):2441-8.

77. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larran A, Reverter JC, Villamor N, Colomer D, Cervantes F. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica* 2006;91(2):169-75.
78. Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, McClure RF, Wadleigh M, Lee SJ, et al. JAK2 mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol* 2005;131(2):208-13.
79. Finazzi G, Rambaldi A, Guerini V, Carobbo A, Barbui T. Risk of thrombosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera according to JAK2 V617F mutation status. *Haematologica* 2007;92(1):135-6.
80. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R, et al. Clinical profile of homozygous JAK2V617F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood* In press 2007.
81. Campbell PJ, Griesshammer M, Dohner K, Dohner H, Kusec R, Hasselbalch HC, et al. V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2006;107(5):2098-100.
82. Kiladjian JJ, Cassinat B, Turlure P, Cambier N, Roussel M, Bellucci S, et al. High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon alpha-2a. *Blood* 2006;108(6):2037-40.
83. Ruiz-Arguelles GJ, Garcés-Eisele J, Reyes-Nunez V, Ruiz-Delgado GJ, Rosillo C, Camoriano JK. Clearance of the Janus kinase 2 (JAK2) V617F mutation after allogeneic stem cell transplantation in a patient with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Am J Hematol* 2007;82(5):400-2.
84. Mauro MJ, O'Dwyer ME, Druker BJ. ST1571, a tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia: validating the promise of molecularly targeted therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001;48 Suppl 1:S77-8.

Artigo submetido para publicação na revista Blood
Constitutive JunB Expression, Associated with the JAK2 V617F Mutation,
Stimulates Proliferation of the Erythroid Lineage

Bárbara da Costa Reis Monte-Mór¹⁻⁴, Isabelle Plo²⁻⁴, Anderson Ferreira da Cunha¹, Gustavo Gilson Lacerda Costa¹, Dulcinéia Martins de Albuquerque¹, Sabrina Badaoui²⁻⁴, Irene Lorand-Metze¹, Kátia Bórgia Barbosa Pagnano¹, Sara Terezinha Ollala Saad¹, William Vainchenker^{2-4*} and Fernando Ferreira Costa^{1*}

¹Hematology and Hemotherapy Center, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil; ²INSERM, UMR790, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; ³Université Paris XI, UMR790, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; ⁴Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

Running title: JunB expression and JAK2 V617F in erythropoiesis

***Co-corresponding authors:**

Fernando Ferreira Costa, Hemocentro, Unicamp, rua Campinas, SP, Brazil. Phone: +55 19 35218734 FAX: +55 19 32891089. Email: ferreira@unicamp.br Carlos Chagas, 480, 13083-970, Cidade Universitária, Barão Geraldo,

William Vainchenker, INSERM U790, Institut Gustave Roussy, 39 Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France. Phone: +33 1 42 11 42 33. Email: verpre@igr.fr

Scientific heading: Hematopoiesis

Total word count: 4743

Abstract word count: 190

Abstract

The *JAK2* V617F mutation, present in the majority of polycythemia vera (PV) patients, causes constitutive activation of JAK2 and seems to be responsible for the PV phenotype. However, the transcriptional changes triggered by the mutation have not yet been totally characterized. In this study, we performed a large scale gene expression study using serial analysis of gene expression (SAGE) in bone marrow cells of a newly diagnosed PV patient harboring the *JAK2* V617F mutation and in normal bone marrow cells from healthy donors. *JUNB* was one of the genes up-regulated in PV and we confirmed, by quantitative RT-PCR, an overexpression of *JUNB* in hematopoietic cells of other *JAK2* V617F PV patients. Using Ba/F3-EPOR cell lines and primary human erythroblast cultures, we found that *JUNB* was transcriptionally induced after EPO addition and that *JAK2* V617F constitutively induced JunB expression. Furthermore, *JUNB* knock-down reduced the clonogenic and proliferative potential of human erythroid progenitors. Moreover, in PV the erythropoiesis driven by *JAK2* V617F was more sensitive to JunB downregulation than normal erythropoiesis. These results establish a role for JunB in normal erythropoiesis and indicate that JunB may play a major role in the development of *JAK2* V617F myeloproliferative disorders.

Introduction

A unique, somatic mutation was recently described in patients with classical, BCR/ABL-negative, myeloproliferative disorders (MPDs): polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and idiopathic myelofibrosis (IMF)¹⁻⁶. *In vitro* studies have demonstrated that the *JAK2* V617F mutation leads to *JAK2* autophosphorylation and constitutive activation of the downstream pathways *JAK2*-STAT5, PI3K and MAPK/ERK^{1,3,4}. In addition, the mutation induces cytokine hypersensitivity or growth factor independence in Ba/F3 cells^{1,4,7}. Consistent with these findings are previous reports of deregulated signaling molecules in patients with MPD, including Bcl-xL⁸, phospho STAT3⁹ and phospho AKT¹⁰, the hyper-responsiveness of hematopoietic progenitors to growth factors¹¹⁻¹⁵ and the formation of endogenous erythroid colonies (EECs)¹¹.

However, the actual molecular mechanisms, triggered by *JAK2* V617F, that permit erythroid autonomous survival and proliferation remain incompletely understood. An interplay may exist between cell cycle regulation and apoptosis, and these processes are currently being investigated. The overexpression of Bcl-xl, an inhibitor of apoptosis, correlates with *in vitro* survival of PV erythroblasts in the absence of EPO⁸ and a sustained level of this protein alone is sufficient to induce EEC formation¹⁶. Moreover, *JAK2*-mutated erythroblasts display increased expression of c-FLIP_{short} and resistance to death-receptor induced apoptosis¹⁷. With regard to cell cycle, *JAK2* V617F promotes G1/S phase transition of Ba/F3-EPOR cells, through p27 down regulation and increased expression of cyclin D2¹⁸. Gene expression profiles of Ba/F3 cells transfected with mutated kinases, including *JAK2* V617F, also show induced expression of G1 activators, such as cyclin D2 and Cdc25a¹⁹.

Both apoptosis and the cell cycle are processes regulated by the transcription factor activator protein 1 (AP-1)^{20,21}. AP-1 activity is modulated by a wide range of extracellular stimuli, including growth factors and cytokines, through MAPK cascades (ERK, JNK and p38)^{22,23}, and the resulting transcription factor is composed by homo- or heterodimers of Jun, Fos and ATF proteins²².

The AP-1 protein JunB is encoded by an immediate response gene whose expression is rapidly stimulated by serum and hematopoietic growth factors²⁴⁻²⁹. Depending on the cellular background, both positive and negative roles have been described for *JUNB*

in cell proliferation and survival³⁰⁻³⁵. In turn, JunB can modulate cell cycle progression and apoptosis through the regulation of target molecules such as p16³⁶, p27²⁸, cyclin D1³⁷, cyclin A³⁸ and Bcl-xL³⁹.

In the present study, we observed an overexpression of *JUNB* mRNA in the bone marrow cells of a *JAK2* V617F-positive PV patient, by means of SAGE libraries. This prompted us to study *JUNB* expression in hematopoietic cells of several other PV patients and controls. We used the Ba/F3-EPOR cell line and primary human erythroid progenitors to investigate the relationship between *JUNB* expression and EPO signaling and its role in the erythropoiesis driven by *JAK2* V617F.

Patients, materials and methods

Patients

Peripheral blood or bone marrow samples were collected from PV and IMF patients. For PV, diagnoses were made according to international criteria^{40,41} and for IMF, the Italian criteria were used⁴². Only *JAK2* V617F-positive patients were studied, after analyzing the mutational status using either fluorescent competitive probes for quantitative real-time PCR with an ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA)^{43,44} or polymerase chain reaction (PCR) followed by *Bsa* XI digestion², as reported previously. Bone marrow samples were obtained by aspiration at the time of diagnoses, before patients had been medicated. Peripheral blood samples were obtained regardless of the time of diagnoses and treatment. As controls, bone marrow samples were collected from healthy donors and peripheral blood was collected from healthy donors or patients undergoing cytapheresis. The study was approved by the Local Research Ethics Committee of the Hôtel-Dieu and the Henri Mondor hospitals (France) and the Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Brazil). Informed consent was obtained from each patient, in accordance with the Declaration of Helsinki (Paris, France).

Hematopoietic cell preparation

After red blood cell lysis, the bulk of bone marrow cells was recovered by centrifugation. Similarly, total cells were obtained from peripheral blood samples.

Granulocytes and mononuclear cells were separated using a double gradient of HISTOPAQUE[®]-1119 and HISTOPAQUE[®]-1077 (Sigma-Aldrich, Steinheim), according to the manufacturer's recommendations.

Purification of CD34⁺ cells and *in vitro* amplification of erythroid progenitors

Mononuclear cells were obtained over a Ficoll density gradient and CD34⁺ cells were purified by a double-positive magnetic cell sorting system (AutoMACS, Miltenyi Biotec, Paris, France), according to the manufacturer's recommendations. CD34⁺ cells were cultured in Iscove's Modified Dulbecco Medium (IMDM) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) with penicillin/streptomycin/glutamine (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), alpha-thioglycerol (Sigma), bovine serum albumin (BSA) (Sigma), a mixture of sonicated lipids (Sigma) and iron-saturated human transferrin (Sigma), in the presence of 50ng/mL recombinant human stem cell factor (SCF) (Amgen, Thousand Oaks, CA), 50U/mL interleukin 3 (IL3) (Novartis, Basel, Switzerland) and 1U/mL erythropoietin (EPO) (Orthobiotech, Paris, France), as previously described⁴⁵. Cells were maintained at a density of 1-2×10⁵ cells/mL, at 37°C, in 5% CO₂ and were supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Stem Cell Technologies, Meylan, France) until day 7 and 30% FCS from day 7 to day 13. Erythroid cells were analyzed by cytometry (FACSort, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), using anti-CD36 and anti-Gpa antibodies (Becton Dickinson), and by cytospin, after May-Grunwald-Giemsa coloration.

Cell lines

Parental, *JAK2* WT-, or *JAK2* V617F-, expressing Ba/F3-EPOR cells¹ were cultured in RPMI medium (Invitrogen) complemented with 10% FCS (Stem Cell Technologies) and in the presence of 1U/mL EPO (Orthobiotech).

Kinetics of erythropoietin stimulation

Parental, *JAK2* WT-, or *JAK2* V617F-, expressing Ba/F3-EPOR cells and patient-derived erythroid progenitors were washed three times and submitted to EPO withdrawal in fresh medium without cytokine or serum for 6h (Ba/F3-EPOR cells) or 4h

(erythroid cells). Cells were then re-stimulated with 10U/mL EPO (Orthobiotech) for 5min, 15min, 30min, 1h, 3h or 6h (Ba/F3-EPOR cells) or 3h (erythroid cells).

Biochemical inhibitors

JAK2 V617F-expressing Ba/F3-EPOR cells were maintained in RPMI medium (Invitrogen) without cytokine or serum for 6 hours, in the presence of: 0, 10, 25, 50, 75 or 100 μ M AG490 (JAK2 inhibitor), 0, 5, 10 or 25 μ M LY294002 (PI3K inhibitor) or 0, 5 or 10 μ M PD98059 (MEK inhibitor) (all from VWR, Fontenay-sous-bois, France).

shRNA constructs, lentivirus production and cell infection

In order to down modulate *JUNB* expression, lentivirus-mediated short hairpins RNAs were used, as previously described⁴⁶. Short hairpin (sh) *JUNB* oligonucleotides were synthesized (Eurogentec, Belgium), hybridized and inserted into a pBlue Script containing the human H1 promoter. The H1-sh*JUNB* or H1-SCR (scramble sequence, used as a control) unit was inserted into a HIV-derived lentiviral vector (pRRL sin PGK eGFP WPRE; Généthon, Evry, France). Lentivirus particles were produced by transfection of 293T cells with 3 different plasmids: pCMV (packaging plasmid), pMD2G (coding for the VSV-G protein envelope) and pRRL, containing either the sh*JUNB* or the SCR sequence, in the presence of lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Viral stocks were stored at -80°C.

Day 4 erythroid progenitors, cultured as described above, were incubated with the viral supernatant for 24 h. On day 5, GFP⁺/CD34⁺/CD36⁺ and GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻ cells were sorted after immunostaining with specific antibodies (Immunotech, Marseille-Lumigny, France) with a cell sorter (FACSDiva, Becton Dickinson). Cells were then used in proliferation and CFU-E assays.

Proliferation assay

GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻ cells (18 000) were cultured for 9 days employing the erythroid proliferation liquid system described above. Cells were counted at days 2, 5, 7 and 9, after Trypan blue exclusion.

Erythroid progenitor assay

For colony assays, 1 000 GFP⁺/CD34⁺/CD36⁺ or 1 000 GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻ cells were plated in duplicate in semisolid methylcellulose H4100 Medium (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) supplemented with 10% FCS (Stem Cell Technologies), 25ng/mL SCF (Amgen) and 3U/mL EPO (Orthobiotech), as described¹⁶. Additionally, for *JAK2* V617F-positive patients, 5 000 GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻ cells were plated in methylcellulose in the absence of EPO. Colony numbers were recorded at day 14.

Erythroid colony genotyping and *JAK2* V617F quantification

Erythroid colonies were plucked from methylcellulose, lysed and the mutational status was analyzed, as described for the patients. We determined the *JAK2* V617F / total *JAK2* ratio by the delta Ct procedure, as described⁴⁴. Standard curves were obtained by diluting mutant DNA from biallelic, 100% homozygous DNA in wild-type diploid DNA.

SAGE libraries and data analysis

Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen), and treated with DNaseI (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. To produce the PV library (SAGE PV), 8µg of total RNA were used, obtained from bone marrow cells of a single *JAK2* V617F-positive PV patient, at the time of diagnosis. The control library (SAGE CT) was generated from 15µg of a pool of RNA, obtained from bone marrow cells of five donors (3µg of RNA from each donor were combined). Libraries were constructed using the I-SAGE kit (Invitrogen) with the *Nla* III enzyme, as described by the manufacturer. Sequencing was carried out using the Dynamic ET Terminator cycle sequencing kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and a MEGA-BACE automated DNA sequencer (Amersham Pharmacia, Bucks, UK). Vector sequences were trimmed using the *Phred/Phrap* software. Automatic tag detection was performed with the *eSAGE* software v1.2⁴⁷. The PV library (SAGE PV) was compared to the control library (SAGE CT) produced in this study, but also to the normal bone marrow library, available at the NCBI SAGE website. Only tags presenting $p < 0.05$ ⁴⁸ and fold ≥ 5 in the two comparisons were considered to be differently expressed. The data bank "Best Gene for a tag", from SAGEGenie, CGAP (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>) was downloaded on April 2007 and

used for tag-to-gene mapping. According to the identification, tags were further classified as “no match” (no correspondence found in the data bank), “known genes” or “putative genes/proteins”, including ESTs (Expressed Sequence Tags), ORFs (Open Reading Frames), cDNA clones and hypothetical proteins. Functional classification of transcripts was performed according to the Gene Ontology Consortium criteria (<http://www.geneontology.org>).

Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen) and treated with DNase I (Invitrogen or Ambion, Cliniscience, Montrouge, France). Samples were subjected to reverse transcription using SuperScript II or SuperScript III (Invitrogen). qRT-PCRs were performed in duplicate, using 12.5µl of SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 25ng of cDNA and ideal quantities of each primer (Table S1) in a final volume of 25µl. This concentration was determined for each pair of primers and the amplification efficiency was calculated according to the equation $E=10^{(-1/slope)}$ (Table S1)⁴⁹. To validate SAGE profiles, *BAC*, *GAPDH* and *BCR* were used as reference genes. To analyze *JUNB* expression in hematopoietic cells, *BAC* and *GAPDH* were used as reference genes. Gene expression was normalized by geometric averaging of multiple controls, using the Program geNorm, version 3.4⁵⁰. For Ba/F3-EPOR cell lines, fold increase was calculated by the conventional $\Delta\Delta C_t$ method, using *GAPDH* as a reference gene and time 0 of each kinetic as the calibrator. Amplification specificity was verified by running a dissociation protocol. As the *JUNB* gene has only one exon, a control reverse transcription (no enzyme) was made for each Ba/F3-EPOR sample and qRT-PCR was performed in order to estimate DNA contamination. In all cases, no or low (amplification after cycle 35) contamination was detected.

Western blotting

Western blotting was performed using anti-JunB (C-11): sc-8051 (Santa Cruz, TEBU, Le Perray en Yvelines, France), anti-phospho STAT5, anti-STAT5, anti-phospho thr 308 AKT, anti-AKT, anti-phospho ERK p42-p44, anti-ERK p42-p44 and anti-Bcl-xL (Cell Signaling, Saint Quentin en Yvelines, France) and anti- β -actin (Sigma) antibodies,

according to conventional techniques. Western blot detection was performed using Enhanced Chemiluminescent (ECL) or SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity substrates (Pierce, Montluçon, France), following the manufacturer's recommendations. Quantifications for Western blotting were performed using the Image J software.

Statistical analysis

Gene expressions in the SAGE samples were presented as mean \pm SEM. Mann-Whitney test was applied to analyze differences in *JUNB* gene expression between groups of PV patients and controls. $p < 0.05$ was considered significant. ShRNA results are presented as mean \pm SD.

Results

Gene expression profiles of normal and PV bone marrow cells

We performed a large scale gene expression study in normal and PV bone marrow cells, using Serial Analysis of Gene Expression (SAGE). A total of 68 584 tags for the SAGE PV profile and 58 401 tags for the SAGE CT profile were sequenced, representing 21 042 and 18 926 unique tags, respectively (Table 1). The full tables of tags are available to download on the site <http://www.hemocentro.unicamp.br/submission>.

Identification of the tags in the SAGE PV and SAGE CT libraries demonstrated that 30-31% had no correspondence in the data bank (no matches), 18% of the tags corresponded to predicted or annotated sequences and 52-53% corresponded to known genes, representing 7 586 and 7 275 different transcripts (non-redundant), respectively, in the PV and in the control profile (Table 1). To investigate the reliability of the profiles designed by SAGE, we arbitrarily selected 11 genes to be studied by qRT-PCR in the same PV sample used to generate the library and in three of the five control samples. Both techniques were consistent in identifying higher expression of *HBA*, *HBB*, *C3orf10*, *PRDX6*, *GPR137B*, *JUNB*, *ZFP36*, *BTG2* and *EGR1* in PV, and *CIQB* and *AHSP* in the normal samples (Figure 1). We identified 70 tags (60 different transcripts) that were down regulated in PV bone marrow cells, while 136 tags (104 different transcripts) were overexpressed (Table 2). Genes up regulated in PV were associated with many biological

processes known to be altered in the disease (Table S2), such as signal transduction, cell cycle, apoptosis and regulation of transcription.

***JUNB* expression in hematopoietic cells**

One of the genes implicated in the regulation of transcription was *JUNB*, which codes for a member of the AP-1 transcription complex. Since it has been reported that JAK2 activation may contribute to *JUNB* induction⁵¹, the pattern of *JUNB* expression in hematopoietic cells was investigated in other *JAK2* V617F-positive PV patients (Figure 2). We found an overexpression of *JUNB* mRNA in bone marrow cells of two newly-diagnosed PV patients. In addition, PV peripheral blood leukocytes displayed higher *JUNB* mRNA levels than normal leukocytes (6 PV patients and 6 healthy donors, Mann-Whitney, $p = 0.0022$). *JUNB* expression was shown to be 4-fold greater in PV mononuclear cells than normal counterparts (13 PV patients and 14 controls (Mann-Whitney, $p = 0.0033$). However, surprisingly, no significant differences were found for granulocytes between control and *JAK2*V617F positive samples (14 PV patients and 14 controls, Mann-Whitney, $p = 0.1636$).

***JAK2* V617F-expressing Ba/F3-EPOR cells demonstrate constitutive expression of JunB**

The differences observed between *JAK2* V617F-positive PV patients and controls suggest that *JUNB* expression may depend upon *JAK2* status. To test this hypothesis, we used parental, *JAK2* WT-, and *JAK2* V617F-expressing Ba/F3-EPOR cells. Under normal conditions of culture (10% FCS, 1U/mL EPO), *JAK2* V617F-expressing Ba/F3-EPOR cells showed greater JunB protein expression than parental or *JAK2* WT-expressing cells, as detected by Western Blot. After six hours of cytokine and serum deprivation, JunB expression decreased in both parental and *JAK2* WT-expressing cells, while in *JAK2*-mutated cells it remained detectable (Figure 3A). Similarly, we observed that, in steady state or in deprivation, *JUNB* mRNA levels were greater in *JAK2* V617F-expressing cells than in parental or *JAK2* WT-expressing Ba/F3-EPOR cells (Figure 3B).

We next tested the kinetics of *JUNB* mRNA induction by EPO in these three cell lines. *JUNB* mRNA was studied by SYBR quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), using *GAPDH* as a reference gene (Figure 4A). After six hours of deprivation, the level of JunB mRNA was 2-fold higher in the *JAK2* V617F Ba/F3-EPOR, in comparison with the two other cell lines. Cells were then re-stimulated with 10U/mL EPO; however no marked differences were observed between the three cell lines in the kinetics of response to EPO. *JUNB* mRNA levels increased soon after re-stimulation, reaching a maximum at 30 min after EPO addition and remaining in plateau for 3 h (Figure 4A). In contrast to mRNA expression, changes in JunB protein levels, due to EPO addition, were found to be markedly different among the cell lines. Parental and *JAK2* WT-Ba/F3-EPOR cells showed an increase in JunB expression, due to EPO treatment, with greatest protein levels achieved three hours after EPO re-stimulation (Figure 4B-C). At this point, JunB was two-fold higher than before stimulation in both cell lines (Figure 4C). *JAK2*-mutated cells, however, displayed almost no increase in protein levels after stimulus (Figure 4B-C), since JunB expression in deprivation (time 0) was already high (Figures 3A and 4B). STAT5 phosphorylation was accessed as a control, since this molecule is highly activated by EPO addition. Parental and *JAK2* WT Ba/F3-EPOR cells had no constitutive STAT5 phosphorylation, in contrast to *JAK2* V617F Ba/F3-EPOR cells (Figure 4B). In the three cell lines, EPO induced or increased STAT5 phosphorylation. These results imply that *JAK2* V617F-expressing Ba/F3-EPOR cells constitutively express JunB.

JunB is constitutively expressed in erythroid precursors of *JAK2* V617F-positive patients

Given the results that *JAK2* V617F induces JunB constitutive expression in Ba/F3-EPOR cells, we hypothesized that erythroid progenitors of *JAK2* V617F-positive patients displayed the same signaling abnormalities. Erythroid cells were cultured for 7 or 10 days in a liquid culture system (Figure 5A-B) and JunB protein expression was analyzed in steady state (10% FCS, 50ng/mL SCF, 1U/mL IL3, 1U/mL EPO), four hours after deprivation (no FCS, no cytokine) and three hours after EPO re-stimulation (10U/mL) (Figure 5C). STAT5 phosphorylation was assessed to verify the efficiency of EPO re-stimulation. Three controls and four patients were analyzed for JunB expression (three

PV patients, one IMF patient). Erythroid progenitors, derived from controls, showed a decrease in JunB protein levels due to EPO withdrawal, whereas cells from the *JAK2* V617F-positive patients maintained JunB protein expression levels even in deprivation (Figure 5C). As observed for *JAK2* V617F Ba/F3-EPOR cells (Figure 4C), cells derived from patients displayed constitutive STAT5 phosphorylation and JunB expression (Figure 5C).

JunB expression is dependent on *JAK2* V617F and on the PI3K and ERK pathways in *JAK2* V617F-expressing Ba/F3-EPOR cells

To further investigate the relationship between JunB expression and the mutation, *JAK2* V617F Ba/F3-EPOR cells under EPO deprivation were studied. Cells were incubated for six hours in deprivation, with a JAK2 inhibitor (AG490) at increasing concentrations (0, 10, 25, 50, 75 or 100 μ M). STAT5 phosphorylation status was accessed as a surrogate marker for JAK2 inhibition. An inverse correlation between the concentration of AG490 and JunB protein expression was observed (Figure 6A). At the concentration of 25 μ M AG490, nearly 50% of basal JunB levels were observed (Figure 6B). Therefore, JunB expression seems to depend on JAK2 V617F kinase activity.

Two major pathways, triggered by JAK2 activation and shown to be constitutively active in mutated cells, are the PI3K/AKT and the MEK/ERK pathways¹. We then investigated whether these pathways are involved in JunB expression. *JAK2* V617F Ba/F3-EPOR cells were incubated for six hours in deprivation, with increasing concentrations of LY294002, a PI3K inhibitor, or PD98059, a MEK inhibitor. The phosphorylation statuses of AKT and ERK were accessed as controls, respectively. As observed for AG490, increasing concentrations of LY294002 or PD98059 lowered JunB protein levels (Figure 6C-D). Thus, both pathways seem to contribute to JunB expression in *JAK2*-mutated cells.

JunB knock-down diminishes proliferation and the clonogenic potential of human erythroid progenitors

In order to estimate the role of JunB in erythropoiesis, day 4 erythroid precursors were infected with a lentivirus vector containing shRNA targeted on *JUNB*.

GFP⁺/CD34⁺/CD36⁺ and GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻ cells were then sorted after immunostaining on day 5 and were analyzed with regard to their proliferation and clonogenic potentials. JunB knock-down was confirmed by Western blotting, showing about 11% and 61% JunB protein inhibition with the sh*JUNB2* and sh*JUNB3*, respectively, compared to shSCR (Figure 7A).

In the proliferation assay, equal numbers of sh*JUNB*- or SCR- GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻ cells were cultured in the erythroid liquid system described. After nine days, the sh*JUNB3* elicited a much lower amplification than the shSCR, whereas the sh*JUNB2* had no significant effect in controls from a normal donor (Figure 7B). In contrast, both shRNAs inhibited erythroid proliferation from two *JAK2* V617F-positive patients analyzed (one PV patient, one IMF patient) (Figure 7B). This result suggests that *JAK2* V617F erythropoiesis is more sensitive to JunB downregulation than normal erythropoiesis.

Erythroid colony formation was studied by plating either GFP⁺/CD34⁺/CD36⁺ or GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻ cells in methylcellulose, in the presence of EPO. The sh*JUNB3* inhibited the growth of erythroid colonies at day 14 both for controls and patients (Figure 7C). The sh*JUNB2* only inhibited erythroid colony formation in two of three patients, but had no effect on control cells. The *JAK2* status of colonies was also investigated in one patient. Downregulation of JunB by sh*JUNB3* had a marked effect on *JAK2* V617F homozygous progenitors and led to a marked increase in *JAK2* WT colonies, in comparison with the status of colonies infected with shSCR (Figure 7D). In order to confirm this result, we studied the effect of sh*JUNB3* on endogenous erythroid colonies (EEC) formation, which mainly arises from homozygous *JAK2* V617F erythroid progenitors. GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻ cells from three *JAK2* V617F-positive patients were plated in methylcellulose, in the absence of EPO and the sh*JUNB3* elicited a significant reduction in EEC formation (Figure 7E).

Taken together, these results suggest a major role for JunB in normal erythropoiesis and an even more significant role in *JAK2* V617F-driven erythropoiesis.

JunB regulates Bcl-xL during erythropoiesis

Since previous data have shown that the silencing of Bcl-xL and STAT5 inhibits EPO-independent terminal differentiation of PV cells¹⁶, we investigated whether *JUNB* could regulate Bcl-xL. To this end, day 4 erythroid precursors from a PV patient were infected with a lentivirus vector containing shRNA, targeted on *JUNB* or SCR, and Bcl-xL protein levels were analyzed at day 10. JunB knock-down, either with the sh*JUNB2* or sh*JUNB3*, induced a decrease in Bcl-xL (Figure 7F). This result suggests that *JUNB* could be responsible for Bcl-xL levels in the erythropoiesis.

Discussion

In the present study, we performed a serial analysis of gene expression in normal and *JAK2* V617F-positive bone marrow cells and identified overexpression of *EGR1* and *JUNB* in PV. *EGR1* is important for macrophage lineage differentiation⁵² and previous reports suggest that *EGR1* promotes macrophage differentiation at the expense of erythroid and granulocytic differentiation⁵³. The mechanisms and the consequences of this overexpression require further investigation in future works. In this study, we focused on *JUNB* and were able to confirm this overexpression in two other newly-diagnosed *JAK2* V617F-positive PV patients. *JUNB* up-regulation was also observed in total peripheral blood leukocytes and mononuclear cells of mutated PV patients, compared to controls. These results suggested that *JUNB* expression could be related to the *JAK2* genotype. However, no significant differences in *JUNB* levels were recorded between normal and PV mature granulocytes, although they derive from the mutated clone in PV. It may be speculated that variations in *JUNB* expression in the hematopoietic lineages may depend on the cellular background. In cell lines, it has been shown that JunB expression is induced by G-CSF. However, this may be different in granulocytes; indeed, it has been suggested that *JUNB* function may depend not only on spatial and temporal regulation of its own expression, but also on the relative expression levels of other AP-1 proteins, notably *JUN*³¹.

We also showed that EPO is able to stimulate an increase in *JUNB* mRNA and JunB protein levels in parental EPO-responsive Ba/F3 cells. This is in agreement with previous reports that have shown that EPO induced a transient increase in JunB message in

primary murine erythroid progenitors infected with the anemia-inducing strain of the Friend spleen focus-forming virus (FVA cells) and the erythroid cell line, HCD-57^{28,54}.

In addition, we found that *JAK2* V617F Ba/F3-EPOR cells, as well as erythroid cells of *JAK2* V617F-positive PV and IMF patients, display EPO-independent JunB expression. These results are in line with the EPO-independent *JUNB* expression in HCD-57 cells infected with the Friend spleen focus-forming virus (SFFV)⁵⁴, which induces erythroid cell growth in the absence of EPO⁵⁵, similarly to the *JAK2* mutation. In the *JAK2* V617F Ba/F3-EPOR cell line, EPO induced a 4-fold increase in *JUNB* transcript, in comparison with the basal level which was already high, but did not significantly modify the level of the JunB protein, suggesting a post transcriptional regulation.

Taken together, these observations suggest, for the first time, that JunB is regulated by *JAK2* V617F. This was confirmed by the decrease in JunB expression after treatment of *JAK2* V617F Ba/F3-EPOR with increasing concentrations of a *JAK2* inhibitor. Using inhibitors (LY294002 and PD98059), we were also able to demonstrate that JunB constitutive expression in *JAK2* V617F cells was dependent on the PI3K and MAPK pathways. This is in agreement with the results obtained with another constitutively active kinase, NPM-ALK, which increases JunB mRNA and protein levels, through activation of ERK and PI3K³⁰. More specifically, NPM-ALK-positive cells treated with an ERK inhibitor presented lower *JUNB* mRNA levels, while mTOR, a target of the PI3K pathway, was shown to regulate JunB translation³⁰.

Given these results, we next addressed the role of *JUNB* in the erythropoiesis. With regard to the functions of *JUNB* in hematopoiesis, it has been shown that this transcription factor plays a key role in the early steps of the myelopoiesis, since JunB deficiency leads to a transplantable myeloproliferative disorder, by expanding the numbers of LT-HSC and granulocyte/macrophage progenitors⁵⁶. In order to more precisely understand the role of JunB in erythropoiesis, we used a knock down strategy using shRNAs. The level of JunB protein was efficiently decreased in human erythroid progenitors cultivated for 4 days. *JUNB* down-modulation caused a decrease in the proliferation and clonogenic potential of erythroid precursors, suggesting a proliferative role for JunB in the erythropoiesis. Thus, this result markedly differs from a previous report suggesting that JunB was responsible for the apoptosis induced by EPO withdrawal and

that, in contrast, c-Jun was involved in the EPO-induced proliferation of the erythroid cell line, HCD57³⁹. However, the opposing role of these two jun proteins was hypothesized only for their expression during EPO stimulation, but not for their precise function. *JAK2* V617F erythropoiesis was highly sensitive to the downregulation of JunB; indeed, a moderate inhibition of JunB of around 11% with a shRNA was sufficient to partially inhibit erythroid differentiation from PV samples. In addition, EEC from PV patients was nearly completely blocked by a 61% JunB knock down and when the genotypes of the EPO-stimulated erythroid colonies were studied after JunB inhibition, a marked enrichment in *JAK2* WT colonies was observed. This may imply that activation of JunB is an important molecular mechanism for *JAK2* V617F-driven erythropoiesis. Previous data have shown that *JAK2* inhibitors, as well as the silencing of Bcl-xL and STAT5, inhibit EPO-independent terminal differentiation of PV cells¹⁶. In our study, we observed that *JUNB* expression is required for Bcl-xL expression in patients' cells. Since Bcl-xL expression is essential to the survival of erythroid progenitors⁵⁷, this result indicates that JunB has an antiapoptotic role in mutated cells. This is in contrast with the proapoptotic role attributed to JunB in HCD57 cells in EPO withdrawal. These opposing functions of JunB may be due to the different composition of the AP-1 complex or different expression levels of other Jun proteins.

Taken together these results highlight the totally opposite effects of one key molecule at different stages of hematopoiesis. JunB deficiency in hematopoietic stem cells induces a myeloproliferative disorder resembling CML, by expanding the numbers of hematopoietic stem cells and inducing the proliferation of granulocytic precursors. In contrast, JunB knock down in granulo-monocytic progenitors and precursors has only a minimum effect on their proliferation. In contrast, in erythropoiesis, JunB is an important molecule downstream of the EPO-R and, *in vitro*, appears indispensable for *JAK2* V617F-driven erythropoiesis. Future investigations of JunB in *JAK2* V617F MPDs should permit the determination of its precise role in their pathogenesis and to determine whether JunB induces proliferation of the erythroid lineage, but limits hematopoietic stem cell expansion and granulo-monocytic proliferation, thus explaining the phenotypes of these chronic disorders.

In summary, this study establishes a key role for JunB downstream of EPO-R and JAK2 during normal and PV erythropoiesis and suggests that JunB effectors in erythropoiesis could be target molecules for future therapies.

Acknowledgments

We are grateful to Frédéric Larbret and Yann Lécluse for cell sorting experiments, to Oriane Wagner-Ballon for photographing erythroid cells, to Stéphane Constantinescu for carefully reviewing the manuscript and Nicola Conran, for english revision. We also thank all the patients and the controls that participated in the study.

Authorship

Contribution: Monte-Mór, BCR designed the study, performed and processed the experiments and wrote the first draft of the manuscript. Plo, I performed and assisted Monte-Mór, BCR in all the experiments and revised the manuscript. Cunha, AF performed and assisted Monte-Mór, BCR in SAGE experiments. Costa, GGL performed and assisted Monte-Mór, BCR in bioinformatics analysis. Albuquerque, DM assisted Monte-Mór, BCR in primer design and qRT-PCRs in human samples. Badaoui, S performed erythroid cultures. Lorand-Metze, I, Pagnano, KBB, and Saad, STO contributed vital samples and clinical data of the Brazilian PV patients. Costa, FF and Vainchenker, W designed the study, supervised the work and were responsible for the final draft of the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no potential conflict of interest.

Correspondence: Fernando Ferreira Costa, Hemocentro, Unicamp, Rua Carlos Chagas, 480, 13083-970, Cidade Universitária, Barão Geraldo, Campinas, SP, Brazil; e-mail: ferreira@unicamp.br; William Vainchenker, INSERM U790, Institut Gustave Roussy, 39 Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France; e-mail: verpre@igr.fr.

Support

This work was supported by CAPES, FAPESP, FRM (IP), La Ligue Nationale Contre le Cancer équipe labellisée 2007, INCa (projets libres 2006) and the INSERM. IP was funded by the Fondation de la Recherche Médicale.

References

1. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434:1144-1148.
2. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365:1054-1061.
3. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352:1779-1790.
4. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7:387-397.
5. Zhao R, Xing S, Li Z, et al. Identification of an Acquired JAK2 Mutation in Polycythemia Vera. *J Biol Chem*. 2005;280:22788-22792.
6. Jones AV, Kreil S, Zoi K, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005;106:2162-2168.
7. Lu X, Levine R, Tong W, et al. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:18962-18967.
8. Silva M, Richard C, Benito A, et al. Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med*. 1998;338:564-571.
9. Roder S, Steimle C, Meinhardt G, Pahl HL. STAT3 is constitutively active in some patients with Polycythemia rubra vera. *Exp Hematol*. 2001;29:694-702.
10. Dai C, Chung IJ, Krantz SB. Increased erythropoiesis in polycythemia vera is associated with increased erythroid progenitor proliferation and increased phosphorylation of Akt/PKB. *Exp Hematol*. 2005;33:152-158.
11. Prchal JF, Axelrad AA. Letter: Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N Engl J Med*. 1974;290:1382.
12. Dai CH, Krantz SB, Dessypris EN, et al. Polycythemia vera. II. Hypersensitivity of bone marrow erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocyte progenitor cells to interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1992;80:891-899.
13. Correa PN, Eskinazi D, Axelrad AA. Circulating erythroid progenitors in polycythemia vera are hypersensitive to insulin-like growth factor-1 in vitro: studies in an improved serum-free medium. *Blood*. 1994;83:99-112.

14. Dai CH, Krantz SB, Green WF, Gilbert HS. Polycythaemia vera. III. Burst-forming units-erythroid (BFU-E) response to stem cell factor and c-kit receptor expression. *Br J Haematol.* 1994;86:12-21.
15. Axelrad AA, Eskinazi D, Correa PN, Amato D. Hypersensitivity of circulating progenitor cells to megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu MGDF) in essential thrombocythemia. *Blood.* 2000;96:3310-3321.
16. Garcon L, Rivat C, James C, et al. Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. *Blood.* 2006;108:1551-1554.
17. Zeuner A, Pedini F, Signore M, et al. Increased death receptor resistance and FLIPshort expression in polycythemia vera erythroid precursor cells. *Blood.* 2006;107:3495-3502.
18. Walz C, Crowley BJ, Hudon HE, et al. Activated Jak2 with the V617F point mutation promotes G1/S phase transition. *J Biol Chem.* 2006;281:18177-18183.
19. Lelievre H, Cervera N, Finetti P, et al. Oncogenic kinases of myeloproliferative disorders induce both protein synthesis and G1 activators. *Leukemia.* 2006;20:1885-1888.
20. Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene.* 2001;20:2390-2400.
21. Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol.* 2002;4:E131-136.
22. Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9:240-246.
23. Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 1995;270:16483-16486.
24. Ryder K, Lau LF, Nathans D. A gene activated by growth factors is related to the oncogene v-jun. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:1487-1491.
25. Perez-Albuerne ED, Schatteman G, Sanders LK, Nathans D. Transcriptional regulatory elements downstream of the JunB gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:11960-11964.
26. Kang LY, Yang YC. Activation of junB and c-myc primary response genes by interleukin 9 in a human factor-dependent cell line. *J Cell Physiol.* 1995;163:623-630.
27. Adachi K, Saito H. Induction of junB expression, but not c-jun, by granulocyte colony-stimulating factor or macrophage colony-stimulating factor in the proliferative response of human myeloid leukemia cells. *J Clin Invest.* 1992;89:1657-1661.

28. Jacobs-Helber SM, Abutin RM, Tian C, et al. Role of JunB in erythroid differentiation. *J Biol Chem.* 2002;277:4859-4866.
29. Lord KA, Abdollahi A, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. Dissection of the immediate early response of myeloid leukemia cells to terminal differentiation and growth inhibitory stimuli. *Cell Growth Differ.* 1990;1:637-645.
30. Staber PB, Vesely P, Haq N, et al. The oncoprotein NPM-ALK of anaplastic large cell lymphoma induces JUNB transcription via ERK1/2 and JunB translation via mTOR signaling. *Blood.* 2007
31. Passegue E, Jochum W, Behrens A, Ricci R, Wagner EF. JunB can substitute for Jun in mouse development and cell proliferation. *Nat Genet.* 2002;30:158-166.
32. Passegue E, Jochum W, Schorpp-Kistner M, Mohle-Steinlein U, Wagner EF. Chronic myeloid leukemia with increased granulocyte progenitors in mice lacking junB expression in the myeloid lineage. *Cell.* 2001;104:21-32.
33. Kenner L, Hoebertz A, Beil T, et al. Mice lacking JunB are osteopenic due to cell-autonomous osteoblast and osteoclast defects. *J Cell Biol.* 2004;164:613-623.
34. Szabowski A, Maas-Szabowski N, Andrecht S, et al. c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell.* 2000;103:745-755.
35. Szremska AP, Kenner L, Weisz E, et al. JunB inhibits proliferation and transformation in B-lymphoid cells. *Blood.* 2003;102:4159-4165.
36. Passegue E, Wagner EF. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *Embo J.* 2000;19:2969-2979.
37. Bakiri L, Lallemand D, Bossy-Wetzel E, Yaniv M. Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *Embo J.* 2000;19:2056-2068.
38. Andrecht S, Kolbus A, Hartenstein B, Angel P, Schorpp-Kistner M. Cell cycle promoting activity of JunB through cyclin A activation. *J Biol Chem.* 2002;277:35961-35968.
39. Jacobs-Helber SM, Wickrema A, Birrer MJ, Sawyer ST. AP1 regulation of proliferation and initiation of apoptosis in erythropoietin-dependent erythroid cells. *Mol Cell Biol.* 1998;18:3699-3707.
40. Michiels JJ, Barbui T, Finazzi G, et al. Diagnosis and treatment of polycythemia vera and possible future study designs of the PVSG. *Leuk Lymphoma.* 2000;36:239-253.

41. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100:2292-2302.
42. Barosi G, Ambrosetti A, Finelli C, et al. The Italian Consensus Conference on Diagnostic Criteria for Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *Br J Haematol*. 1999;104:730-737.
43. James C, Delhommeau F, Marzac C, et al. Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. *Leukemia*. 2006;20:350-353.
44. Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, et al. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood*. 2006;107:4139-4141.
45. Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, et al. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2004;32:179-187.
46. Berthebaud M, Riviere C, Jarrier P, et al. RGS16 is a negative regulator of SDF-1-CXCR4 signaling in megakaryocytes. *Blood*. 2005;106:2962-2968.
47. Margulies EH, Innis JW. eSAGE: managing and analysing data generated with serial analysis of gene expression (SAGE). *Bioinformatics*. 2000;16:650-651.
48. Audic S, Claverie JM. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res*. 1997;7:986-995.
49. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:e45.
50. 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:RESEARCH0034.
51. Sakai I, Nabell L, Kraft AS. Signal transduction by a CD16/CD7/Jak2 fusion protein. *J Biol Chem*. 1995;270:18420-18427.
52. Nguyen HQ, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. The zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell*. 1993;72:197-209.
53. Krishnaraju K, Hoffman B, Liebermann DA. Early growth response gene 1 stimulates development of hematopoietic progenitor cells along the macrophage lineage at the expense of the granulocyte and erythroid lineages. *Blood*. 2001;97:1298-1305.

54. Muszynski KW, Ohashi T, Hanson C, Ruscetti SK. Both the polycythemia- and anemia-inducing strains of Friend spleen focus-forming virus induce constitutive activation of the Raf-1/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Virol.* 1998;72:919-925.
55. Ruscetti SK, Janesch NJ, Chakraborti A, Sawyer ST, Hankins WD. Friend spleen focus-forming virus induces factor independence in an erythropoietin-dependent erythroleukemia cell line. *J Virol.* 1990;64:1057-1062.
56. Passegue E, Wagner EF, Weissman IL. JunB deficiency leads to a myeloproliferative disorder arising from hematopoietic stem cells. *Cell.* 2004;119:431-443.
57. Silva M, Grillot D, Benito A, et al. Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood.* 1996;88:1576-1582.

Table S1: Sequences of primers utilized for qRT-PCR, concentration of use and amplification efficiency

Gene	Primers	Concentration of use, nM	Amplification efficiency, %
<i>BAC</i>	F – 5' AGGCCAACCGCGAGAAG 3' R – 5' ACAGCCTGGATAGCAACGTACA 3'	150	100
<i>BCR</i>	F – 5' CCTTCGACGTCAATAACAAGGAT 3' R – 5' CCTGCGATGGCGTTCAC 3'	150	100
<i>GAPDH</i>	F – 5' GCACCGTCAAGGCTGAGAAC 3' R – 5' CCACTTGATTTTGGAGGGATCT 3'	300	100
<i>EGR1</i>	F – 5' GAGCATGTGTCAGAGTGTTGTT 3' R – 5' CATGTGAGAGTACGGTCAAGC 3'	600	100
<i>CIQB</i>	F – 5' GGCAAGTTCACCTGCAAGGT 3' R – 5' CATGAGGTTACGCACAGGTT 3'	150	100
<i>PRDX6</i>	F – 5' ATTAGTGCCATGTGCCTTTC 3' R – 5' TCTCTTCTCTTCACATGGTGAC 3'	600	99
<i>GPR137B</i>	F – 5' CCCATAGGAATAAGCAATAATGTA 3' R – 5' AGCAAGGCTCCCTCTTTAGTAC 3'	600	100
<i>AHSP</i>	F – 5' TGATCC TCTCGTCTCTGAAGAAGAC 3' R – 5' GCTGCCTGTAATAGTTGATGTAGAAGTT 3'	900	100
<i>HBA</i>	F – 5' TGGTCCCCACAGACTCAGAGA 3' R – 5' CGGCCTTGACGTTGGTCTT 3'	150	100
<i>HBB</i>	F – 5' AGGCACCGAGCACTTTCTTG 3' R – 5' ATCTGTCCACTCCTGATCCAGTT 3'	600	100
<i>ZFP36</i>	F – 5' GCCGACACCCCTCATGG 3' R – 5' ACGTCAGGGCTCAGCGAC 3'	300	100
<i>BTG2</i>	F – 5' GAGCAGGCAGAGGCTTAAGGT 3' R – 5' GCCCTTGGACGGCTTTTC 3'	300	100
<i>C3orf10</i>	F – 5' GCCTGGGACTCTTTGTGAAGGTC 3' R – 5' CAGAAGCAGTGCAAAGGCAAT 3'	600	100
<i>JUNB</i>	F – 5' TGGAAAAGAAACACGCACTTAGTC 3' R – 5' AACAAACACACACAAACACAAACA 3'	600	100
Mouse <i>JUNB</i>	F – 5' ACTTTTCGGGTCAGGGATCAG 3' R – 5' GACGATCAAGCGCTCCAGTT 3'	400	97
Mouse <i>GAPDH</i>	F – 5' ACTGGCATGGCCTTCCG 3' R – 5' CAGGCGGCACGTCAGATC 3'	400	99

qRT-PCR: quantitative real-time polymerase chain reaction

Table 1: Identification of tags in polycythemia vera and control SAGE libraries

	SAGE PV	SAGE CT
Total Tags	68.584	58.401
Unique Tags	21.042	18.926
No matches (%)	6.476 (30.8%)	5.603 (29.6%)
ESTs, ORFs, cDNAs, mRNAs and hypothetical proteins (%)	3.699 (17.6%)	3.371 (17.8%)
Known genes (%)	10.867 (51.6%)	9.952 (52.6%)
Different transcripts	7.586	7.275

SAGE: serial analysis of gene expression; PV: polycythemia vera; CT: control; EST: expressed sequence tag; ORF: open reading frame; cDNA: complementary DNA; mRNA: messenger RNA

Table 2: Identification of tags that were differently expressed in polycythemia vera and normal bone marrow cells

	Up regulated in PV	Down regulated in PV
Unique Tags	136	70
No matches (%)	14 (10.3%)	4 (5.7%)
ESTs, ORFs, cDNAs, mRNAs and hypothetical proteins (%)	15 (11.0%)	5 (7.1%)
Known genes (%)	107 (78.7%)	61 (87.1%)
Different transcripts	104	60

PV: polycythemia vera; EST: expressed sequence tag; ORF: open reading frame; cDNA: complementary DNA; mRNA: messenger RNA

Table S2: Biological processes attributed to the genes upregulated in polycythemia vera

Biological process	Symbol	Gene
Signal transduction	ARHGAP26	Rho GTPase activating protein 26
	CD69	CD69 molecule
	CDC42SE1	CDC42 small effector 1
	CSF2RB	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)
	CSK	c-src tyrosine kinase
	ECGF1	endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)
	FGR	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog
	FPRL1	formyl peptide receptor-like 1
	FYB	FYN binding protein (FYB-120/130)
	GPR109A	G protein-coupled receptor 109A
	GPR97	G protein-coupled receptor 97
	HCK	hemopoietic cell kinase
	HMHA1	histocompatibility (minor) HA-1
	IL1B	interleukin 1, beta
	IL4R	interleukin 4 receptor
	IL8RA	interleukin 8 receptor, alpha
	IL8RB	interleukin 8 receptor, beta
	IMPA2	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2
	ITGA2B	integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41)
	ITGAX	integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)
	LITAF	lipopolysaccharide-induced TNF factor
	MAP2K6	mitogen-activated protein kinase kinase 6
	MICAL1	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 1
	PF4	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)
	PILRA	paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha
	PROK2	prokineticin 2
	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
	RASGRP4	RAS guanyl releasing protein 4
	RGS2	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa
	TAGAP	T-cell activation GTPase activating protein
	TLE3	transducin-like enhancer of split 3 (E(sp1) homolog, Drosophila)
	TLR1	toll-like receptor 1
	Cell surface receptor linked signal transduction	CD69
CSF2RB		colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)
ECGF1		endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)
FPRL1		formyl peptide receptor-like 1

	GPR109A	G protein-coupled receptor 109A
	GPR97	G protein-coupled receptor 97
	IL8RA	interleukin 8 receptor, alpha
	IL8RB	interleukin 8 receptor, beta
	ITGA2B	integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41)
	ITGAX	integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)
	PF4	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)
	PILRA	paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha
	PROK2	prokineticin 2
	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
	RASGRP4	RAS guanyl releasing protein 4
	RGS2	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa
	TLE3	transducin-like enhancer of split 3 (E(sp1) homolog, Drosophila)
Intracellular signaling cascade	CSK	c-src tyrosine kinase
	FGR	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog
	FYB	FYN binding protein (FYB-120/130)
	HCK	hemopoietic cell kinase
	HMHA1	histocompatibility (minor) HA-1
	IL8RB	interleukin 8 receptor, beta
	LITAF	lipopolysaccharide-induced TNF factor
	PROK2	prokineticin 2
	RASGRP4	RAS guanyl releasing protein 4
	TLR1	toll-like receptor 1
Regulation of signal transduction	LITAF	lipopolysaccharide-induced TNF factor
	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
	RASGRP4	RAS guanyl releasing protein 4
	RGS2	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa
Cell differentiation	ECGF1	endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)
	MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
	PF4	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)
	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
	RASGRP4	RAS guanyl releasing protein 4
	SEMA4A	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4A
	TNFAIP2	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2
Cell proliferation	BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)
	BTG2	BTG family, member 2
	IL1B	interleukin 1, beta
	IL8RB	interleukin 8 receptor, beta

	PROK2	prokineticin 2
	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
	RASGRP4	RAS guanyl releasing protein 4
	WARS	tryptophanyl-tRNA synthetase
Cell cycle	CSK	c-src tyrosine kinase
	DUSP1	dual specificity phosphatase 1
	IL1B	interleukin 1, beta
	MAP2K6	mitogen-activated protein kinase kinase 6
	PPP1R15A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A
	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
	RGS2	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa
Apoptosis	CASP4	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase
	IL1B	interleukin 1, beta
	LITAF	lipopolysaccharide-induced TNF factor
	MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
	PPP1R15A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A
	PROK2	prokineticin 2
	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
Protein modification	ATG3	ATG3 autophagy related 3 homolog (S. cerevisiae)
	CD37	CD37 molecule
	CSK	c-src tyrosine kinase
	DUSP1	dual specificity phosphatase 1
	FGR	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog
	FYB	FYN binding protein (FYB-120/130)
	HCK	hemopoietic cell kinase
	LIMK2	LIM domain kinase 2
	MAP2K6	mitogen-activated protein kinase kinase 6
	PPT1	palmitoyl-protein thioesterase 1 (ceroid-lipofuscinosis, neuronal 1, infantile)
	PSMB9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2)
	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
Protein amino acid dephosphorylation	DUSP1	dual specificity phosphatase 1
	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
Protein amino acid phosphorylation	CSK	c-src tyrosine kinase
	FGR	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog
	FYB	FYN binding protein (FYB-120/130)
	HCK	hemopoietic cell kinase
	LIMK2	LIM domain kinase 2
	MAP2K6	mitogen-activated protein kinase kinase 6
Immune response	ADAR	adenosine deaminase, RNA-specific

	AQP9	aquaporin 9
	BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)
	CD55	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group)
	CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
	CLEC2B	C-type lectin domain family 2, member B
	FCGR3B	Fc fragment of IgG, low affinity IIIb, receptor (CD16b)
	FPRL1	formyl peptide receptor-like 1
	FYB	FYN binding protein (FYB-120/130)
	GBP2	guanylate binding protein 2, interferon-inducible
	GPLY	granulysin
	IFITM2	interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)
	IGHG1	immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)
	IL16	interleukin 16 (lymphocyte chemoattractant factor)
	IL1B	interleukin 1, beta
	IL4R	interleukin 4 receptor
	IL8RA	interleukin 8 receptor, alpha
	IL8RB	interleukin 8 receptor, beta
	PF4	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)
	PROK2	prokineticin 2
	PSMB9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2)
	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
	SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial
	TLR1	toll-like receptor 1
Inflammatory response	BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)
	CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
	FPRL1	formyl peptide receptor-like 1
	IL1B	interleukin 1, beta
	IL8RA	interleukin 8 receptor, alpha
	IL8RB	interleukin 8 receptor, beta
	PF4	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)
	PROK2	prokineticin 2
	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
	TLR1	toll-like receptor 1
Regulation of transcription	BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)
	BTG2	BTG family, member 2
	CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
	EGR1	early growth response 1
	JUNB	jun B proto-oncogene
	LITAF	Lipopolysaccharide-induced TNF factor
	NRBF2	nuclear receptor binding factor 2

PNRC1	proline-rich nuclear receptor coactivator 1
SF1	splicing factor 1
SNW1	SNW domain containing 1
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial
TLE3	transducin-like enhancer of split 3 (E(sp1) homolog, Drosophila)
ZFP36	zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)
ZNF467	zinc finger protein 467

Figure legends

Figure 1: Validation of Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) libraries by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Eleven genes were arbitrarily selected to be individually evaluated by qRT-PCR in the polycythemia vera (PV) sample used to generate the SAGE library and in three of the five normal samples: *HBA*, *HBB*, *C3orf10*, *PRDX6*, *GPR137B*, *JUNB*, *ZFP36*, *BTG2*, *EGR1*, *C1QB* and *AHSP*. (Top) Gene expression data obtained by SAGE. Results are reported as fold increase, positive values indicate genes with a higher expression in PV, negative values indicate genes more expressed in the normal sample. (Bottom) Quantification by qRT-PCR. Gene expression was normalized by geometric averaging of β -actin, *GAPDH* and *BCR*. Fold increases were calculated in relation to each control sample analyzed. Results are presented as mean \pm SEM. Positive values indicate genes with higher expression in PV, negative values indicate genes more expressed in the normal sample.

Figure 2: *JUNB* expression in hematopoietic cells. *JUNB* quantification by qRT-PCR, normalized by geometric averaging of β -actin and *GAPDH*, in bone marrow cells of two PV patients (PV) and three normal controls (Ct), peripheral blood leukocytes of six PV patients and six normal controls, granulocytes of 14 PV patients and 14 normal controls, mononuclear cells of 13 PV patients and 14 normal controls.

Figure 3: *JAK2* V617F-expressing Ba/F3-EPOR cells constitutively express JunB. Parental, *JAK2* WT- and *JAK2* V617F-expressing Ba/F3-EPOR cells were analyzed under normal conditions of culture (10% fetal calf serum, 1U/mL EPO) and after six hours of serum and EPO deprivation. (A) JunB expression levels were analyzed by Western blotting. β -actin levels were detected as control. (B) *JUNB* / *GAPDH* gene expression ratio, as detected by SYBR quantitative real time PCR.

Figure 4: EPO induced a time-course response of JunB expression in Ba/F3-EPOR cells. After six hours of serum and EPO withdrawal (time 0), parental, *JAK2* WT- and *JAK2* V617F-expressing Ba/F3-EPOR cells were re-stimulated with 10U/mL EPO.

(A) *JUNB* / *GAPDH* gene expression ratio, as detected by SYBR quantitative real time PCR, 5, 15, 30min, 1h and 3h after EPO re-stimulation. (B) JunB, P-STAT5, STAT5 and β -actin protein levels were detected by Western blotting at 30min, 1h, 3h and 6h after EPO re-stimulation. (C) Fold increase in JunB / β -actin expression ratio, quantified after Western blotting with Image J software at 30min, 1h, 3h and 6h after EPO re-stimulation (mean of two experiments).

Figure 5: JunB is constitutively expressed in *JAK2* V617F-positive erythroblasts.

CD34+ cells from controls and *JAK2* V617F-positive patients (PV and IMF) were cultivated in an erythroid liquid culture system for 7 or 10 days. (A) Cytometry analysis of erythroid cells at day 10, showing cells double-positive for anti-CD36 and anti-Gpa antibodies. (B) Cytospin of erythroblasts at day 10, after a May-Grunwald-Giemsa coloration. (C) Western blot analysis of JunB protein expression in erythroblasts at day 7 or 10. STAT5 phosphorylation status was also investigated. Cells were analyzed in their steady state (1U/mL EPO) (SS), after four hours of EPO deprivation (D) and three hours after EPO re-stimulation (10U/mL EPO) (R).

Figure 6: JunB expression is dependent on *JAK2* V617F and on the PI3K and ERK pathways in *JAK2* V617F-expressing Ba/F3-EPOR cells.

JAK2 V617F-expressing Ba/F3-EPOR cells were incubated for six hours in deprivation, with increasing concentrations of AG490 (*JAK2* inhibitor), LY294002 (PI3K inhibitor) or PD98059 (MEK inhibitor). (A) Western blot analysis of JunB protein expression, in the presence of 0, 10, 25, 50, 75 or 100 μ M AG490. STAT5 phosphorylation status was accessed as a control of *JAK2* inhibition. (B) Fold decrease in JunB / β -actin expression ratio due to increasing concentrations of AG490, quantified after Western blotting with Image J software. (C) Western blot analysis of JunB expression in the presence of 0, 5, 10 or 25 μ M LY294002. AKT phosphorylation status was accessed as a control. (D) Western blot analysis of JunB expression in the presence of 0, 5 or 10 μ M PD98059. ERK phosphorylation status was accessed as a control.

Figure 7: JunB knock-down diminishes proliferation, clonogenic potential of human erythroid progenitors and EEC formation. Erythroid precursors were infected at day 4 with lentivirus particles containing shRNA targeted on *JUNB* or SCR and GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻ cells were sorted after immunostaining at day 5. (A) Western blot analysis of JunB expression in erythroid cells, 9 days after infection with shSCR, sh*JUNB2* or sh*JUNB3*. (B) Proliferation rate was assessed for 9 days in erythroid cells of one control and 2 patients (one PV, one IMF), infected with shSCR, sh*JUNB2* or sh*JUNB3*. (C) CFU-E formation assay in 2 controls and three patients (PV1, PV2, IMF). GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻ cells (1000), infected with shSCR, sh*JUNB2* or sh*JUNB3*, were plated in methylcellulose and colonies were counted 14 days later. (D) *JAK2* V617F quantification in CFU-E of one PV patient, using fluorescent competitive probes for quantitative real-time PCR. (E) EEC formation assay in three patients (PV1, PV2, IMF). GFP⁺/CD36⁺/Gpa⁻ erythroid progenitors (5000), infected with shSCR, sh*JUNB2* or sh*JUNB3*, were plated in methylcellulose and colonies were counted 14 days later. (F) Erythroid precursors were infected at day 4 with lentivirus particles containing shRNA targeted on *JUNB* or SCR and Bcl-xL expression was analyzed by Western blot analysis in erythroid cells at 10 days after the infection with shSCR, sh*JUNB2* or sh*JUNB3*.

Figure 1

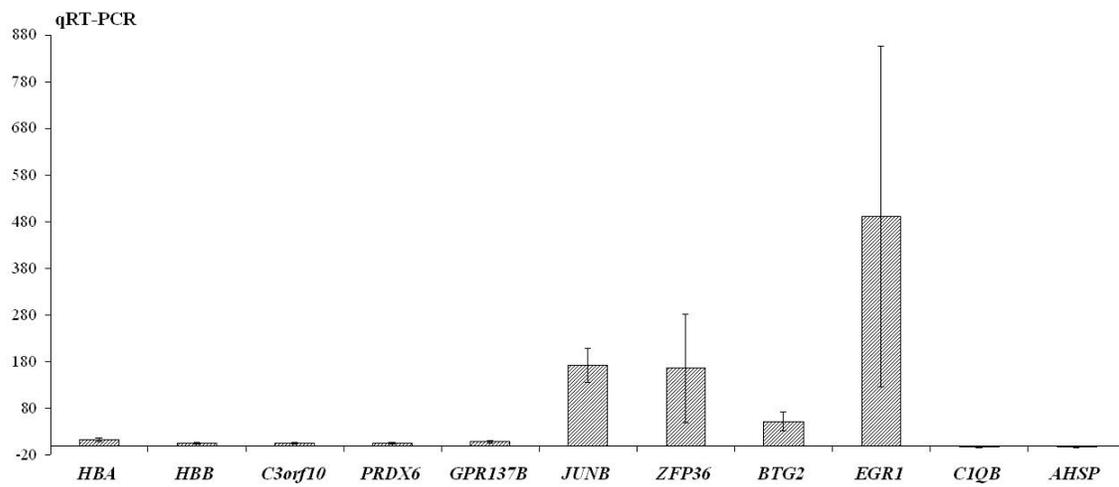
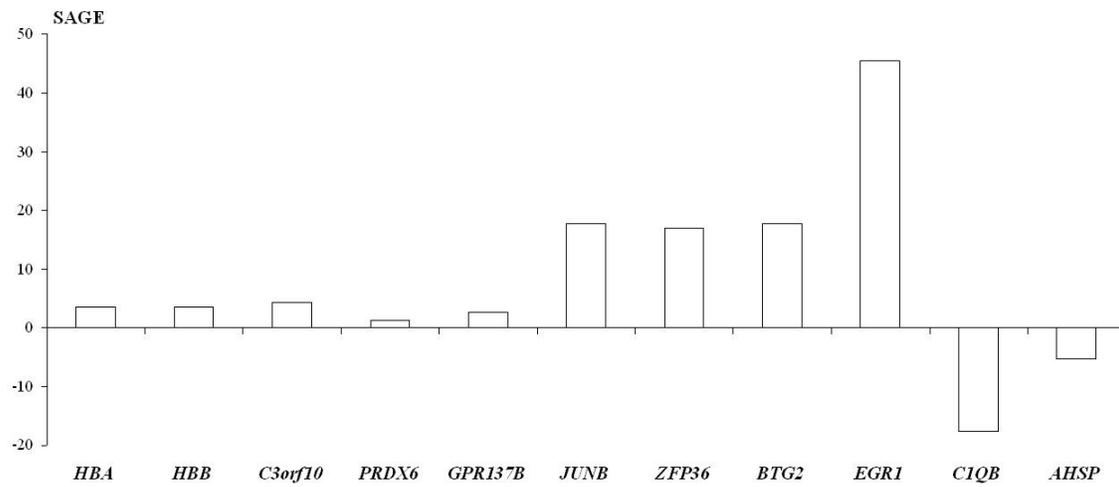


Figure 2

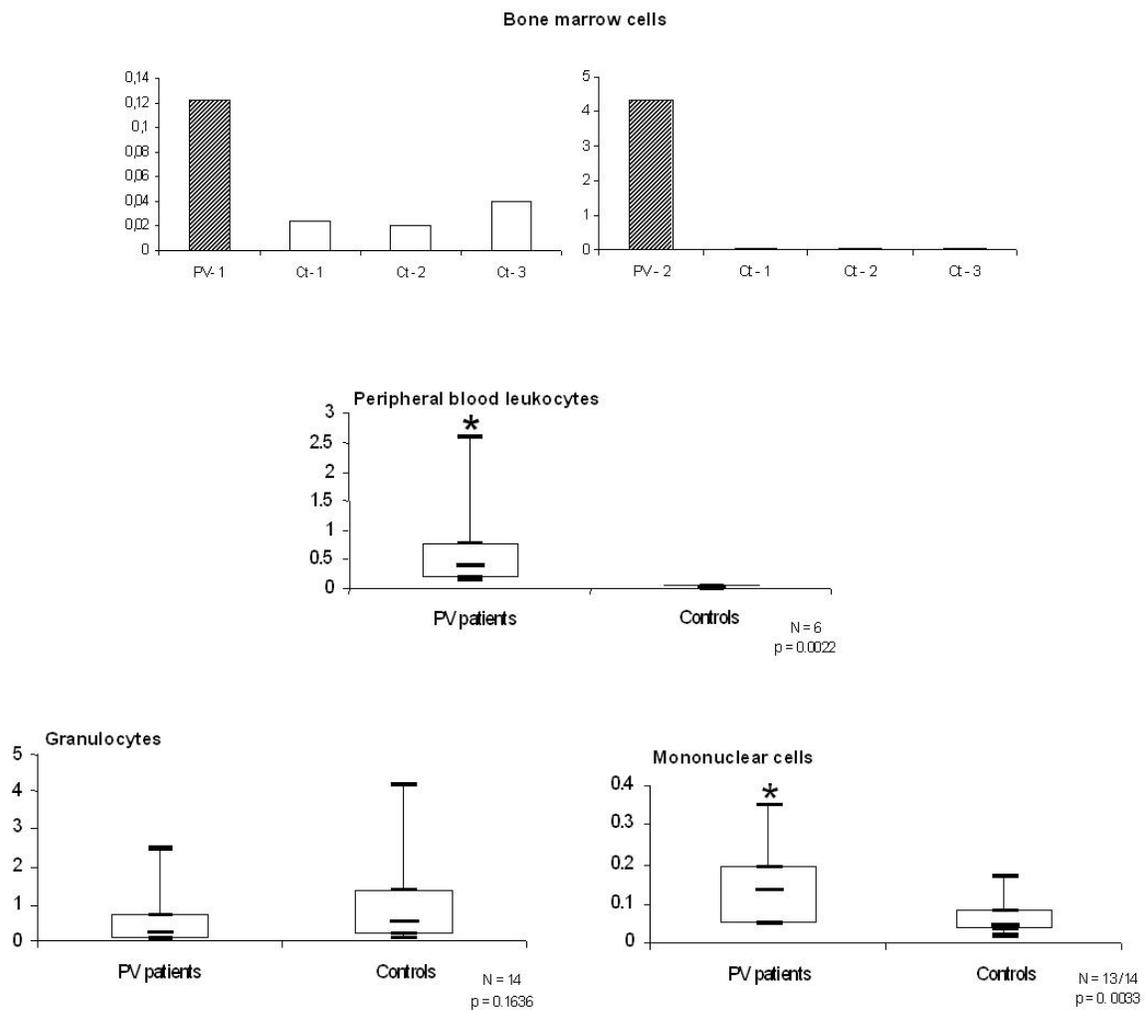
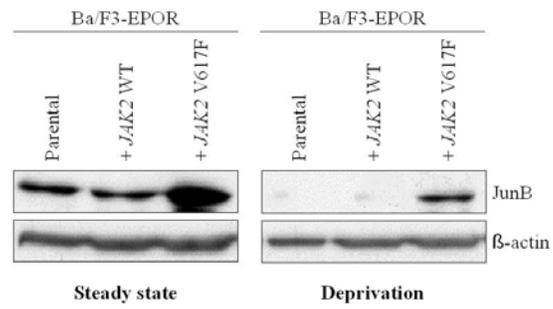


Figure 3

A



B

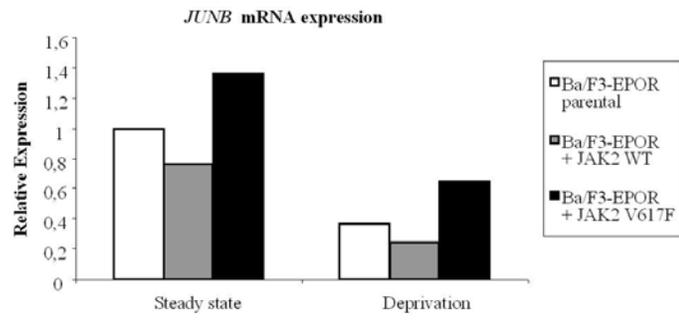
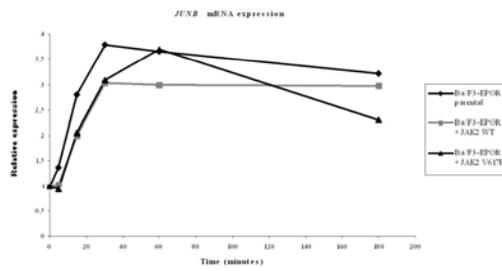
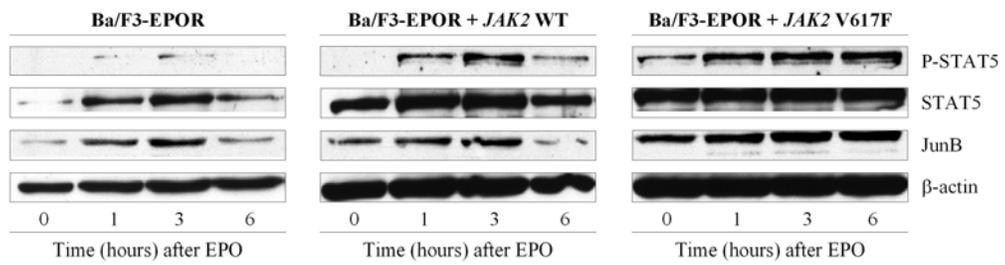


Figure 4

A



B



C

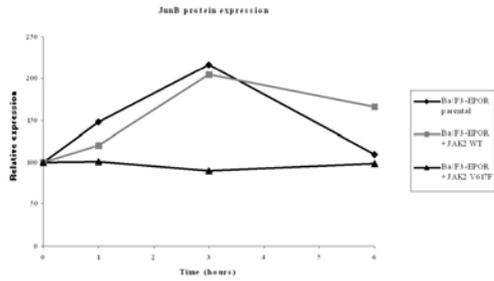


Figure 5

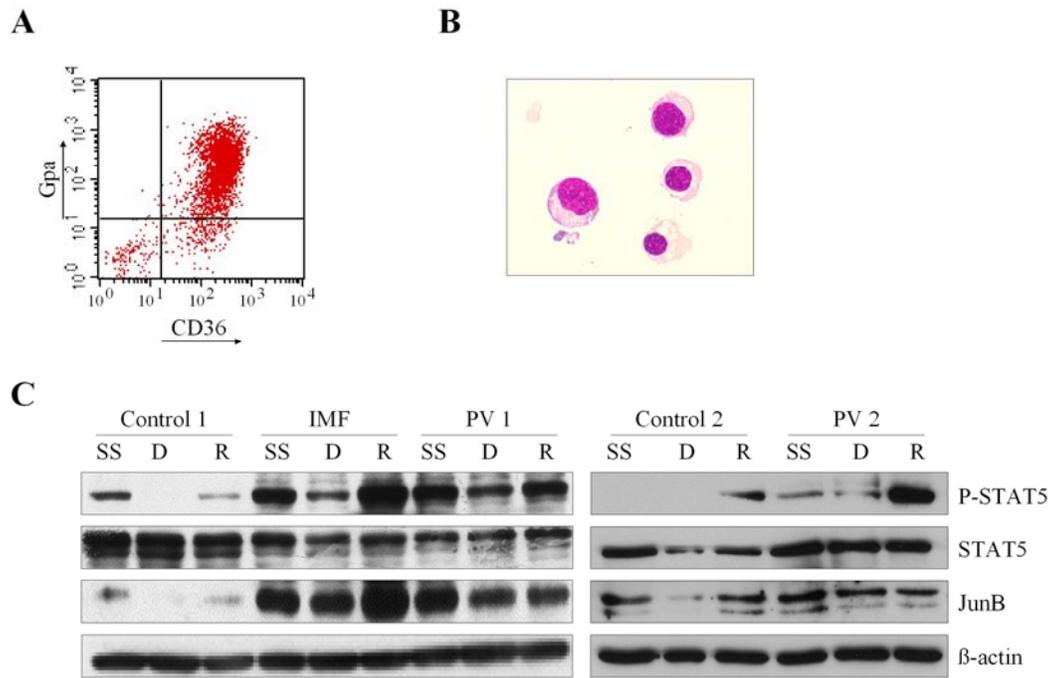


Figure 6

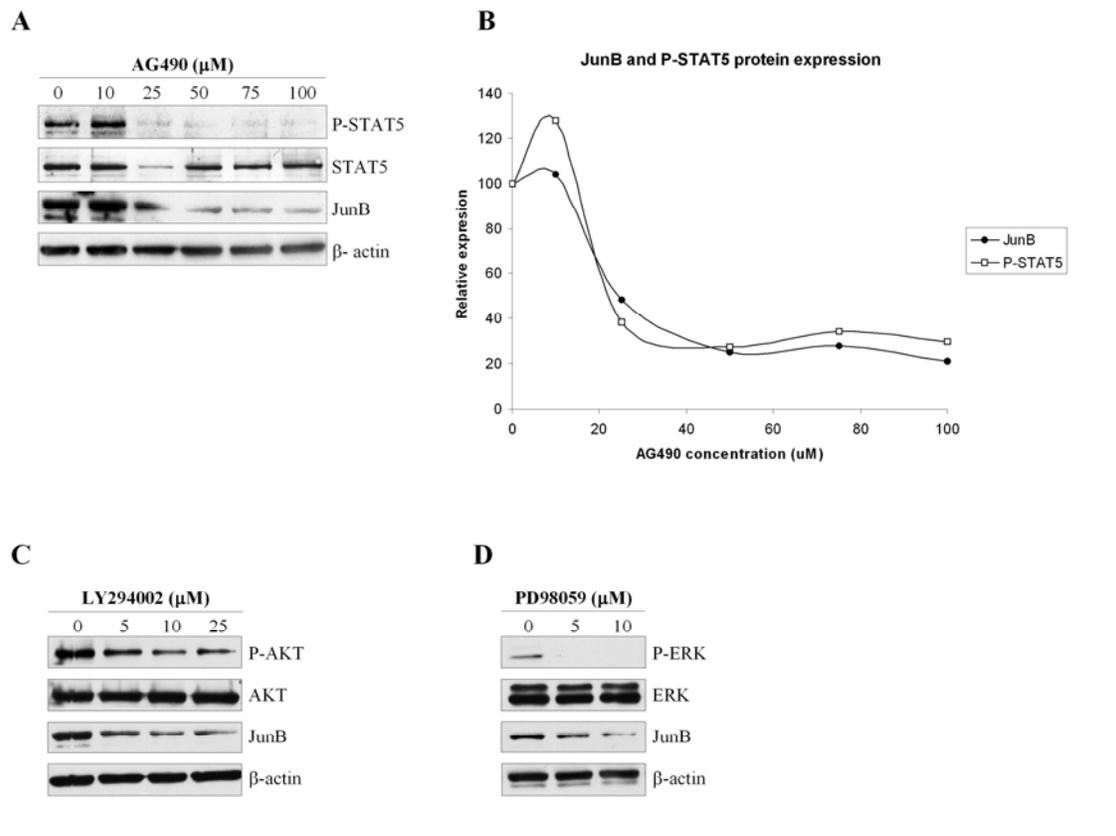
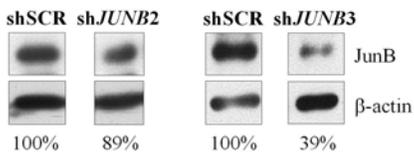
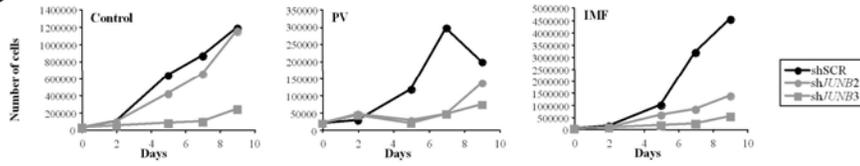


Figure 7

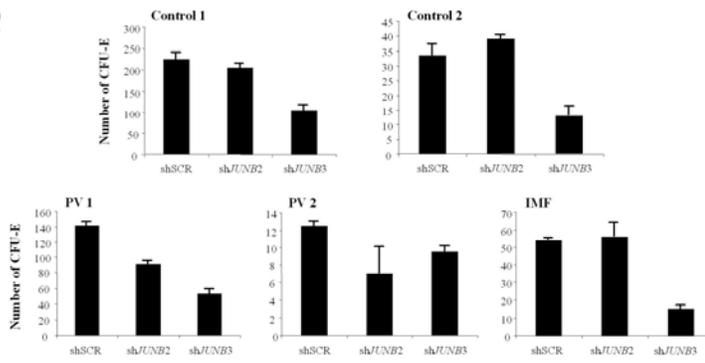
A



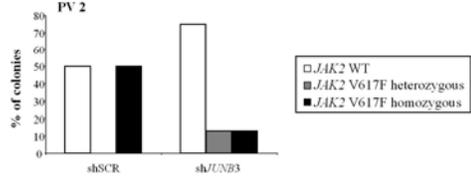
B



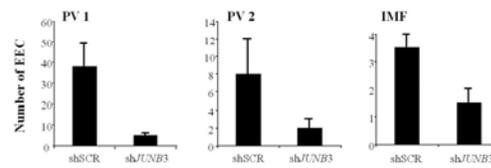
C



D



E



F

