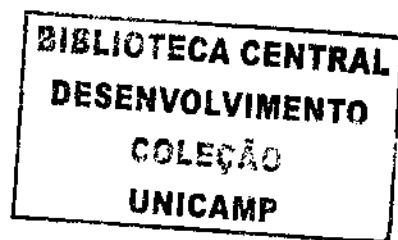


***PATRICIA MARIA BERGAMO FAVARO***

**FMNL1: CARACTERIZAÇÃO DE UM  
NOVO GENE HUMANO RELACIONADO  
COM A FAMÍLIA DAS FORMINAS**

Campinas

2006



***PATRICIA MARIA BERGAMO FAVARO***

**FMNL1: CARACTERIZAÇÃO DE UM  
NOVO GENE HUMANO RELACIONADO  
COM A FAMÍLIA DAS FORMINAS**

**Aluna: Patricia Maria Bergamo Favaro**

**Orientadora: Sara Terezinha Olalla Saad**

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

Campinas

2006

UNIDADE BC  
Nº CHAMADA T/UNICAMP  
F277f  
V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMBO BC: 67972  
PROC 16.125-06  
C \_\_\_\_\_ D X  
PREÇO 11,00  
DATA 12/04/06  
Vº CPD \_\_\_\_\_

BIB ID 377746

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

F277f

Favaro, Patricia Maria Bergamo

FMNL1: caracterização de um novo gene humano relacionado com a família das Forminas / Patricia Maria Bergamo Favaro. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Sara Terezinha Olalla Saad

Tese ( Doutorado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias hematológicas. 2. Proteína quinase B. I. Saad, Sara Terezinha Olalla. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

(Slp/fcm)

---

# **Banca examinadora de Dissertação de Doutorado**

---

---

**Orientador(a): Prof(a). Dr(a). SARA TERESINHA OLALLA SAAD**

---

---

## **Membros:**

---

1.

---

2.

---

3.

---

4

---

5

---

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

---

**Data: 15.02.2005**

---

## DEDICATÓRIA

---

*Decido esse trabalho aos meus estimados pais, Norival e Jane. A eles minha eterna gratidão. E ao meu querido esposo Rodrigo, sempre presente e incentivador de meus projetos.*



## AGRADECIMENTOS

---

A Deus, pois as coincidências não explicam todas as pessoas certas que passaram pelo meu caminho, para a realização desse projeto, que além de acadêmico, foi de vida.

À Dra. Sara, minha orientadora, que me recebeu com toda disponibilidade em seu laboratório e confiou esse projeto a mim. Seu exemplo profissional e pessoal irá perdurar ao longo da minha vida.

Ao Dr. Fernando Costa, que descobriu as duas ESTs que levaram à elaboração desse projeto.

Ao Samuel de Souza Medina, aluno de iniciação científica, que sempre esteve ao meu lado na produção e discussão dos resultados desse projeto. Além de toda ajuda científica, um grande amigo que ficará para sempre.

À Fabiola Traina, aluna de doutorado, que compartilhou comigo as incertezas e as conquistas da vida profissional e pessoal. Uma pessoa especial que como as outras mencionadas aqui, não aconteceu por acaso em minha vida.

À equipe de trabalho da Dra. Sara que me auxiliou direta e indiretamente no desenvolvimento desse projeto, pois é impossível realizar individualmente a pesquisa biológica. Em especial ao amigo Dr. Marcelo Brandão, pessoa extremamente solícita aos problemas de informática do laboratório.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Biologia Molecular, dentre eles os técnicos e todos os alunos do grupo de pesquisa do Dr. Fernando Costa, pela contribuição nesse trabalho, convivência aprazível e grandes momentos de descontração. Em especial à funcionária Maria Helena pelo carinho.

Às secretárias, Patricia e Raquel, pela disponibilidade no serviço burocrático e amizade.

A toda equipe de médicos e funcionários do Hemocentro pela colaboração.

Ao Dr. José Vassalo e à Dra. Glauce pela amizade acolhedora num momento de muita solidão e frio na França.

Às minhas amigas pessoais do laboratório, Nicola Conran, Andréia Canalli e Flávia Costa Leonardo pela doce convivência. Uma amizade que com certeza extrapolará o tempo desse projeto.

À FAPESP, pela concessão da Bolsa de Estudos e apoio financeiro, e ao CNPQ, pelos recursos. Ambos possibilitaram o desenvolvimento integral desse projeto.

Ao Rodrigo, amado companheiro, meu estímulo em todos os momentos desse percurso.

Aos meus pais, Norival e Jane, por fim, exemplos de primeira grandeza na minha vida, que sempre apoiaram decisivamente as minhas escolhas.

*"This structure has novel features which are of considerable biological interest"*

*Parágrafo de abertura da carta de James Watson e Francis Crick*

# SUMÁRIO

---

|                                                         |     |
|---------------------------------------------------------|-----|
| DEDICATÓRIA .....                                       | iii |
| AGRADECIMENTOS .....                                    | iv  |
| LISTA DE ABREVIACÕES .....                              | ix  |
| LISTA DE FIGURAS .....                                  | x   |
| RESUMO .....                                            | xiv |
| ABSTRACT .....                                          | xvi |
| INTRODUÇÃO .....                                        | 18  |
| Proteínas da Família das Forminas .....                 | 19  |
| Estrutura das Forminas .....                            | 20  |
| Função das Forminas .....                               | 21  |
| Proteína Kinase B .....                                 | 22  |
| OBJETIVOS .....                                         | 25  |
| MATERIAIS E MÉTODOS .....                               | 27  |
| Análise Computacional .....                             | 28  |
| Extração do RNA total .....                             | 28  |
| Tratamento do RNA total com DNase I .....               | 29  |
| Transcrição em cDNA .....                               | 29  |
| Reação em cadeia da polimerase-PCR .....                | 29  |
| RACE (“rapid amplification of cDNA ends”) .....         | 30  |
| Seqüenciamento .....                                    | 30  |
| Northern Blotting Multi-tecidual .....                  | 31  |
| Produção do anticorpo anti-FMNL1 .....                  | 32  |
| Tecidos humanos normais .....                           | 32  |
| Linhagens celulares .....                               | 33  |
| Células mononucleares de sangue periférico .....        | 33  |
| Subpopulações de linfócitos .....                       | 33  |
| LNH e linfonodos reacionais .....                       | 33  |
| Teste estatístico .....                                 | 34  |
| Western Blotting .....                                  | 34  |
| Microscopia confocal .....                              | 35  |
| Extração de proteínas citoplasmáticas e nucleares ..... | 36  |
| Construção dos vetores .....                            | 36  |

|                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Transfecções.....                                                                                                                                              | 37 |
| Indução à apoptose .....                                                                                                                                       | 37 |
| RESULTADOS .....                                                                                                                                               | 38 |
| 1. Obtenção da sequência completa do RNAm da nova formina humana .....                                                                                         | 39 |
| 2. Análise da expressão do RNAm de <i>FMNL1</i> em diferentes tecidos e linhagens celulares humanos, através da técnica de <i>Northern Blotting</i> .....      | 43 |
| 3. Análise da expressão da proteína FMNL1 em diferentes tecidos humanos e linhagens celulares neoplásicas, através da técnica de Western Blotting.....         | 44 |
| 4. FMNL1 apresenta maior expressão em células normais CD19- e em subpopulações de CD19+/CD27+ .....                                                            | 46 |
| 5. A expressão da proteína FMNL1 é maior em LNH T quando comparada a outros LNH e linfonodos reacionais.....                                                   | 49 |
| 6. FMNL1 localiza-se no citoplasma de células Jurkat e de células mononucleares de sangue periférico através da microscopia confocal .....                     | 50 |
| 7. FMNL1 é expressa no citoplasma de células Jurkat e de células mononucleares de sangue periférico através da técnica de separação de frações celulares ..... | 51 |
| 8. FMNL1 está associada com AKT em células Jurkat e células mononucleares de sangue periférico de um paciente com LLC.....                                     | 52 |
| 9. A associação da proteína FMNL1 com AKT não é dependente da fosforilação da AKT .....                                                                        | 53 |
| 10. Os domínios FH2 e FH3 da proteína FMNL1 associam-se com a proteína AKT em estudos in vitro .....                                                           | 55 |
| 11. A proteína FMNL1 não se associa com outras proteínas presentes na via de sinalização da AKT .....                                                          | 56 |
| 12. O tratamento com agentes apoptóticos em linhagens celulares Jurkat e KG1a leva à diminuição da expressão de FMNL1 .....                                    | 58 |
| DISCUSSÃO .....                                                                                                                                                | 61 |
| CONCLUSÃO .....                                                                                                                                                | 67 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                                               | 70 |
| APÊNDICES .....                                                                                                                                                | 79 |



## **LISTA DE ABREVIACÕES**

---

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool  
DNA- DesoxiriboNucleic Acid  
EST – Expression Sequence Tags  
FasL- Fas Ligant  
FITC - Fluorescein Isothiocyanate  
FMNL1 - formin-like 1  
GFP - Green Fluorescent Protein  
HA – hemaglutinina  
LLC – Leucemia Linfóide Crônica  
LNH- Linfoma não-Hodgkin  
NCBI – National Center for Biotechnology Information  
ORESTES – Open Reading frame ESTs  
PE – Phycoeritrine  
RNA – RiboNucleic Acid

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1: Esquema representativo da estrutura de algumas proteínas pertencentes à família das Forminas. O domínio FH3 está representado em azul, FH1 em amarelo e FH3 em verde. .... 20
- Figura 2: Representação esquemática dos iniciadores desenhados para confirmar a sequência predita do cDNA de FMNL1 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 43) e obter as porções 5' e 3' pelo método RACE (RACE 5': 7 ao 17; RACE 3': 36, 37). Iniciadores 1 e 2 foram usados para produção da sonda para Northern Blotting. A sequência KW13 (número de acesso no GenBank No. AF432213) é representada pelo retângulo preto e a porção 5' obtida pelo RACE 5' é representada pelo retângulo aberto. .... 40
- Figura 3: Esquema da organização dos exons e introns de *FMNL1*. Os retângulos em preto representam os exons, e em aberto, os introns, distribuídos ao longo do cromossomo 17 (banda 17q2131)..... 41
- Figura 4: Estrutura protéica de FMNL1 e FRL. (A) Sequência de aminoácidos predita de FMNL1. O domínio FH1 é indicado por uma linha grossa e FH2 por uma linha pontilhada. FH3 está indicado por uma linha fina. A sequência de aminoácidos usada para a produção do anticorpo policlonal está representada no retângulo aberto. (B) Representação esquemática das proteínas FMNL1 e FRL. A homologia entre os domínios foi calculada pela razão entre o número de aminoácidos idênticos de FRL pelo número de aminoácidos correspondentes de FMNL1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). A posição do primeiro e último aminoácido é mostrada em cada domínio. .... 42
- Figura 5: *Northern Blotting* multi-tecidual do RNAm de *FMNL1* em tecidos humanos normais (A e B) e em linhagens neoplásicas (C). Como controle da quantidade de RNAm na membrana, uma sonda de  $\beta$ -actina foi usada. .... 44
- Figura 6: Análise por *Western Blotting* da expressão da proteína FMNL1 em diferentes tecidos humanos (A) e diferentes linhagens neoplásicas humanas (B). Como

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| controle da quantidade de amostra aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-actina. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 45 |
| Figura 7: Análise por <i>Western Blotting</i> da expressão da proteína FMNL1 em células mononucleares de sangue periférico de 20 pacientes com LLC e de 10 indivíduos normais (A). Quantificação da intensidade das bandas de FMNL1, corrigida pela expressão de actina, através do programa ImageJ (B). * $p < 0,05$ .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 46 |
| Figura 8: (A) Análise por <i>Western Blotting</i> da expressão de FMNL1 em populações de células CD19 <sup>+</sup> e CD19 <sup>-</sup> de quatro tonsilas palatinas de indivíduos adultos com tonsilite crônica. Células Jurkat foram usadas como controle positivo para expressão de FMNL1. Como controle da quantidade de amostra aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-tubulina. (B) Análise densitométrica das bandas obtidas no <i>Western Blotting</i> , através do programa LAS 3000, Analysis Image Gauge (Fuji film). A expressão de FMNL1 foi normalizada pela expressão de tubulina. ....                                    | 47 |
| Figura 9: Análise por <i>Western Blotting</i> da expressão de FMNL1 em populações de linfócitos CD19 <sup>+</sup> /CD27 <sup>+</sup> e CD19 <sup>+</sup> /CD27 <sup>-</sup> de quatro tonsilas palatinas de indivíduos adultos com tonsilite crônica. Células Jurkat foram usadas como controle positivo para expressão de FMNL1. Como controle da quantidade de amostra aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-tubulina. (B) Análise densitométrica das bandas obtidas no <i>Western Blotting</i> , através do programa LAS 3000, Analysis Image Gauge (Fuji film). A expressão de FMNL1 é normalizada pela expressão de tubulina. .... | 48 |
| Figura 10: Análise por <i>Western Blotting</i> da expressão de FMNL1 em diferentes amostras de LNH e linfonodos reacionais. O gráfico é um Box-and-Wisker da intensidade das bandas, obtida através do programa ImageJ, no qual foi feita a correção da quantidade de amostra aplicada no gel através da banda correspondente da expressão de actina. * $p < 0,05$ LNH T vs outros grupos. ....                                                                                                                                                                                                                                                                     | 50 |
| Figura 11: Imunolocalização fluorescente de FMNL1. (A) Células mononucleares de sangue periférico de um indivíduo normal. (B) Células Jurkat. O núcleo celular é mostrado em vermelho, pela marcação específica do DNA com Iodeto de Propídio. FMNL1 está localizada no citoplasma e é visualizada na cor verde. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 51 |

- Figura 12: Análise por *Western Blotting* da expressão de FMNL1 em frações celulares. Células Jurkat ou mononucleares de sangue periférico (PBMC) de um indivíduo normal (N) ou com LLC foram submetidas ao protocolo de separação de frações celulares: citoplasma (C) e núcleo (N). Os anticorpos anti-actina e anti-histona foram usados para incubar as mesmas membranas como controles da eficiência da separação. .... 52
- Figura 13: Associação de FMNL1 com AKT através da técnica de imunoprecipitação em células Jurkat (A) e em células mononucleares de sangue periférico de um paciente com LLC (B). Quantidades iguais de extrato total protéico foram imunoprecipitadas (IP) com anticorpo anti-AKT e a membrana incubada com anticorpo anti-FMNL1. (C) Ensaio reverso: quantidades iguais de extrato total protéico de Jurkat foram IP com anti-FMNL1 e incubadas com anti-AKT. Como controle negativo, algumas amostras foram IP com imunoglobulina G (IgG) não relacionada de coelho. .... 53
- Figura 14: Análise por *Western Blotting* da fosforilação de AKT, com anticorpo anti-fosfo-AKT (p-AKT) em células Jurkat, tratadas com diferentes concentrações de LY-294002 (20 mM, 30 mM e 40 mM) e coletadas após 2 horas de incubação. .. 54
- Figura 15: Associação de FMNL1 com AKT através da técnica de imunoprecipitação em células Jurkat. Quantidades iguais de extrato total protéico foram imunoprecipitadas (IP) com anticorpo anti-AKT e a membrana incubada com anticorpo anti-FMNL1, em células sem tratamento (ctl) ou tratadas com diferentes concentrações de LY-294002 (20 mM, 30 mM e 40 mM) durante 2 horas. .... 54
- Figura 16: Associação dos domínios FH2 e FH3 de FMNL1 com AKT. A linhagem celular 293 foi cotransfectada com as construções FH2-GFP ou FH3-GFP com AKT-HA. Após 48 horas de transfecção, extrato protéico das células 293 foi imunoprecipitada (IP) com anti-GFP e submetido ao *Western Blotting*. (A) A membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo anti-HA. (B) A mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-GFP. Mock são as células submetidas a todo o processo, sem receber os vetores (controle negativo). .... 55
- Figura 17: Via de sinalização resumida de AKT, mostrando as proteínas Mdm2, mTOR, Bad, p70S6K e a associação de AKT com FMNL1. .... 57

- Figura 18: Análise por *Western Blotting* da expressão de FMNL1 em células Jurkat tratadas com 0,45ng/ml de FasL, coletadas em diferentes tempos: 0, 10 ,20 ,30, 40, 50, 60 e 90 minutos. Como controle da ativação da via das caspases a mesma membrana foi incubada com os anticorpos anti-caspase 8 e 3. Como controle da quantidade de amostra aplicada no gel, a expressão de actina foi analisada..... 58
- Figura 19: Análise por *Western Blotting* da expressão de FMNL1 em células KG1a tratadas com diferentes concentrações de mitramicina (100, 300 ou 500 nM), coletadas em diferentes tempos: 24 e 48 horas, sendo 0 h o controle sem tratamento. Como controle da ativação da via das caspases a mesma membrana foi incubada com os anticorpos anti-caspase 8 e 3. Como controle da quantidade de amostra aplicada no gel, a expressão de actina foi analisada..... 59

## RESUMO

---

Forminas são proteínas relacionadas com o controle de morfogênese, diferenciação embrionária, citocinese, polaridade e sobrevivência celular. São conservadas entre várias espécies, incluindo fungos, plantas, moscas de fruta, camundongos e humanos, apresentando múltiplos domínios.

Com o objetivo de descrever novas proteínas, através das informações geradas pelo projeto Genoma do Câncer Humano, uma parceria entre a Fapesp e o Instituto Ludwig, duas EST humanas (*expression sequence tags*) foram identificadas com homologia aos genes da família das forminas. O objetivo do presente estudo foi obter a sequência completa do RNAm deste novo gene e a estrutura primária da proteína para estudos de localização, interações com outras proteínas e estudos funcionais da mesma.

Para obter a sequência completa do RNAm, foram realizadas buscas no banco de dados genômico do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e usadas técnicas de biologia molecular. Assim, após a obtenção da sequência completa do novo RNAm foi possível o depósito do mesmo no banco de dados do portal NCBI, com o nome de Formina Leucocitária Humana (número de acesso AY278319). Posteriormente, baseando-se na nomenclatura de novos genes e proteínas, aprovada pelo Gene Nomenclature Committee HUGO, o novo gene foi renomeado *formin-like 1*, doravante FMNL1.

A produção de um anticorpo policlonal específico para a proteína codificada pelo *FMNL1*, permitiu o estudo de sua expressão em diversos tecidos humanos. Através da técnica de *Western Blotting*, foi observada expressão preferencial em células neoplásicas, especialmente linfóides. Dentre os tecidos normais, foi detectada expressão apenas em células mononucleares de sangue periférico, em linfonodo e preferencialmente em células CD19<sup>-</sup> quando comparadas com células CD19<sup>+</sup> de tonsilas normais. Dentre as linhagens celulares neoplásicas, a expressão foi maior em MOLT-4 e Jurkat, quando comparadas com outras linhagens mielóides, indicando expressão preferencial da proteína em neoplasias linfóides. Além disso, a alta expressão da proteína foi observada em células mononucleares de sangue periférico de 20 pacientes com LLC (leucemia linfóide crônica), quando comparadas com células mononucleares de sangue periférico de indivíduos normais.

Quando a expressão da proteína FMNL1 foi estudada em diferentes tipos histológicos de Linfomas não-Hodgkin (LNH) e em linfonodos reativos, novamente foi observada a expressão preferencial no tecido neoplásico em relação ao tecido normal, sendo os LNH-T aqueles com expressão mais significativa.

Esta nova proteína FMNL1 localiza-se no citoplasma, conforme verificado pela microscopia confocal e confirmado através da técnica de separação de frações. Das interações desta proteína, foi detectada a associação de FMNL1 com AKT, sendo que essa associação é independente da ativação de AKT. Também foi observado que a ativação da via das caspases em duas linhagens celulares neoplásicas levava à diminuição da expressão da proteína FMNL1.

Em síntese, a expressão preferencial da proteína FMNL1 em tecidos neoplásicos linfóides e a sua associação com AKT, sugere a sua participação na sobrevivência dessas células e, possivelmente, na fisiopatologia das neoplasias hematológicas.

## ABSTRACT

---

Formins are proteins that are involved in processes such as morphogenesis, embryonic differentiation, cytokinesis, cell polarity and survival. The formins are multidomain proteins that are conserved from plants to fungi and vertebrates. A search of the ORESTES database, generated from the Human Cancer Genome Project, identified 2 ESTs that were similar to the Formin-related proteins. The aim of this study was to obtain the full-length sequence of this new gene, the primary structure of the protein coded by this gene, its subcellular localization and to characterize its possible interaction with other proteins in addition to functional studies.

In an attempt to obtain the full-length sequence of this mRNA, searches in the human genome database at NCBI (National Center for Biotechnology Information) and molecular biology techniques were performed. The whole coding sequence of this gene was named Human Leukocyte Formin and was deposited at the human genome database at NCBI (GenBank Accession No. AY278319). Later, based on the HUGO Gene Nomenclature Committee, the new gene was renamed *formin-like 1* and the symbol *FMNL1* will herein be used.

The production of a polyclonal antibody specific for the protein FMNL1 allowed the study of the protein's expression in different human tissues. Using the Western Blotting technique, a preferential expression of this protein in lymphoid malignancies was observed. Among normal tissues, a low expression in lymph node, peripheral blood mononuclear cells and in CD19<sup>-</sup> cells (when compared with CD19<sup>+</sup> cells from normal tonsils) was observed. Among the malignant cell lines, a high expression of the protein was detected in MOLT-4 and the Jurkat cell line, when compared with myeloid cancer cell lines, suggesting a preferential expression of FMNL1 in lymphoid malignancies. Moreover, a high expression of the protein in peripheral blood mononuclear cells from 20 chronic lymphocytic leukemia patients was observed when compared with peripheral blood mononuclear cells of normal donors. When the expression of FMNL1 protein was compared among different histological types of non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and

reactive lymph nodes, again, a preferential expression of the protein in the malignant tissue was detected and the T cell NHL presented the highest expression.

This new protein is located in the cytoplasm of the cells, as observed by confocal microscopy and confirmed by separation of the cellular fraction. With regard to the interactions of this new protein, an association of FMNL1 with AKT was detected, and this association was not dependent on AKT activation. A decrease in FMNL1 expression in 2 cancer cell lines after caspase activation was also detected.

In conclusion, the preferential expression of FMNL1 in lymphoid malignancies and its association with AKT, suggests the role of FMNL1 in cell survival and a possible role in the pathophysiology of hematological malignancies.



## ***INTRODUÇÃO***

---

A descrição da molécula de DNA por Francis Crick e James Watson, em 1953, mudou os rumos da ciência (WATSON e CRICK, 1953). Até o início dos anos setenta, o DNA foi a molécula mais difícil de ser analisada bioquimicamente, sendo essa análise possível apenas indiretamente. Atualmente, o DNA, de macromolécula mais difícil de ser examinada, passou a ser a mais fácil. Hoje, é possível isolar uma região específica do genoma, produzir um número de cópias virtualmente ilimitadas e determinar a sequência de nucleotídeos. Também é possível isolar e alterar uma sequência gênica e, então, transferi-la de volta para a célula de origem de um animal ou planta, tornando essa alteração parte do genoma desse organismo. Além disso, cinquenta anos após a descoberta da estrutura do DNA, graças aos Projetos Genomas, que se disseminaram internacionalmente e produziram uma quantidade enorme de informação sobre diferentes organismos, é possível acessar as informações sobre o genoma de vários organismos, incluindo o humano. Entretanto, que diferença faz saber as informações do genoma humano? A era pós-genoma está levando a uma grande explosão de pesquisa básica com a questão fundamental: como o genoma será interpretado? Assim, a era pós-genoma busca as funções biológicas de cada proteína codificada pelos genes descritos e pretende melhor entender os processos celulares que ocorrem em diferentes organismos.

Dentre os inúmeros Projetos Genomas desenvolvidos no Brasil, destaca-se o Projeto Genoma do Câncer Humano, uma parceria entre a Fapesp e o Instituto Ludwig (DIAS NETO et al., 2000). Esse projeto é de grande valia, posto que novos genes presentes nas neoplasias foram identificados. O estudo e caracterização funcional desses novos genes são úteis para melhor compreensão das alterações neoplásicas. No banco de dados ORESTES (*Open Reading frame ESTs*), gerado por esse projeto, foram identificadas duas ESTs homólogas aos genes da família das forminas. O objetivo desse estudo foi caracterizar esse novo gene humano, através da obtenção da sequência completa do seu RNAm e da realização de estudos funcionais da proteína codificada por esse gene.

### **Proteínas da Família das Forminas**

Forminas são proteínas conservadas entre várias espécies, incluindo fungos, plantas, moscas de fruta, camundongos e humanos.

As características dessas proteínas, como estrutura e funções, serão abordadas a seguir.

### Estrutura das Forminas

Forminas são proteínas de múltiplos domínios (Figura 1) que medeiam vários sinais, incluindo a reorganização de actina, sendo a presença do domínio FH2 (Formin Homology Domain 2), localizado na extremidade carboxi-terminal, característica de todas as proteínas da família das forminas. FH2 é um domínio extremamente conservado e na maioria das vezes é precedido por uma região com múltiplas repetições consecutivas de prolinas, o domínio FH1 (EVANGELISTA et al., 2003; WALLAR e ALBERTS, 2003). O domínio FH2 induz a nucleação dos filamentos de actina, *in vitro* (PRUYNE et al., 2002; SAGOT et al., 2002). O domínio FH1, que interage com domínios SH3 (Src Homology 3) (REN et al., 1993), WWP/WW (CHAN et al., 1996) e Profilina (EVANGELISTA et al., 1997; IMAMURA et al., 1997), confere atividade ao complexo FH2-actin (ZIGMOND, 2004). O domínio menos conservado, FH3, localizado na porção amino-terminal, está presente em grande parte das forminas. FH3 é requisitado para a localização intracelular da proteína Fus1, que é fundamental para conjugação das leveduras em fissão, em *S. pombe* (PETERSEN et al., 1998). Um estudo de formina, em mamíferos, mostrou que os domínios FH1 e FH3 estão envolvidos em funções como adesão, migração, proliferação e sobrevivência (YAYOSHI-YAMAMOTO et al., 2000).

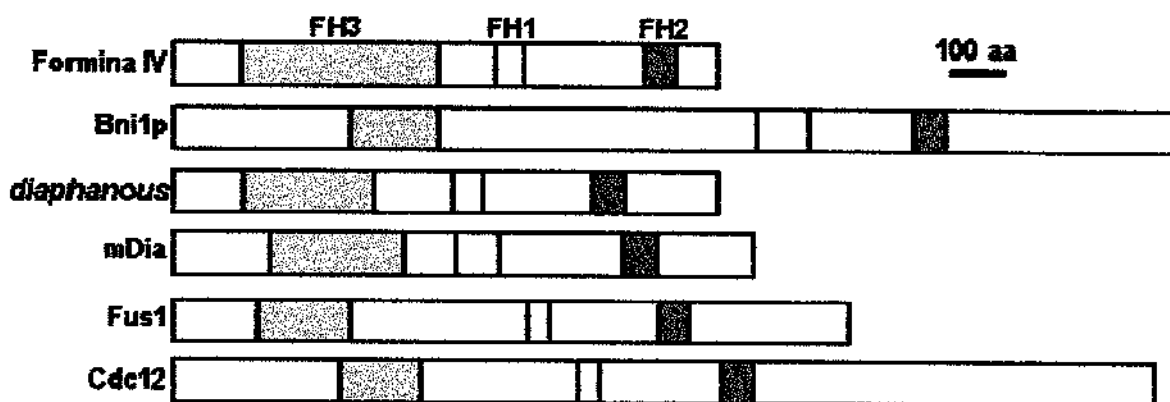


Figura 1: Esquema representativo da estrutura de algumas proteínas pertencentes à família das Forminas. O domínio FH3 está representado em azul, FH1 em amarelo e FH3 em verde.

## Função das Forminas

O primeiro gene da família das forminas foi descrito em camundongo cujas mutações interrompem as interações epitélio-mesenquimais que regulam a formação dos membros desses animais, levando assim à deformação nos mesmos (ZELLER et al., 1989). Posteriormente, genes homólogos ao gene murino, *Diaphanous*, *Bni1p* e *Cdc12p* foram identificados. Havendo mutações no gene de *Drosófila* *Diaphanous* ocorrem alterações na citocinese (CASTRILLON e WASSERMAN, 1994). Em relação aos genes *Bni1p* e *Cdc12p*, que foram identificados em leveduras, estes estão envolvidos com regulação do citoesqueleto de actina.

Evidências indicam que as proteínas da família das forminas desempenham papel crucial na reorganização do citoesqueleto de actina, e estão envolvidas em processos celulares como o de efetores para as GTPases (Guanosina Trifosfatases) tipo Rho (EVANGELISTA et al., 1997; IMAMURA et al., 1997; KOHNO et al., 1996), regulação da citocinese, crescimento polarizado e formação das fibras de estresse (RIDLEY, 1999; WASSERMAN, 1998; ZELLER et al., 1999). Recentemente, identificaram-se as Forminas como uma nova classe de nucleadores de actina que orientam a montagem dos filamentos retos de actina (PRUYNE et al., 2002; SAGOT et al., 2002). A nucleação da actina consiste na formação de um filamento curto por dois ou três monômeros de actina, levando à sua polimerização.

Das interações moleculares apresentadas pelas forminas, destacam-se o recebimento de sinais dos membros da família Rho (que também atuam na regulação de diversos processos biológicos) e as interações com proteínas do citoesqueleto (TANAKA, 2000).

Os homólogos da formina expressos em fungos definem uma subfamília distinta, chamada de *bni1*, cuja análise a análise genética mostra que eles também funcionam na citocinese e na polarização das células, durante o brotamento e a conjugação de leveduras ou septação de aspergilos (ZELLER et al., 1999). A proteína *Bni1* é expressa em *S. cerevisiae* e a sua mutação está relacionada com defeito de reprodução, além de levar a uma fraca deficiência na citocinese e produzir orientação anormal do eixo mitótico. Isso revela o envolvimento, por parte dessa proteína, na função dos microtúbulos, agindo, por exemplo, como um marcador cortical para a orientação dos mesmos. A interação molecular entre *Bni1* e o citoesqueleto de actina foi revelada pela demonstração de que o domínio FH1

dessa formina se liga à profilina, uma proteína implicada na polimerização da actina (TANAKA, 2000). A proteína Cdc12, em *S. pombe*, é necessária para a ligação do anel contrátil de actina e miosina e para o término da citocinese (GOODE et al., 2000).

Um outro membro da família das forminas é o Bnr1, que pode estar envolvido na citocinese, uma vez que ele interage através de seu domínio FH1, com o domínio SH3 da Hof1p, uma proteína envolvida na citocinese (KAMEI et al., 1998).

As proteínas Diaphanous e Cappuccino, ambas expressas em *Drosófilas*, também foram identificadas como forminas e suas mutações resultam em citocinese deficiente. Diaphanous, quando mutado em espermátócitos, causa a ausência do eixo central e do anel contrátil na ana-telófase meiótica (CASTRILLON e WASSERMAN, 1994). Cappuccino, por sua vez, é um gene necessário para a localização de determinantes moleculares dentro de oócitos de *drosófilas* em desenvolvimento (EMMONS et al., 1995).

Há, ainda, um homólogo do Diaphanous, expresso em mamíferos, denominado mDia, que tem a capacidade de se ligar ao RhoA. O homólogo humano dessa proteína recebe o nome de DFNA1 (hDia) e é responsável pela surdez não-sindrômica (TANAKA, 2000).

Os estudos sobre o gene FRL em camundongos (YAYOSHI-YAMAMOTO et al., 2000) mostram que o RNAm está expresso na maioria dos tecidos normais, sendo a sua expressão maior em baço, linfonodos e células de medula óssea. A superexpressão em uma linhagem de macrófagos, de uma forma truncada dessa proteína (contendo os domínios FH1 e FH3), inibiu a adesão e migração celular, além de resultar em morte celular por apoptose. Além disso, é descrita a interação da proteína FRL com RAC, da família das Rho GTPases, sendo essa interação dependente da presença do domínio FH3. Desse modo, esses estudos sugerem que a FRL possa desempenhar um papel no controle da reorganização do citoesqueleto de actina em associação com a RAC e também possa estar envolvido na transmissão de sinais essenciais à sobrevivência celular.

### **Proteína Kinase B**

Dentre as vias de sinalização que participam da sobrevivência celular, destaca-se a via de sinalização da Proteína Kinase B (PKB), também chamada de AKT. Esta proteína é

considerada uma importante reguladora da proliferação e sobrevivência celular. Já foi demonstrado que a ativação da via de sinalização da AKT leva além da indução da sobrevivência celular, à glicogênese, à síntese protéica e à captação de glicose (CHAN et al., 1999; COFFER et al., 1998).

Três isoformas já foram identificadas em mamíferos: AKT 1, AKT 2 e AKT 3 (BRODBECK et al., 1999; CHENG et al., 1992; JONES et al., 1991a). Estruturalmente, todas as isoformas são compostas por um domínio PH (porção N-terminal), um domínio catalítico central e um domínio regulatório hidrofóbico (porção C-terminal) (JONES et al., 1991a; JONES et al., 1991b; NAKATANI et al., 1999).

A ativação da AKT conduz a uma seqüência de eventos bioquímicos amplamente regulados. A ativação de receptores tirosina kinase por diferentes fatores de crescimento, de receptores acoplados à proteína G ou qualquer outro estímulo celular que leve à ativação de PI-3K (fosfatidilinositol-3-kinase) desencadeia o processo (AHMAD et al., 1999). Os produtos lipídicos da ativação de PI-3K ( $PIP_3$  e  $PIP_2$ ) funcionam como segundos mensageiros, servindo de sítios de ligação de alta afinidade para o domínio PH da AKT (37, 38, 39). Esses produtos lipídicos transferem a AKT do citoplasma para a membrana plasmática, na qual a AKT é então ativada através da fosforilação de 2 sítios específicos: Treonina 309 e Serina 473 (FRANKE et al., 1997; FRECH et al., 1997; MARTE e DOWNWARD, 1997; STOKOE et al., 1997). A ativação completa da AKT é dependente da fosforilação desses 2 sítios (MEIER e HEMMINGS, 1999; VANHAESEBROECK e ALESSI, 2000).

Já está bem estabelecido que a fosforilação da Treonina 309 é catalisada pela PDK-1 (3'-fosfoinositol-proteína kinase dependente-1) (ALESSI et al., 1997a; STEPHENS et al., 1998). Entretanto, o mecanismo de fosforilação da Serina 473 permanece indefinido (ALESSI et al., 1997b).

O primeiro alvo anti-apoptótico da AKT descrito foi a proteína pró-apoptótica BAD (DATTA et al., 1997; DEL PESO et al., 1997). AKT fosforila BAD em Serina 136, promovendo a associação de BAD com proteínas no citosol, inativando sua função pró-apoptótica na membrana mitocondrial (DATTA et al., 1999). BAD é apenas a primeira entre outras proteínas alvos que já foram identificadas e daquelas que ainda estão sendo identificadas. Dentre as proteínas já comprovadas como alvo da atividade da AKT

encontram-se: Caspase-9, apenas em humanos (FUJITA et al., 1999); I $\kappa$ B Kinase- $\alpha$ , levando à ativação do fator nuclear- $\kappa$ B e de genes pró-sobrevivência dependentes desse fator, incluindo Bcl-X<sub>L</sub>, inibidores de caspases (BARKETT e GILMORE, 1999) e c-Myb (LAUDER et al., 2001); Membros da família “Forkhead” de fatores de transcrição, resultando na diminuição de transcrição de alguns genes envolvidos com morte celular (BRUNET et al., 1999; KOPS et al., 1999).

Em relação ao papel da AKT na proliferação celular, o primeiro substrato da AKT identificado foi GSK3 (CROSS et al., 1995), que além de estar associado com a regulação do metabolismo de glicose, também tem um papel na proliferação celular, ou seja, AKT inativa GSK3, aumentando a transcrição de genes envolvidos na progressão do ciclo celular (BLUME-JENSEN e HUNTER, 2001).

Todas essas evidências deixam a participação da proteína AKT visível como um importante regulador da sobrevivência, proliferação e metabolismo celular.

## ***OBJETIVOS***

---

1. Obtenção da sequência completa do RNAm do gene pertencente à família das forminas.
2. Análise da expressão do RNAm e da proteína, por ele codificada, em diferentes tecidos e linhagens celulares humanos.
3. Realização de estudos funcionais.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

---

## **Análise Computacional**

As ESTS foram selecionadas a partir das seqüências do banco de dados ORESTES (estas seqüências estão disponíveis no NCBI), classificadas como potenciais parálogos (*paralogs*) ou ortólogos (*non-human protein*), presentes em tumor de medula óssea e com similaridade aos genes da família da formina. Para obter as seqüências completas dos cDNAs das ESTs de interesse foi usado o pacote de algoritmos de busca BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) em diferentes bancos de dados disponíveis no mesmo endereço. Buscas no banco de dados Prosite foram realizadas no endereço <http://expasy.cbr.nrc.ca/tools>, usando a ferramenta de busca InterPro Scan. O programa de alinhamento sim4 (obtido no endereço <http://globin.cse.psu.edu>) foi usado para comparar seqüências de cDNA e DNA genômico com o objetivo de obter a estrutura exon-intron do novo gene. A ferramenta Protscale, disponível no endereço eletrônico [www.expasy.org](http://www.expasy.org), foi utilizada para o estudo da imunogenicidade de seqüências de peptídeos para produção de anticorpos contra a proteína FMNLI.

## **Extração do RNA total**

O RNA de células Jurkat foi isolado utilizando Trizol (Life Technologies, USA). O Trizol é um reagente que apresenta uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. A extração de RNA com esse reagente é uma adaptação do método desenvolvido por Chomczinski e Sacchi (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987). Ao *pellet* de células, contendo  $5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  células, foi acrescentado 1ml de Trizol e a amostra homogeneizada até que se tornasse bastante fluida. A purificação do RNA se deu segundo o protocolo do fabricante. A quantificação do RNA obtido foi realizada através da leitura de uma alíquota da amostra em espectrofotômetro com comprimento de onda equivalente a 260nm, considerando que 1DO à 260nm equivale a 40µg/mL de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas, e esse varia normalmente entre 1,6 e 1,8.

### **Tratamento do RNA total com DNase I**

O RNA total de células Jurkat foi tratado com DNase livre de RNase 1U/ $\mu$ L (Life Technologies), utilizando 1U da enzima para tratar 5 $\mu$ g de RNA por 15 minutos à temperatura ambiente, a fim de eliminar uma possível contaminação deste material com DNA genômico. A reação foi interrompida pela adição de uma solução de EDTA com concentração final de 2mM. A enzima foi subsequentemente inativada por uma incubação de 10 minutos a 65°C.

### **Transcrição em cDNA**

As amostras de RNA total, contendo 5 $\mu$ g de RNA e tratadas com DNase I, foram transcritas reversamente em cDNA (híbrido RNA-cDNA) numa reação de volume final de 20 $\mu$ l (Life Technologies). A reação é iniciada adicionando aos 5 $\mu$ g de RNA tratados 1  $\mu$ l de oligo (dT) 500  $\mu$ g/ml e 1 $\mu$ l da mistura (10mM) de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP). Essa mistura é aquecida por 5 minutos a 65°C, e em seguida incubada no gelo. Adicionou-se, então, 4 $\mu$ l do tampão de reação 5x, contendo 250mM Tris-HCl (pH 8,3), 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, e 0,1M DTT, e também adicionou-se 200U enzima transcriptase reversa SuperScript II, que catalisa a reação de extensão da fita complementar. Essa mistura foi incubada por 50 minutos à 42°C. A seguir, foi feita a desnaturação da reação por 15 minutos à 70°C e finalmente foram adicionadas 40 unidades de Rnase H e a solução incubada por 20 minutos à 37°C. As amostras de cDNA foram quantificadas através do espectrofotômetro de luz UV (Gene Quant-Pharmacia).

### **Reação em cadeia da polimerase-PCR**

As reações de transcrição reversa da polimerase (PCR) foram realizadas em termociclador automático (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT). As Aliquotas de cDNA (1 $\mu$ l) foram amplificadas numa reação de volume final de 50 $\mu$ l contendo 1mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 0,5 $\mu$ l de cada iniciador (20pmol), 5 $\mu$ l do tampão de reação 10x contendo 75mM Tris-HCl (pH 9.0), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 20mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 1.5U da enzima Taq polimerase (Gibco). As amostras

foram desnaturadas inicialmente por 5 minutos a 94° C e em seguida submetidas a 35 ciclos de amplificação com desnaturação, anelamento e extensão, seguidos de extensão final prolongada por 7 minutos. Os produtos do PCR foram separados em gel de agarose 1.5% e visualizados sob a luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio.

### **RACE (“rapid amplification of cDNA ends”)**

A técnica de RACE foi utilizada com o intuito de proceder à amplificação de seqüências de ácidos nucléicos a partir de um molde de RNAm, entre um sítio interno definido e seqüências desconhecidas na extremidade 3' e 5' do RNAm. Para o procedimento do RACE 5' (Life Technologies), a síntese da primeira fita do cDNA foi iniciada usando-se um oligonucleotídeo antisense específico para o gene em questão (GSP1) e a enzima SuperScript™II RT. Depois da síntese da primeira fita de cDNA, o molde de RNAm original foi removido por tratamento com a Rnase Mix, e o cDNA foi purificado de dNTPs e GSP1 não incorporados. TdT (*Terminal deoxynucleotidyl transferase*) e dCTP foram usados para adicionar uma cauda homopolimérica à extremidade 3' do cDNA. O cDNA com a cauda foi amplificado por PCR, usando-se Taq DNA polimerase, um iniciador específico para o gene (GSP2), que se anela num sítio localizado dentro da molécula de cDNA, a 3' do GSP1, e um iniciador provido pelo sistema, que permite a amplificação a partir da cauda homopolimérica.

No procedimento de RACE 3' (Life Technologies), a síntese da primeira fita do cDNA foi iniciada na cauda poli-A do RNAm, usando-se transcriptase reversa e um iniciador contendo oligo-dT. Posteriormente, o molde de RNAm original foi destruído com o uso da RNase H e a amplificação do cDNA foi, então, executada utilizando-se dois iniciadores: um iniciador específico para o gene (GSP), que se anela a uma região de seqüências de exons conhecidas e um iniciador que se liga à região da cauda poli-A.

### **Seqüenciamento**

A inclusão de novas seqüências aos transcritos foi confirmada experimentalmente por PCR a partir de cDNA da linhagem humana JURKAT. Esse cDNA foi obtido a partir

de transcrição reversa de RNAm usando o protocolo e os reagentes para síntese de cDNA descritos acima. Os produtos amplificados foram purificados, clonados e seqüenciados com o reagente Big Dye (Applied Biosystems) em um sequenciador automático ABIprism 310 ou 377 (Applied Biosystems). Os cromatogramas obtidos foram montados por meio do pacote de programas Phred/Phrap/Consed, gentilmente cedidos por David Gordon e Phil Green da Universidade de Washington. Mais informações sobre tais programas podem ser encontradas no site <http://www.phrap.org>. A figura 1 contém a seqüência de todos os iniciadores utilizados.

### **Northern Blotting Multi-tecidual**

Essa técnica foi realizada de acordo com as instruções do “Multiple Tissue Northern (MTN) Blot” (Clontech). Resumidamente, membranas prontas contendo RNAm de diferentes tecidos foram hibridizadas tanto com a sonda específica para *FMNLI* quanto com a sonda controle de  $\beta$ -actina fornecida pelo fabricante. A sonda de cDNA de *FMNLI*, utilizada nesta técnica, foi obtida a partir da amplificação do fragmento subclonado, utilizando-se iniciadores específicos do inserto (iniciadores 1 e 2). O fragmento amplificado, de aproximadamente 160pb, foi subclonado no vetor pCR2.1, de acordo com as instruções do “TOPO TA Cloning Kit” (Invitrogen). O “QIAprep Spin Miniprep Kit” (Qiagen) foi utilizado para isolar o DNA plasmidial. Em seguida, foi sequenciado o inserto no vetor pCR2.1 com os iniciadores universais T7 e M13 para confirmar a seqüência do inserto. Para a obtenção da sonda, foi realizada a amplificação do fragmento subclonado com os mesmos iniciadores próprios do inserto. Seguiu-se a purificação do gel de acordo com o protocolo da “QIAquick Gel Extraction Kit” (Quiagen), sendo que o purificado foi a seguir quantificado em gel com o marcador Low Mass DNA ladder (Life Technologies). 25ng de sonda purificada foram marcados radioativamente com  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP de acordo com o “Megaprime Labelling Kit” (Amersham) e utilizados na hibridização das membranas de Northern Blotting Multi-tecidual (Clontech). Após uma pré-hibridização de 30 minutos a 68°C, as membranas foram hibridizadas por 1 hora a 68°C em uma solução de hibridização fornecida pelo *kit* acrescida da sonda de cDNA marcada radioativamente apresentando uma contagem no intervalo de  $1-2 \times 10^6$  cpm/ml e uma atividade específica maior que  $1 \times$

10<sup>9</sup>cpm/ug. Após a lavagem para remoção de excesso de sonda marcada, as membranas foram expostas em uma tela de *phosphorimaging* e reveladas no Storm Phosphorimager (Molecular Dynamics).

### **Produção do anticorpo anti-FMNL1**

Através da ferramenta Protscale disponível no endereço eletrônico [www.expasy.org](http://www.expasy.org), foi escolhida uma sequência de 16 aminoácidos, com capacidade antigênica: LIYESDRDGAIEDIIT. A escolha do peptídeo é baseada em sua imunogenicidade e podem-se utilizar vários parâmetros para fazer essa predição através da ferramenta Protsacale. No entanto, a escolha de dois parâmetros já é suficiente para que todos os outros corroborem com o peptídeo escolhido. Nesse caso, foi utilizado o caráter hidrófobo de Kyte e Doolittle (KYTE e DOOLITTLE, 1982) e a predição da estrutura secundária  $\beta$ -turn de Chou e Fasman (CHOU e FASMAN, 1979). No primeiro parâmetro, quanto menos hidrófobo o peptídeo, mais imunogênico. Já no segundo parâmetro, quanto maior a probabilidade do peptídeo apresentar uma  $\beta$ -turn, maior a probabilidade de ser imunogênico. Assim, os parâmetros descritos acima revelaram que uma das seqüências de peptídeos escolhida pela sua imunogenicidade, era a mesma seqüência usada pelo grupo que descreveu a proteína ortóloga em camundongos (YAYOSHI-YAMAMOTO et al., 2000), e que gentilmente cedeu uma alíquota para teste do anticorpo policlonal produzido em coelhos. Posteriormente, utilizando-se da mesma seqüência de peptídeos, um novo lote do anticorpo policlonal produzido em coelhos foi desenvolvido pela empresa Bethyl, Texas, USA.

### **Tecidos humanos normais**

Os tecidos humanos normais como rim, baço, cérebro, estômago, coração, intestino delgado, músculo esquelético, fígado, pulmão e linfonodo foram obtidos de autópsias no Hospital das Clínicas da UNICAMP, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

### **Linhagens celulares**

Linhagens celulares humanas Jurkat, MOLT-4, K562, U-937, NB4, HL60 e 293 foram adquiradas pelo ATCC, Philadelphia, USA.

### **Células mononucleares de sangue periférico**

As células mononucleares foram obtidas de sangue periférico, através de um gradiente de separação, Ficoll-Hypaque. O sangue periférico foi retirado de doadores de sangue ou de pacientes com LLC B do Hemocentro, da Unicamp, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

### **Subpopulações de linfócitos**

Os linfócitos foram isolados de quatro tonsilas palatinas de indivíduos adultos com tonsilite crônica, obtidos no Departamento de Hematologia, do Hospital Clinic, em Barcelona, Espanha. Após a desagregação celular, as células foram isoladas pelo gradiente de Ficoll-Hypaque. A separação das células CD19<sup>+</sup> (linfócitos B) foi realizada com anticorpos anti-CD19Fluorescein Isothiocyanate (FITC) e pérolas magnéticas anti-FITC. Essa suspensão celular, com os anticorpos e pérolas magnéticas, foram submetidas a uma coluna magnética. Dessa maneira, as células CD19<sup>+</sup> foram separadas das células CD19<sup>-</sup>. As células CD19<sup>+</sup> foram submetidas à outra separação: anticorpos anti CD27Phycoeritrine (PE) e pérolas magnéticas anti-PE. Da mesma maneira, essa suspensão celular com os anticorpos e pérolas magnéticas, foram submetidas à coluna magnética para a separação das populações: CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>. Em seguida, essas subpopulações foram submetidas ao processo de extração de proteína e ao gel de poliacrilamida-SDS-PAGE, como descrito no item *Western Blotting*.

### **LNH e linfonodos reacionais**

Tecidos congelados de LNH e linfonodos reacionais foram obtidos no Departamento de Patologia, no Hospital Purpan, Toulouse, França. Todos os diagnósticos

foram confirmados por imunohistoquímica e classificados de acordo com a classificação REAL, de acordo com “The International Non-Hodgkin’s Lymphoma Prognostic Factors Project” (1993). 54 pacientes foram estudados, com idade entre 28 e 93 anos (mediana de 57 anos). Os tipos histológicos foram: 22 LNH foliculares, 15 LNH difusos de grandes células B, 17 LNH T (*non-otherwise specified*) e 5 linfonodos reacionais. Os blocos congelados dos linfomas, mantidos à  $-80^{\circ}\text{C}$ , foram cortados em fatias de 3 a 5 micras, num total de 30 a 40 fatias e colocadas em *eppendorfs*. Esse material, sempre conservado no gelo, foi submetido ao processo de extração de proteína como descrito no item *Western blotting*.

### Teste estatístico

A comparação dos valores da intensidade de expressão de FMNL1, entre os diferentes grupos de LNH e linfonodos reacionais, como também entre os grupos de pacientes com LLC e indivíduos normais, foi realizada através do teste estatístico Mann Whitney. Valor de  $P \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### Western Blotting

Ao *pellet* celular contendo  $5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  células foi acrescentado tampão de extração de proteínas contendo 100 mM Tris (pH 7.6), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 0.1 mg Aprotinina, 35 mg PMSF/ml, 10 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 100mM NaF, 10mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , e 4 mM EDTA. As amostras foram homogeneizadas até que se tornassem bastante fluidas. Após 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , essas amostras passaram por um processo de centrifugação a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos para remoção dos restos celulares. Aliquotas com mesma concentração protéica foram usadas para produção do extrato total proteico, ou para imunoprecipitação. Para produção do extrato total proteico, adicionou-se às aliquotas tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditiotreitol e aqueceu-se em água fervente por 4 minutos. Após isso, as amostras foram submetidas à eletroforese, ou armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para produção de imunoprecitado, adicionou-se às aliquotas o anticorpo anti-FMNL1 ou anticorpo de interesse e proteína A-Sepharose 6MB. Ao término da lavagem, os *pellets* foram

ressuspendidos em tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditiotreitol e aquecidas em água fervente por 4 minutos. Em seguida, as proteínas imunoprecipitadas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 8%-SDS-PAGE em aparelho de eletroforese Bio-Rad miniature lab gel apparatus (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 90 min a 120 V (constante) em aparelho miniaturizado de transferência da Bio-Rad. A ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 1 hora com tampão de bloqueio (5% leite em pó magro, 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, and 0.02% Tween 20) a 4°C. A membrana de nitrocelulose foi então incubada com anticorpos específicos diluídos em tampão de bloqueio (0.3% de leite em pó magro) por 12 horas à 4°C e então lavadas 3 vezes com solução basal (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, and 0.02% Tween 20). Os anticorpos utilizados foram: anti-actina, anti-tubulina, anti-histona, anti-AKT, anti-PI-3K, anti-p70S6K, anti-mTOR, anti-Mdm2, anti-Bad, anti-HA, anti-GFP, anti-caspase 8, anti-caspase 3 (Santa Cruz, USA) e p-AKT (Cell Signaling, USA). O sistema de revelação usado foi o baseado em quimioluminescência, de acordo com as instruções no kit ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Em suma, as membranas eram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário, conjugado à HRP (*Horseradish peroxidase*) e então lavadas novamente, e submetidas ao substrato da enzima, resultando num produto luminescente, detectado por auto-radiografias em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY).

### **Microscopia confocal**

As células foram aderidas às lamínulas pré-tratadas com poli-L-lisina, e fixadas com uma solução de paraformaldeído. Em seguida, foram feitos o bloqueio e a permeabilização das células com uma solução com 3% de caseína e 0,6% de triton. O anticorpo primário anti-FMNL1 foi diluído a 10µg/ml em solução 1% de caseína e incubado com as células *overnight* em câmara úmida à 4°C. Após 3 lavagens com PBS, seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário marcado com Alexa488 por 2 horas à temperatura ambiente. Depois de 3 lavagens, as células foram tratadas com RNase e foram incubadas com o Iodeto de propídio, para marcar especificamente o DNA, por 5 minutos à temperatura ambiente. Em

todos os experimentos foram feitos controles negativos, somente com anticorpo-secundário, os quais não apresentaram fluorescência. Após a marcação das células nas lamínulas, as mesmas foram montadas utilizando-se Vectashield e acondicionadas a 4°C, no escuro. Essas foram analisadas por escaneamento a laser em um LSM-510 montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando a objetiva de 63x de imersão em água.

### **Extração de proteínas citoplasmáticas e nucleares**

Aproximadamente  $5 \times 10^7$  células foram lavadas com tampão PBS 0,1M, pH 7,4, e ressuspensas com tampão hipotônico (10mM Hepes pH 7,9; 1,4 mM  $MgCl_2$ ; 10mM KCl) acrescido de inibidores de proteases. As células foram incubadas nesse tampão por 10 minutos à 4°C. Em seguida, essas células foram submetidas ao rompimento da membrana celular através de uma constante homogeneização, com a ajuda de um homogeneizador pré-resfriado, as quais foram submetidas à centrifugação para coleta da fração citoplasmática no sobrenadante. O *pellet* celular foi lavado com um tampão de baixa concentração de sal (20mM Hepes pH 7,9; 25% Glicerol; 1,5mM  $MgCl_2$ ; 20 mM KCl; 0,2 mM EDTA) e então ressuspendido em um tampão de alta concentração de sal (20mM Hepes pH 7,9; 25% Glicerol; 1,5mM  $MgCl_2$ ; 1M KCl; 0,2 mM EDTA). Essa suspensão foi incubada, à 4°C por 30 minutos, em agitação, e em seguida centrifugada. O sobrenadante contém a fração nuclear. Tanto a fração citoplasmática quanto a nuclear foi submetida ao gel de poliacrilamida com SDS.

### **Construção dos vetores**

Os produtos resultantes das PCRs, com as construções de interesse, ou seja, os domínios FH2 e FH3, foram inseridos direcionalmente no vetor de expressão em eucariotos pEGFP-C3 (Clontech), com sequência peptídica de *green fluorescent protein* (tag de GFP) através da digestão com as enzimas de restrição Bam HI e Hind III (para ambas construções), seguidos de ligação com *T4 DNA ligase* (Invitrogen). Estas reações de ligação foram usadas para transformar células DH5 $\alpha$  quimicamente competentes para armazenamento e triagem. Os sequenciamentos das minipreps dos vetores com as

construções demonstraram que as construções estavam inseridas no vetor de expressão com o quadro aberto de leitura correto, possibilitando a expressão dos domínios em questão. O vetor pCMV5.HA.AKT, com sequência peptídica de Hemaglutinina (*tag* de HA) e contendo o cDNA completo da *AKT*, foi gentilmente doado pelo Dr. Brian Hemmings (Division of Sports Studies, University College Northampton, UK).

### **Transfecções**

Os estudos de cotransfecção *in vitro* das construções foram realizados na linhagem celular 293, de acordo com protocolo padronizado da Lipofectamina (Invitrogen Life technologies). Resumidamente,  $3 \times 10^6$  células foram plaqueadas em placas de 10 cm no dia precedente a transfecção. No dia da transfecção, as células foram lavadas e a cada placa foram adicionados 10 µg da construção do vetor com 25 µl de lipofectamina com meio de cultura sem soro fetal bovino e sem antibiótico. Após 12 horas de incubação, foi adicionado às células meio de cultura completo. A coleta foi feita após 48 horas de incubação.

### **Indução à apoptose**

Tanto células Jurkat quanto KG1a, à concentração de  $1 \times 10^6$  células/ml, foram usadas para o ensaio. As células Jurkat foram tratadas com 0,45ng/ml de FasL e coletadas nos tempos: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 90 minutos. As células KG1a foram tratadas com diferentes concentrações de mitramicina: 100, 300 e 500 nM e coletadas em dois tempos: 24 e 48 horas. As células, após a coleta, eram processadas para extração de proteína total e submetidas à análise da expressão de FMNL1 por *Western Blotting*.

## ***RESULTADOS***

---

## **1. Obtenção da sequência completa do RNAm da nova formina humana**

Através do banco de dados ORESTES, gerado pelo Projeto Genoma do Câncer Humano (DIAS NETO et al., 2000), foram encontradas duas ESTs que se sobrepunham, IL5-MT0208-210201-356-f01 (número de acesso no GenBank BI028593), com 314bp, e IL5-MT0208-210201-345-f02 (número de acesso no GenBank BI08488), com 525bp, ambas isoladas de tumor de medula óssea, com similaridade à família das forminas.

Com o intuito de obter a sequência completa deste RNAm, foram realizadas buscas no banco de dados genômico do NCBI, pesquisando sequências idênticas, porém maiores que 525bp, que pudessem ser usadas como moldes para o desenho de iniciadores para a confirmação da extensão. A inclusão das sequências, obtidas no banco de dados do NCBI, levou à montagem de uma sequência predita. Essa sequência predita foi idêntica a uma sequência de cDNA humano parcial, chamado de KW-13 (número de acesso no GeneBank AF432213) (KRACKHARDT et al., 2002). Para confirmar experimentalmente essa predição, feita pela análise computacional, PCRs, a partir de cDNA da linhagem celular Jurkat, e seqüenciamentos foram realizados usando vários iniciadores (Figura 1). Todos os produtos amplificados foram subclonados e seqüenciados. Para se chegar à sequência completa desse novo gene, as extremidades 5' e 3' foram amplificadas e seqüenciadas. Para isso, as técnicas de RACE 3' e 5' foram usadas, e novos iniciadores para tal foram construídos (Figura 2). O RACE 3' revelou que a extremidade final da sequência do novo cDNA já estava completa, faltando apenas a inserção da cauda poli A. Já a técnica do RACE 5', possibilitou adicionar mais 180bp na porção 5' da sequência, permitindo novas buscas no portal NCBI. Desse modo, uma nova EST de 1111bp (GenBank BQ926591) foi encontrada, similar à região 5' da sequência estendida, e usada como molde para novos iniciados do RACE 5'. Finalmente, o seqüenciamento da porção 5' do novo cDNA em questão foi completado.

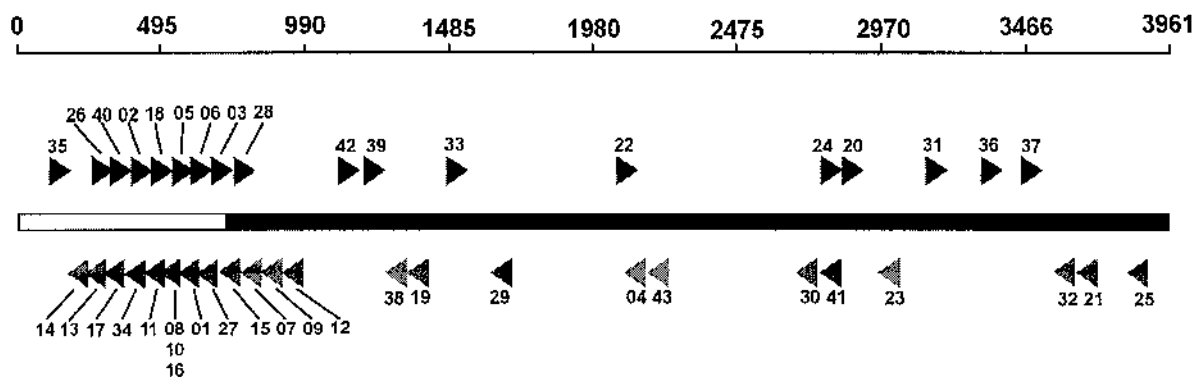


Figura 2: Representação esquemática dos iniciadores desenhados para confirmar a sequência predita do cDNA de FMNL1 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 43) e obter as porções 5' e 3' pelo método RACE (RACE 5': 7 ao 17; RACE 3': 36, 37). Iniciadores 1 e 2 foram usados para produção da sonda para Northern Blotting. A sequência KW13 (número de acesso no GenBank No. AF432213) é representada pelo retângulo preto e a porção 5' obtida pelo RACE 5' é representada pelo retângulo aberto.

O novo cDNA completo de 3959pb sem a cauda poli-A, apresenta um quadro aberto de leitura de 3302bp, com códon de iniciação no nucleotídeo 202, de acordo com Kozak (KOZAK, 1999) (G na posição +4 e um A na posição -3), resultando numa proteína de 1100 aminoácidos. Um sinal de poliadenilação pode ser identificado 9 aminoácidos antes da cauda poli A (Figura 3). A análise computacional mostrou que esse novo gene encontra-se no braço longo do cromossomo 17 (banda 17q21.31), e através do programa Sim4 (FLOREA et al., 1998), observou-se que o gene compreende uma região de pelo menos 30kb, com 27 exons (Figura 3).



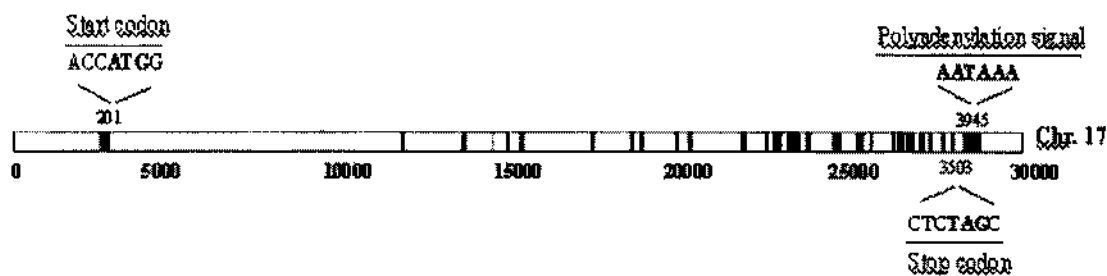


Figura 3: Esquema da organização dos exons e introns de *FMNLI*. Os retângulos em preto representam os exons, e em aberto, os introns, distribuídos ao longo do cromossomo 17 (banda 17q2131).

A análise da proteína predita através do portal NCBI (Protein-Blast), revelou uma proteína ortóloga em camundongo, descrita como “formin-related gene in leukocytes (FRL)” (YAYOSHI-YAMAMOTO et al., 2000). A nova proteína apresenta os domínios característicos da família das forminas: FH1, FH2 e FH3 (Figura 4A), sendo que os domínios FH1, FH2 e FH3 apresentam mais de 80% de identidade com a proteína ortóloga de camundongo (Figura 4B).

**A**

MGNAAGSAEQFAGFAAPFPKQPAPPKQPMFAAGELERFNRALNCMNLPDDKVQLLSQYDNEKKWE  
 LICDQERFQVKNPPAAYIQKLKSYVDITGGVSRKVAADWMSNLGFKRRVQESTQVLRELETSLRTNH  
 IGWVQEFLEENRGLDVLLEYLAFACQSVTYDMESTDNGASNSEKPKLEQSVEDLSKGPPSSVVK  
 SRHLTIKLTPAHSRKALRNSRIVSQKDDVHVCINCLRAIMNYQSGFSLVMNHPACVNEIALSLNNK  
 NPRTKALVLELLAAVCLVRGGHDIILAAFDNFEVCGEQHREKLMYFRNEDSNIDFMVACMOFI  
 NIVVHSEVENMFRFVLOYEETHLGLDLYLERLERLTESDKLOVOIOAYLDNIFDVGALLEDTETKNA  
 VLEHMEELQEQQVALLTERLRDAENESMAKIAELEKQLSQARKELETLRERFSESTAMGASRRPPEP  
 EKAPPAAPTRPSALELKVEELEKGLIRILRGPDAVSI EILPVAVATPSGGDAPTEGVPTGSPSP  
 DLAFAPAPGAPGAPPPPPPLRGLPSEFOEAPPSAPPOAPPELPGSPPEPPAPPLPGDLPPPPPPPPPP  
 PGTDGPEVPPPPPPPPPPPPGGPPDALGRDSELGPGVKAKKPIQTKFRMPLLNWVALKPSQITGTVF  
 TELNLENVLQELDMSDFEEQFKTKSQGSPSLDSALKSKAAQKAPSKATLIEANKAKNLAITLRKGN  
 LGAERICQAI EAYDLQALGLDFLELLMRLEFTEYERSLITRFEREQRPMEELSEEDREMLCFSPRI  
 PLPERMTTLTFLGNFPPTAQOLLPOLNATIAASMSIKSSDKLQILEIVLAFGNMNSKRGAAAYG  
 ERLQSLDALLEMKSTDRKQTLHLVYKVIKAEKYEQLTGHEHDLHFLDRAGSVSLDSVLAVRSLOP  
 GLELTQREFVRQDDCMVLKEFLRANSPTMDKLLADSRTAQEAFESVVEYFGENPKTTSPLGFFSLF  
 SRFIKAYKKAQEVEQWKKEAAAQEAGADTFGKGEPAPKSPPKARRPQMDLISELKRROQKEELI  
 VESDRDGAIEDIITVIKTVPFTARTGKRTSPLLCEASLGEEMPL

**B**

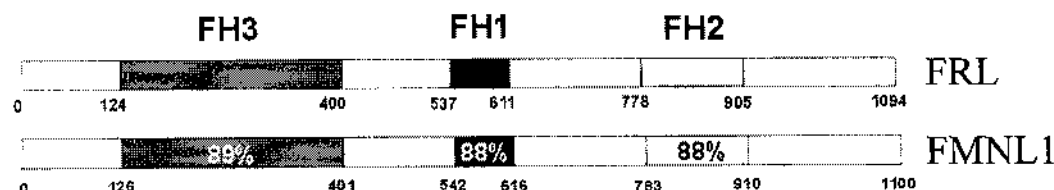


Figura 4: Estrutura protéica de FMNL1 e FRL. (A) Sequência de aminoácidos predita de FMNL1. O domínio FH1 é indicado por uma linha grossa e FH2 por uma linha pontilhada. FH3 está indicado por uma linha fina. A sequência de aminoácidos usada para a produção do anticorpo policlonal está representada no retângulo aberto. (B) Representação esquemática das proteínas FMNL1 e FRL. A homologia entre os domínios foi calculada pela razão entre o número de aminoácidos idênticos de FRL pelo número de aminoácidos correspondentes de FMNL1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). A posição do primeiro e último aminoácido é mostrada em cada domínio.

O novo cDNA foi depositado no banco de dados do portal NCBI, com o nome de Formina Leucocitária Humana (número de acesso AY278319). Posteriormente, baseando-

Committee HUGO (POVEY et al., 2001), o nome *formin-like 1* e a sigla *FMNL1* será a usada para se referir a Formina Leucocitária Humana.

## **2. Análise da expressão do RNAm de *FMNL1* em diferentes tecidos e linhagens celulares humanos, através da técnica de *Northern Blotting***

A sonda utilizada nessa técnica está localizada no exon 5 do cDNA. Embora uma isoforma do gene *FMNL1 in silico*, sem 100bp (KATOH, 2003), referente ao 26º exon, tenha sido descrita, a sonda usada para essa técnica revelou uma banda de 4,4kb.

A maior expressão do RNAm em tecidos normais foi detectada em leucócitos de sangue periférico, e expressões menores do RNAm foram detectadas em timo, baço, placenta e pulmão. Outros tecidos normais como músculo esquelético, útero, cólon, intestino delgado, bexiga, coração, estômago, próstata, cérebro e rim não apresentaram expressão. Dentre as linhagens de células neoplásicas, observou-se preferencialmente a expressão em MOLT-4, uma leucemia linfoblástica de célula T. Já nas outras linhagens, HL-60, HeLa S3, K-562, linfoma de Burkitt, adenocarcinoma colorretal (SW480) e carcinoma de pulmão (A549), a expressão foi menor (Figura 5). Em todas as membranas foi estudada a expressão do RNAm de  $\beta$ -actina como controle.

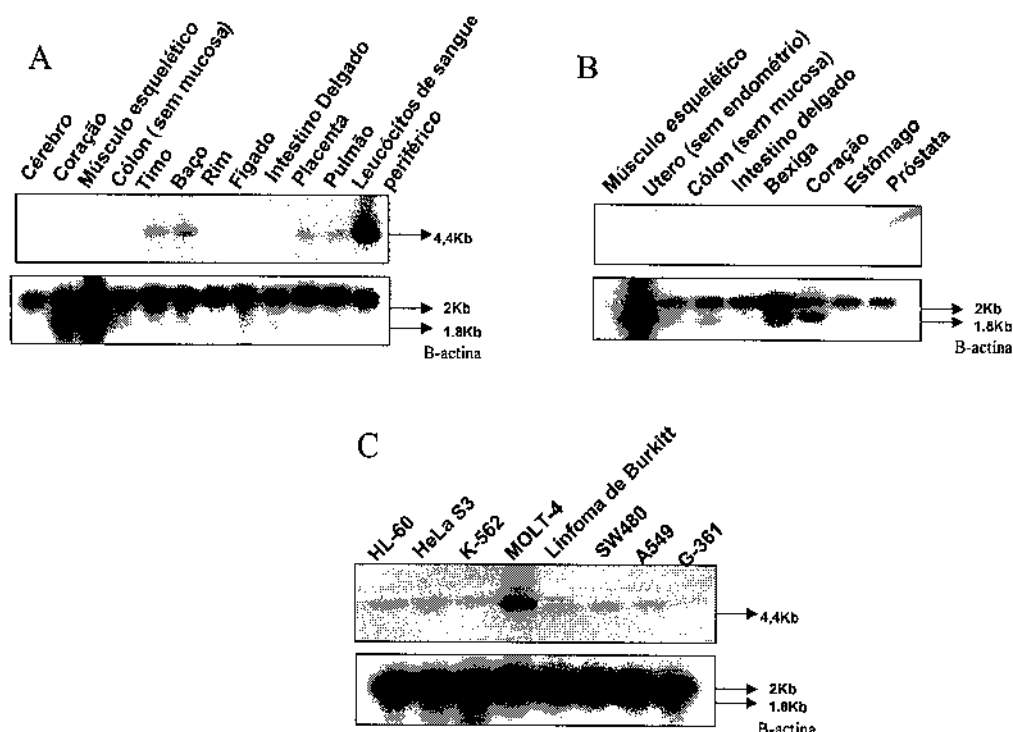


Figura 5: *Northern Blotting* multi-tecidual do RNAm de *FMNL1* em tecidos humanos normais (A e B) e em linhagens neoplásicas (C). Como controle da quantidade de RNAm na membrana, uma sonda de  $\beta$ -actina foi usada.

### 3. Análise da expressão da proteína FMNL1 em diferentes tecidos humanos e linhagens celulares neoplásicas, através da técnica de Western Blotting

A proteína FMNL1 é caracterizada na técnica de *Western Blotting* por uma banda de 160KDa. Em relação aos tecidos normais analisados, foi observada fraca expressão da proteína FMNL1 em linfonodo e em células mononucleares de sangue periférico normal. Os outros tecidos normais estudados como rim, baço, cérebro, estômago, coração, intestino delgado, músculo esquelético, fígado e pulmão não apresentaram expressão para a proteína em questão (Figura 6A). No painel de linhagens celulares humanas neoplásicas, a expressão foi maior em Jurkat, uma leucemia linfóide aguda de células T, enquanto que nas linhagens mielóides K562, U-937, NB4 e HL60 a expressão foi menor (Figura 6B).

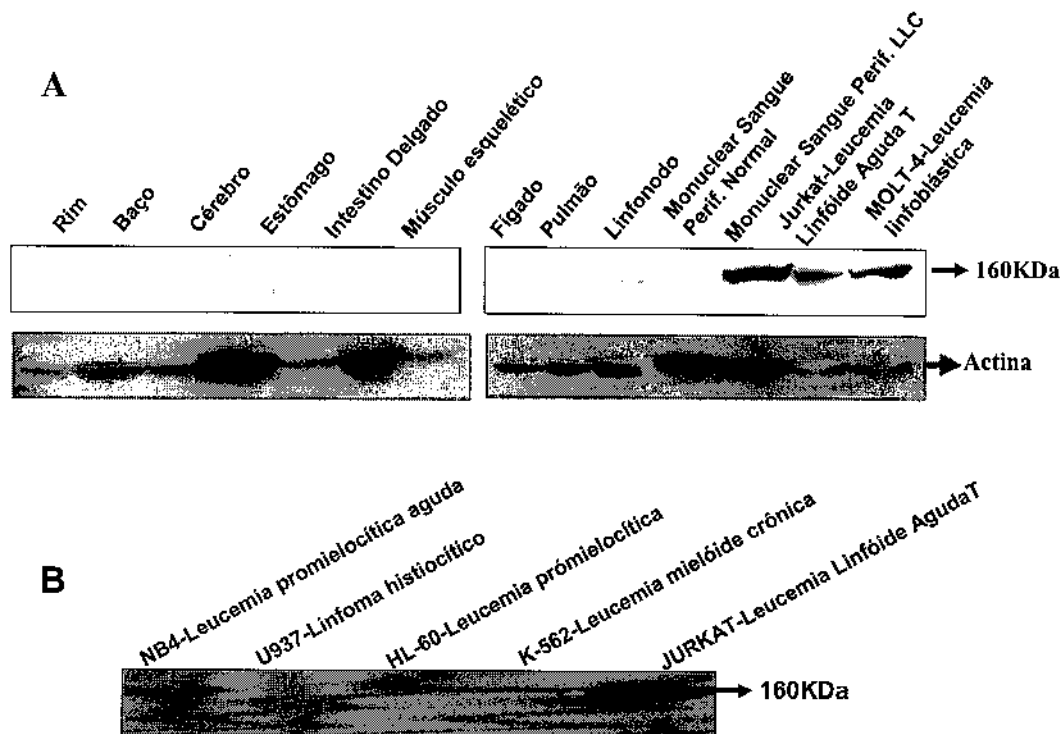


Figura 6: Análise por *Western Blotting* da expressão da proteína FMNL1 em diferentes tecidos humanos (A) e diferentes linhagens neoplásicas humanas (B). Como controle da quantidade de amostra aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-actina.

Em células mononucleares de sangue periférico de 20 pacientes com LLC a expressão foi maior quando comparada com células mononucleares de sangue periférico de 10 indivíduos normais (LLC vs Normais  $p=0,034$ ; teste Mann Whitney) (Figura 7).

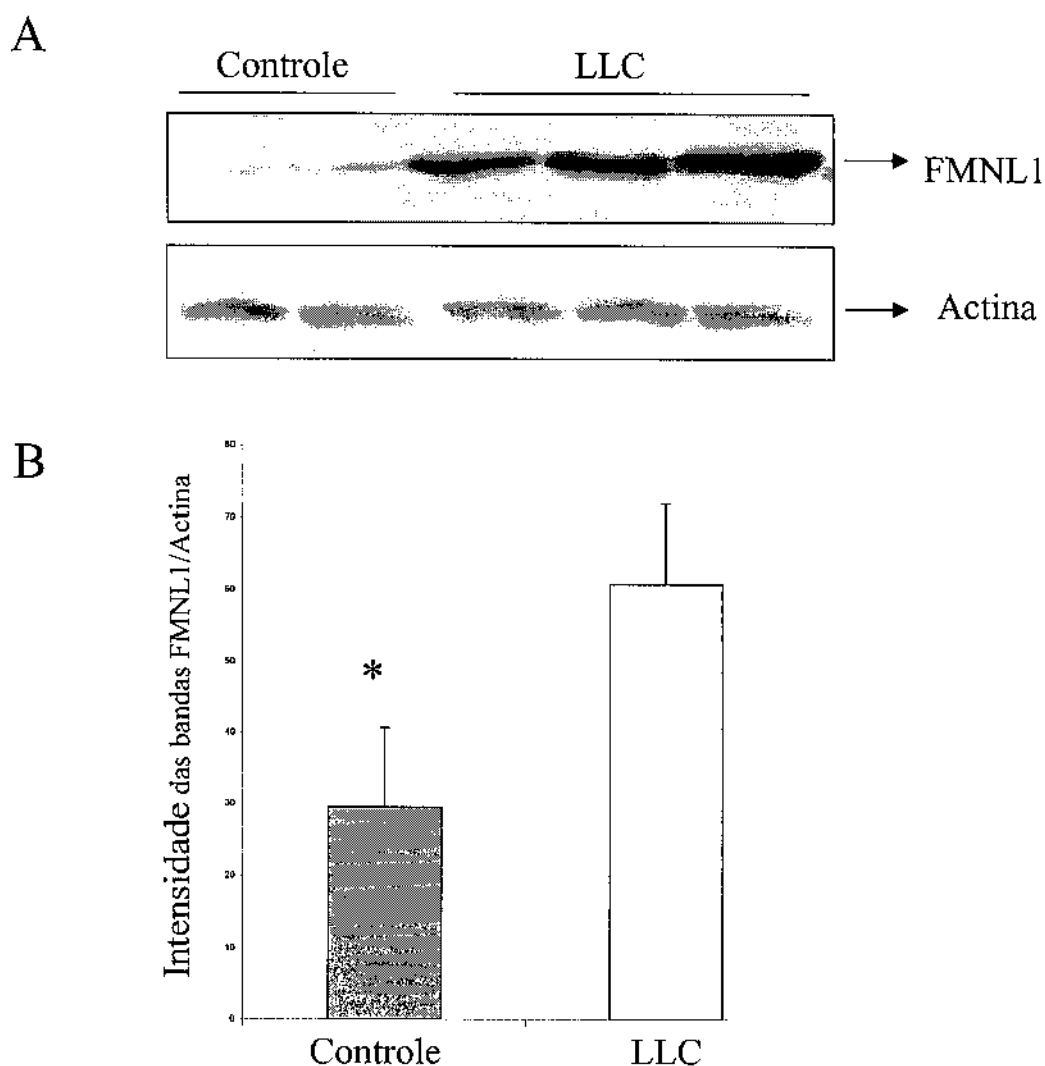


Figura 7: Análise por *Western Blotting* da expressão da proteína FMNL1 em células mononucleares de sangue periférico de 20 pacientes com LLC e de 10 indivíduos normais (A). Quantificação da intensidade das bandas de FMNL1, corrigida pela expressão de actina, através do programa ImageJ (B). \*  $p < 0,05$

#### 4. FMNL1 apresenta maior expressão em células normais CD19<sup>-</sup> e em subpopulações de CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>

Linfócitos foram isolados de quatro tonsilas palatinas de indivíduos adultos com tonsilite crônica. Após a separação das populações CD19<sup>+</sup> e CD19<sup>-</sup>, as células foram

submetidas à extração protéica e eletroforese em gel de poliacrilamida para o estudo da expressão da FMNL1. Como mostrado na Figura 8, as células CD19<sup>-</sup> apresentaram expressão maior de FMNL1 que os linfócitos B (CD19<sup>+</sup>), com exceção de uma amostra, na qual a expressão foi baixa para ambas as populações.

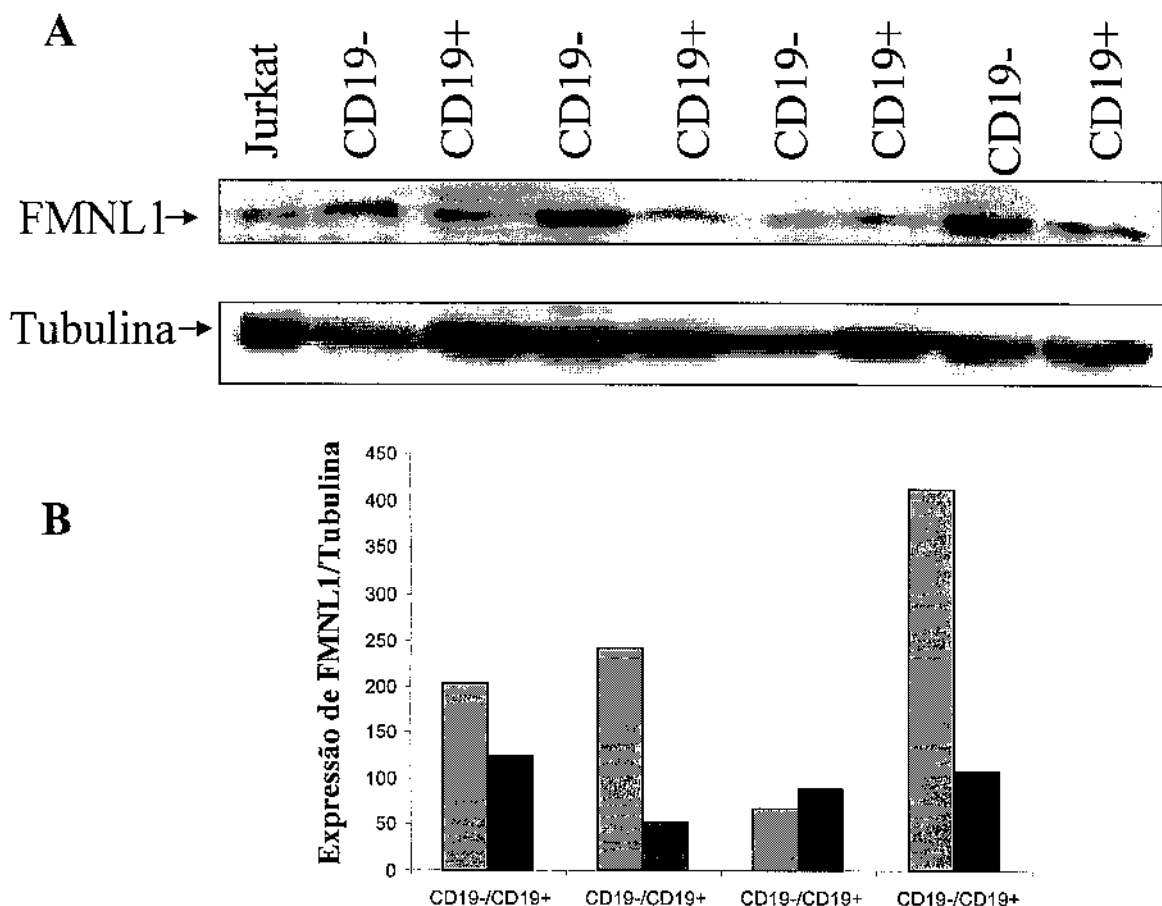


Figura 8: (A) Análise por *Western Blotting* da expressão de FMNL1 em populações de células CD19<sup>+</sup> e CD19<sup>-</sup> de quatro tonsilas palatinas de indivíduos adultos com tonsilite crônica. Células Jurkat foram usadas como controle positivo para expressão de FMNL1. Como controle da quantidade de amostra aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-tubulina. (B) Análise densitométrica das bandas obtidas no *Western Blotting*, através do programa LAS 3000, Analysis Image Gauge (Fuji film). A expressão de FMNL1 foi normalizada pela expressão de tubulina.

Além disso, a população de CD19<sup>+</sup> foi submetida a outra separação: CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>

(linfócitos B de memória) e  $CD19^+/CD27^-$  (linfócitos B *naive*). O antígeno CD27 é expresso nas células B após estimulação antigênica, e é importante para promover a diferenciação das células B (AGEMATSU et al., 1998; KOBATA et al., 1995; NAGUMO et al., 1998). Células B  $CD27^+$  acumulam um número substancial de mutações somáticas nos genes da região variável, diferentemente das células B  $CD27^-$ , as quais apresentam baixos níveis de mutação. Assim, células B  $CD27^-$  e células B  $CD27^+$  são consideradas respectivamente células *naive* e células de memória (AGEMATSU et al., 2000). Na Figura 9, as células B de memória apresentaram expressão maior da proteína FMNL1, quando comparada com as células B *naive*. A densitometria das bandas de *Western Blotting* foi quantificada pelo programa LAS 3000, Analysis Image Gauge (Figuras 8B e 9B) e como controle da quantidade de proteína aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-tubulina.

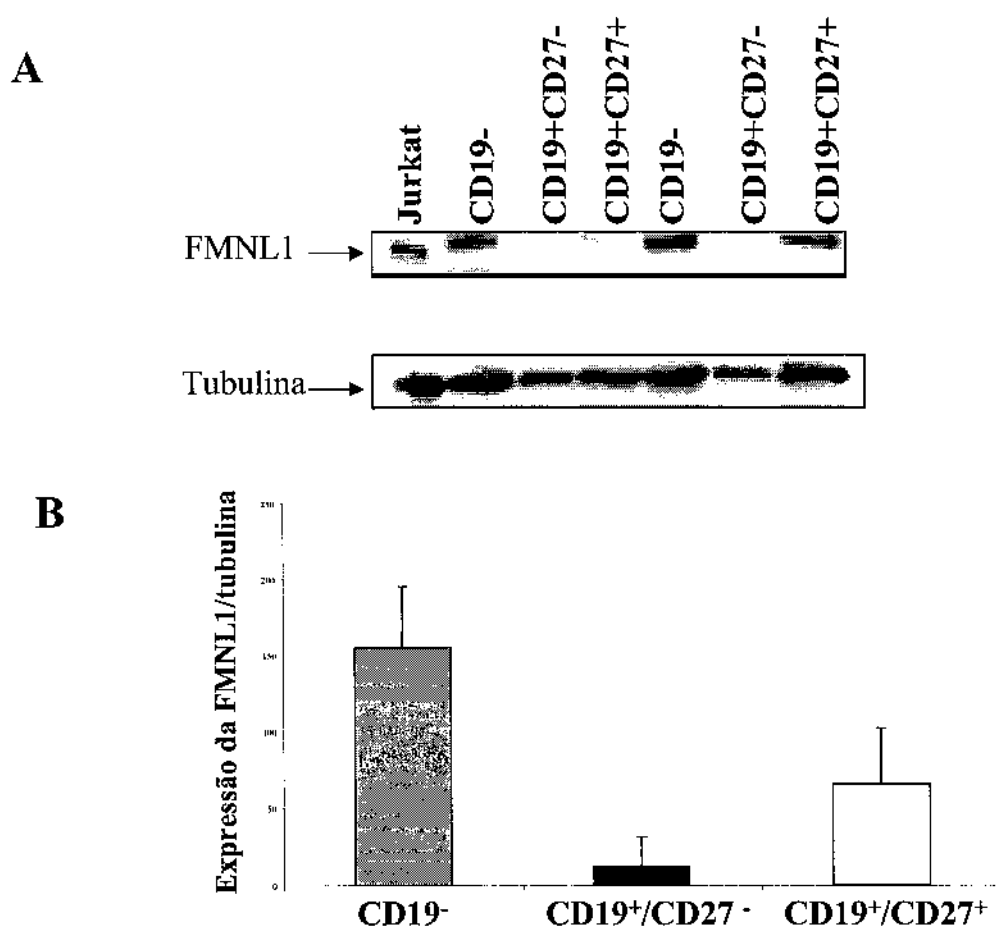


Figura 9: Análise por *Western Blotting* da expressão de FMNL1 em populações de linfócitos  $CD19^+/CD27^+$  e  $CD19^+/CD27^-$  de quatro tonsilas palatinas de indivíduos adultos

de FMNL1. Como controle da quantidade de amostra aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-tubulina. (B) Análise densitométrica das bandas obtidas no *Western Blotting*, através do programa LAS 3000, Analysis Image Gauge (Fuji film). A expressão de FMNL1 é normalizada pela expressão de tubulina.

#### **5. A expressão da proteína FMNL1 é maior em LNH T quando comparada a outros LNH e linfonodos reacionais**

Biópsias congeladas de pacientes com LNH foram usadas para obter extrato protéico para o estudo da expressão da proteína FMNL1 pela técnica de *Western Blotting*. Foram incluídos no estudo as seguintes amostras: 22 LNH foliculares, 15 LNH difusos de grandes células B, 17 LNH T (*non-otherwise specified*) e 5 linfonodos reacionais. Foi observada expressão preferencial nos LNH em relação aos linfonodos reacionais, sendo o LNH-T com expressão significativamente maior (LNH T vs linfonodo reacional,  $p=0.002$ ; LNH T vs LNH folicular,  $p=0.001$ ; LNH T vs LNH difuso,  $p=0.012$ ; teste Mann Whitney) (Figura 10). A densidade das bandas de *Western Blotting* foi quantificada pelo programa ImageJ e como controle da quantidade de proteína aplicada no gel, incubamos a mesma membrana com anticorpo anti-actina.

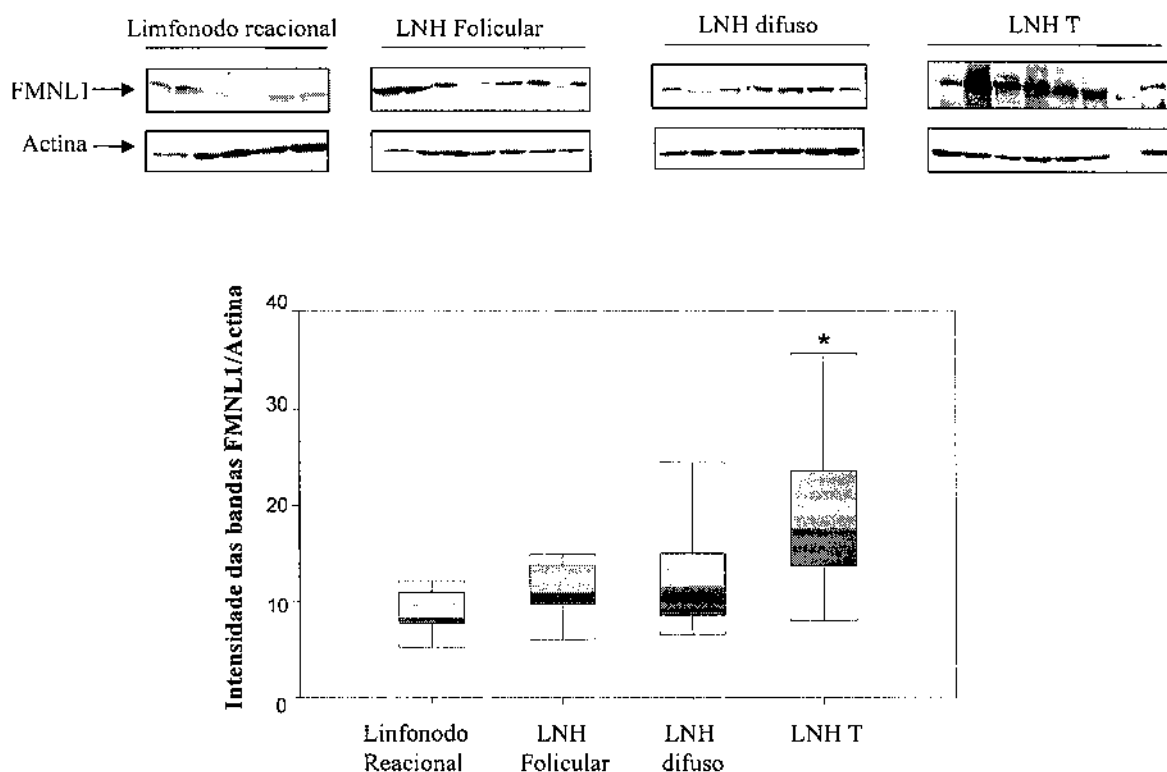


Figura 10: Análise por *Western Blotting* da expressão de FMNL1 em diferentes amostras de LNH e linfonodos reacionais. O gráfico é um Box-and-Wisker da intensidade das bandas, obtida através do programa ImageJ, no qual foi feita a correção da quantidade de amostra aplicada no gel através da banda correspondente da expressão de actina. \* $p < 0,05$  LNH T vs outros grupos.

#### 6. FMNL1 localiza-se no citoplasma de células Jurkat e de células mononucleares de sangue periférico através da microscopia confocal

Células Jurkat e mononucleares de sangue periférico de indivíduos normais foram submetidas à microscopia confocal. Para essa técnica, o núcleo das células foi marcado com Iodeto de propídio, e visualizado em vermelho. A proteína FMNL1 é visualizada em verde, e na Figura 11 é observado um padrão citoplasmático de localização.

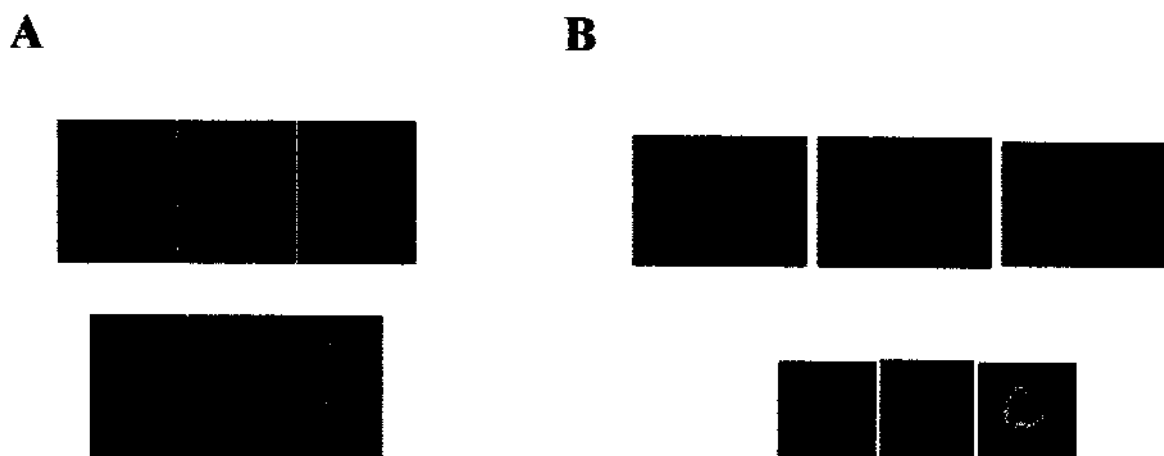


Figura 11: Imunolocalização fluorescente de FMNL1. (A) Células mononucleares de sangue periférico de um indivíduo normal. (B) Células Jurkat. O núcleo celular é mostrado em vermelho, pela marcação específica do DNA com Iodeto de Propídio. FMNL1 está localizada no citoplasma e é visualizada na cor verde.

#### 7. **FMNL1 é expressa no citoplasma de células Jurkat e de células mononucleares de sangue periférico através da técnica de separação de frações celulares**

A Figura 12 mostra que a FMNL1 é expressa no citoplasma da linhagem celular Jurkat, de células mononucleares de sangue periférico de um indivíduo normal e de um paciente com LLC. Para a confirmação da eficiência da separação das frações, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-actina, presente apenas no citoplasma e anti-histona, encontrada somente no núcleo.

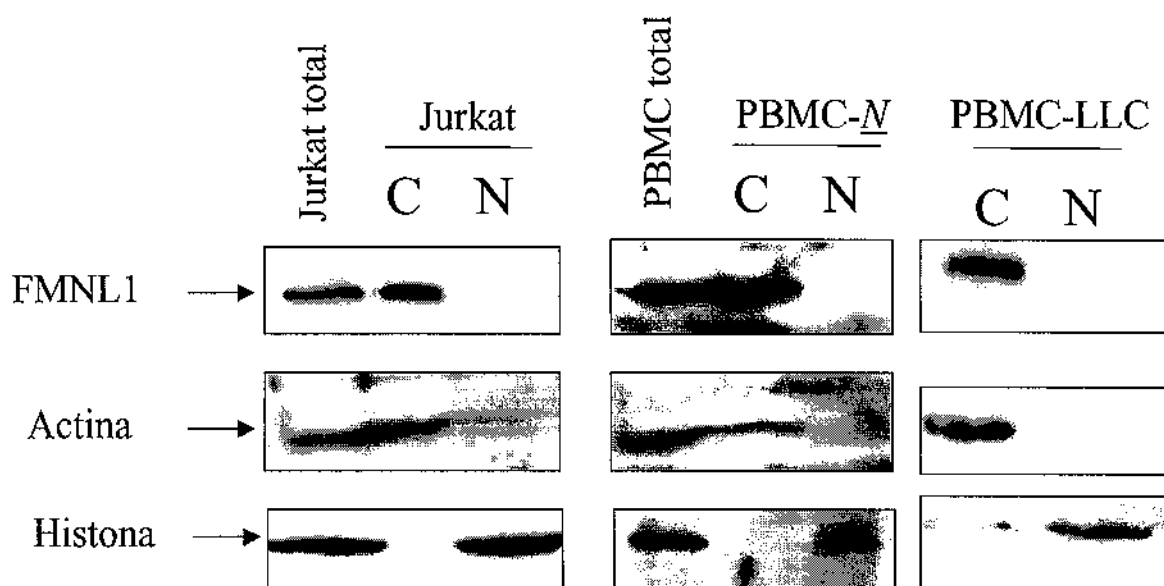


Figura 12: Análise por *Western Blotting* da expressão de FMNL1 em frações celulares. Células Jurkat ou mononucleares de sangue periférico (PBMC) de um indivíduo normal (*N*) ou com LLC foram submetidas ao protocolo de separação de frações celulares: citoplasma (C) e núcleo (N). Os anticorpos anti-actina e anti-histona foram usados para incubar as mesmas membranas como controles da eficiência da separação.

#### 8. FMNL1 está associada com AKT em células Jurkat e células mononucleares de sangue periférico de um paciente com LLC

Com o objetivo de avaliar uma possível interação da proteína FMNL1 com AKT, imunoprecipitação com anticorpo anti-AKT e incubação com anticorpo anti-FMNL1 foram feitos em extrato total protéico de células Jurkat e também em células mononucleares de sangue periférico humano de um paciente com LLC. Em ambos os casos houve a interação da proteína FMNL1 com AKT (Figura 13 A e B). O ensaio reverso de imunoprecipitação e incubação foi assim realizado: o extrato protéico de Jurkat foi imunoprecipitado com anticorpo anti-FMNL1 e, além disso, algumas amostras foram imunoprecipitadas com uma IgG de coelho não relacionada (controle negativo), e todos incubados com anticorpo anti-AKT, confirmando a interação por imunoprecipitação (Figura 12 C).

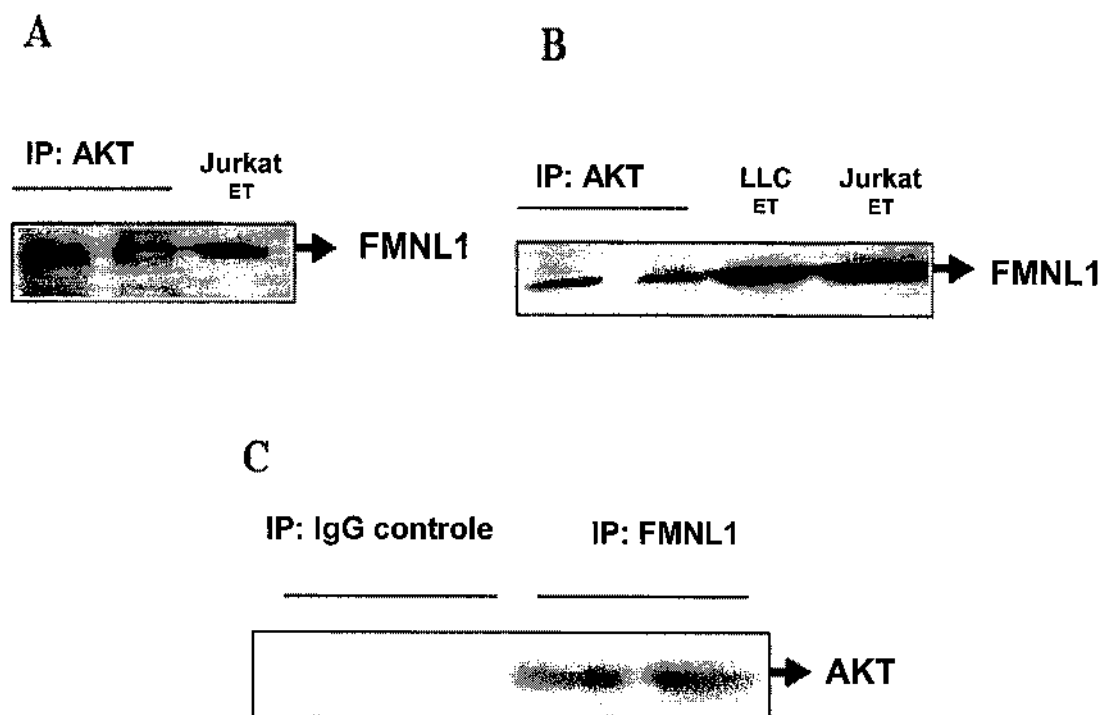


Figura 13: Associação de FMNL1 com AKT através da técnica de imunoprecipitação em células Jurkat (A) e em células mononucleares de sangue periférico de um paciente com LLC (B). Quantidades iguais de extrato total protéico foram imunoprecipitadas (IP) com anticorpo anti-AKT e a membrana incubada com anticorpo anti-FMNL1. (C) Ensaio reverso: quantidades iguais de extrato total protéico de Jurkat foram IP com anti-FMNL1 e incubadas com anti-AKT. Como controle negativo, algumas amostras foram IP com imunoglobulina G (IgG) não relacionada de coelho.

## 9. A associação da proteína FMNL1 com AKT não é dependente da fosforilação da AKT

LY-294002 é um inibidor de PI-3K (fosfatidilinositol-3-kinase) (VLAHOS et al., 1994). A inativação de PI-3K, através do tratamento com LY-294002, desencadeia o processo de inativação (defosforilação) da AKT. Células Jurkat ( $5 \times 10^5$  células/ml) foram tratadas,

durante 2 horas, com diferentes concentrações de LY-294002 e foi observado que 20mM da droga eram suficientes para que ocorresse uma diminuição da fosforilação de AKT (Figura 14). As células Jurkat foram escolhidas visto que apresentam um alto nível de fosforilação de AKT (SHAN et al., 2000) e alta expressão da proteína FMNL1.

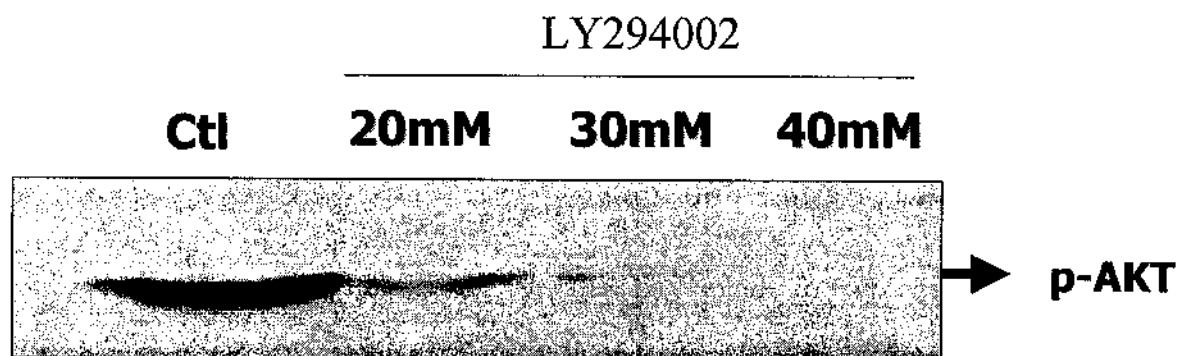


Figura 14: Análise por *Western Blotting* da fosforilação de AKT, com anticorpo anti-fosfo-AKT (p-AKT) em células Jurkat, tratadas com diferentes concentrações de LY-294002 (20 mM, 30 mM e 40 mM) e coletadas após 2 horas de incubação.

Além do mais, o mesmo extrato protéico de células tratadas foi submetido à imunoprecipitação com anticorpo anti-AKT e incubação com anticorpo anti-FMNL1 (Figura 15). A associação da proteína FMNL1 com AKT foi observada com ou sem o tratamento com LY-294002.

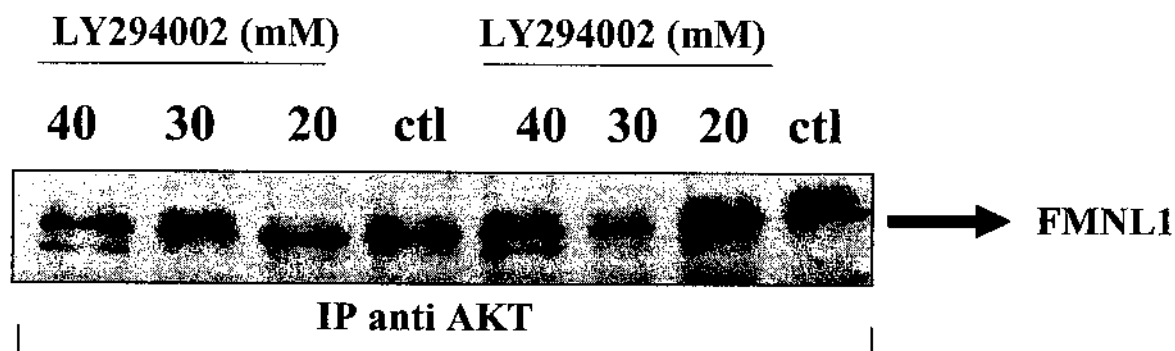


Figura 15: Associação de FMNL1 com AKT através da técnica de imunoprecipitação em células Jurkat. Quantidades iguais de extrato total protéico foram imunoprecipitadas (IP)

com anticorpo anti-AKT e a membrana incubada com anticorpo anti-FMNL1, em células sem tratamento (ctl) ou tratadas com diferentes concentrações de LY-294002 (20 mM, 30 mM e 40 mM) durante 2 horas.

#### 10. Os domínios FH2 e FH3 da proteína FMNL1 associam-se com a proteína AKT em estudos *in vitro*

As construções dos vetores foram as seguintes: para os domínios de FMNL1 (FH2 e FH3), foi usado um vetor com *tag* de GFP. Para a construção da proteína AKT, foi usado um vetor com *tag* de HA. Com o uso de anticorpos específicos contra os *tags* dos vetores, anti-GFP ou anti-HA, foi realizada imunoprecipitação e *Western Blotting* no extrato proteico das células 293, após 48 horas da transfecção. Na Figura 16 é possível observar que a imunoprecipitação com o anticorpo anti-GFP e incubação com o anticorpo anti-HA revelou que ambos os domínios FH2 e FH3 se associam com a AKT.

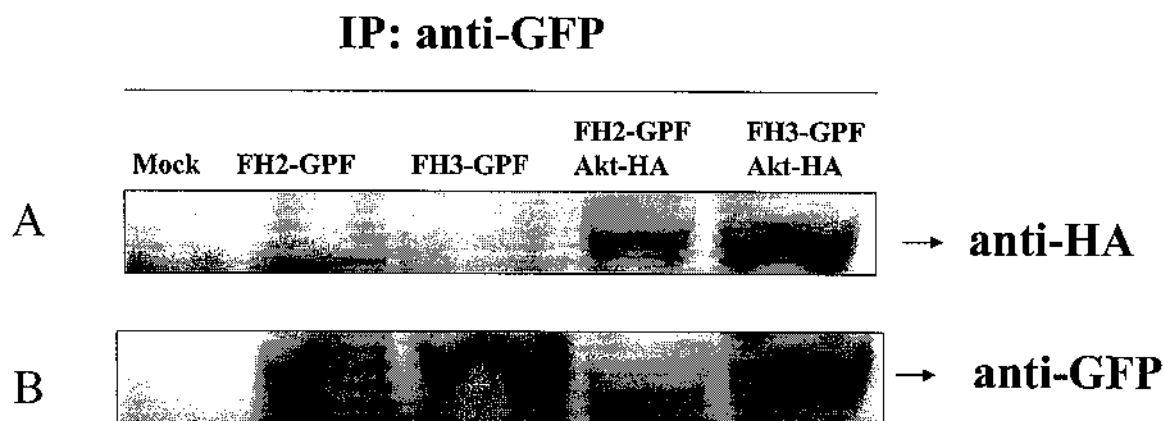


Figura 16: Associação dos domínios FH2 e FH3 de FMNL1 com AKT. A linhagem celular 293 foi cotransfectada com as construções FH2-GFP ou FH3-GFP com AKT-HA. Após 48 horas de transfecção, extrato protéico das células 293 foi imunoprecipitada (IP) com anti-

anticorpo anti-HA. (B) A mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-GFP. Mock são as células submetidas a todo o processo, sem receber os vetores (controle negativo).

#### 11. A proteína FMNL1 não se associa com outras proteínas presentes na via de sinalização da AKT

Com o objetivo de observar uma possível associação da proteína FMNL1 com outras proteínas presentes na via de sinalização da AKT, foram realizados estudos de imunoprecipitação e *Western Blotting* utilizando extrato protéico da linhagem celular Jurkat. A proteína *upstream* a AKT estudada foi a PI-3K e as proteínas *downstream* a AKT foram as seguintes: p70S6K, mTOR, Mdm2 e Bad. Não houve associação de FMNL1 com nenhuma das proteínas estudadas. Abaixo, um resumo da função de cada uma dessas proteínas.

**PI-3K:** consiste em uma subunidade reguladora de 85 kDa e outra subunidade catalítica de 110 kDa. A ativação de receptores tirosina kinase por diferentes fatores de crescimento, de receptores acoplados à proteína G ou qualquer outro estímulo celular que leve à ativação de PI-3K (fosfatidilinositol-3-kinase) (AHMAD et al., 1999) desencadeia o processo de ativação da AKT. Esta, por sua vez, determina uma sequência de eventos bioquímicos amplamente regulados. Os produtos lipídicos da ativação de PI-3K (PIP<sub>3</sub> e PIP<sub>2</sub>) funcionam como segundos mensageiros, servindo de sítios de ligação de alta afinidade para o domínio PH da AKT (KLIPPEL et al., 1997; STECK et al., 1997; STOKOE et al., 1997).

**p70S6K:** 70 kDa ribossomal S6 kinase (p70S6K) é ativada por mitógenos, fatores de crescimento e hormônios. Ativação do p70S6K, que ocorre via PI-3K (VANHAESEBROECK e WATERFIELD, 1999), se dá através de fosforilação de vários sítios e o alvo primário do p70S6K ativado é a proteína S6 ribossomal 40S, componente principal da via envolvida em síntese protéica em células de mamíferos (BERVEN e CROUCH, 2000).

**mTOR:** pertence à família de proteína kinases que tem um domínio catalítico homólogo ao domínio presente na phosphatidylinositol 3-OH kinase. A fosforilação do mTOR no sítio Serina 2448, é estimulado por insulina, mas também é fosforilado pela AKT

mTOR no sítio Serina 2448, é estimulado por insulina, mas também é fosforilado pela AKT *in vitro* e também em resposta da ativação da AKT *in vivo*. mTOR participa do controle da fosforilação da lipina, que é requerida para a diferenciação de adipócitos, e de dois reguladores de tradução, p70S6K e PHAS-1 (LAWRENCE et al., 2004).

**Mdm2:** é uma oncoproteína e tem sido descrita como substrato de AKT. A fosforilação de dois sítios de serina de Mdm2 por AKT, leva à translocação de Mdm2 do citoplasma para o núcleo (MAYO e DONNER, 2002). No núcleo, em condições de não estresse, essa proteína tem um efeito “down” regulador na proteína supressora de tumor p53 (VARGAS et al., 2003).

**Bad:** pertence à família Bcl-2. Quando fosforilado pela AKT, apresenta atividade anti-apoptótica. A fosforilação de Bad impede sua ligação ao Bcl-X<sub>L</sub>, e, conseqüentemente, a inibição de Bcl-X<sub>L</sub>, uma proteína que quando ativada desencadeia a liberação do citocromo c no citoplasma (DATTA et al., 1997).

A ausência de ligação de FMNL1 com estas proteínas envolvidas na via de sinalização de AKT sugere que FMNL1 se ligue especificamente a AKT, podendo ser reguladora de sua atividade (Figura 17).

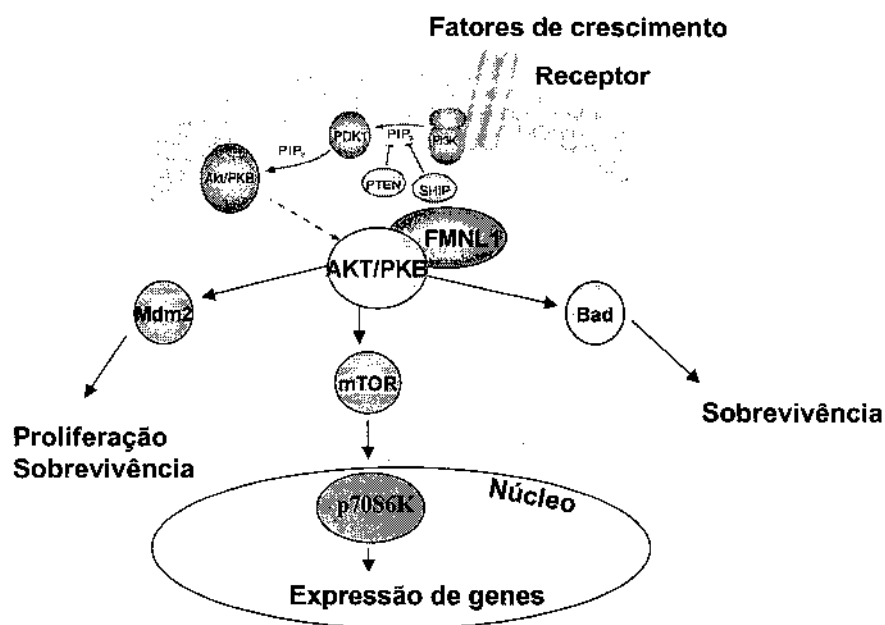


Figura 17: Via de sinalização resumida de AKT, mostrando as proteínas Mdm2, mTOR, Bad, p70S6K e a associação de AKT com FMNL1.

**12. O tratamento com agentes apoptóticos em linhagens celulares Jurkat e KG1a leva à diminuição da expressão de FMNL1**

Células Jurkat foram tratadas com 0,45ng/ml de FasL, e coletadas em diferentes tempos: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 90 minutos. Essas células foram processadas para extração da proteína total e submetidas à análise da expressão de FMNL1 por *Western Blotting*. FasL liga-se ao receptor Fas, que é um mediador de ativação de caspases. A ativação das caspases, via Fas-FasL, leva ao recrutamento da procaspase 8 e 10, as quais são clivadas em caspases ativas, levando à clivagem da procaspase 3 em caspase 3 ativa, a qual é a grande efetora da apoptose nessa via (KAUFMANN e GORES, 2000). Pode-se observar na Figura 18 que, após 50 minutos de tratamento com FasL, ocorreu a clivagem das caspases 8 e 3 comprovando a ativação efetiva dessa via. E ainda, pode-se observar que entre 60 e 90 minutos de tratamento ocorre uma diminuição da expressão de FMNL1.

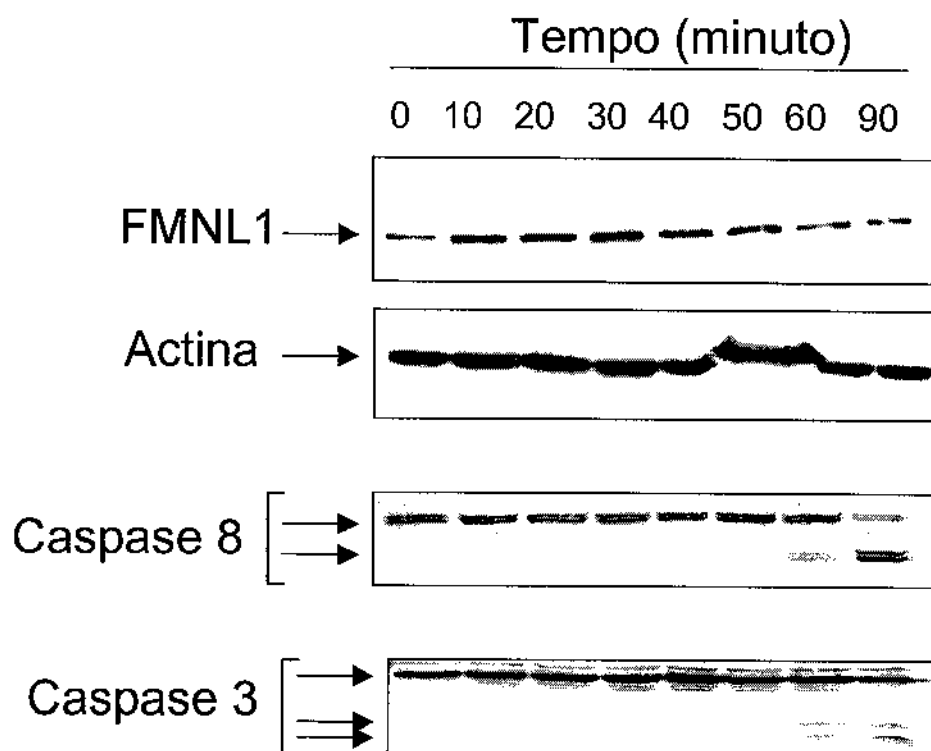


Figura 18: Análise por *Western Blotting* da expressão de FMNL1 em células Jurkat tratadas com 0,45ng/ml de FasL, coletadas em diferentes tempos: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 90

minutos. Como controle da ativação da via das caspases a mesma membrana foi incubada com os anticorpos anti-caspase 8 e 3. Como controle da quantidade de amostra aplicada no gel, a expressão de actina foi analisada.

As células KG1a (células leucêmicas mielóides) foram tratadas com diferentes concentrações de mitramicina: 100, 300 e 500 nM de droga e coletadas em dois tempos: 24 e 48 horas. O tratamento com mitramicina, embora não atue diretamente no receptor Fas, também conduz à ativação da via das caspases, através do TNF (DUVERGER et al., 2004). Assim, na Figura 19, é possível observar que com a concentração de 300nM, ocorre a clivagem das caspases 8 e 3 após 48 horas, além da diminuição da expressão de FMNL1. A dose mais elevada (500nM) da droga leva à diminuição da expressão de FMNL1, tanto com 24 e 48 horas de tratamento.

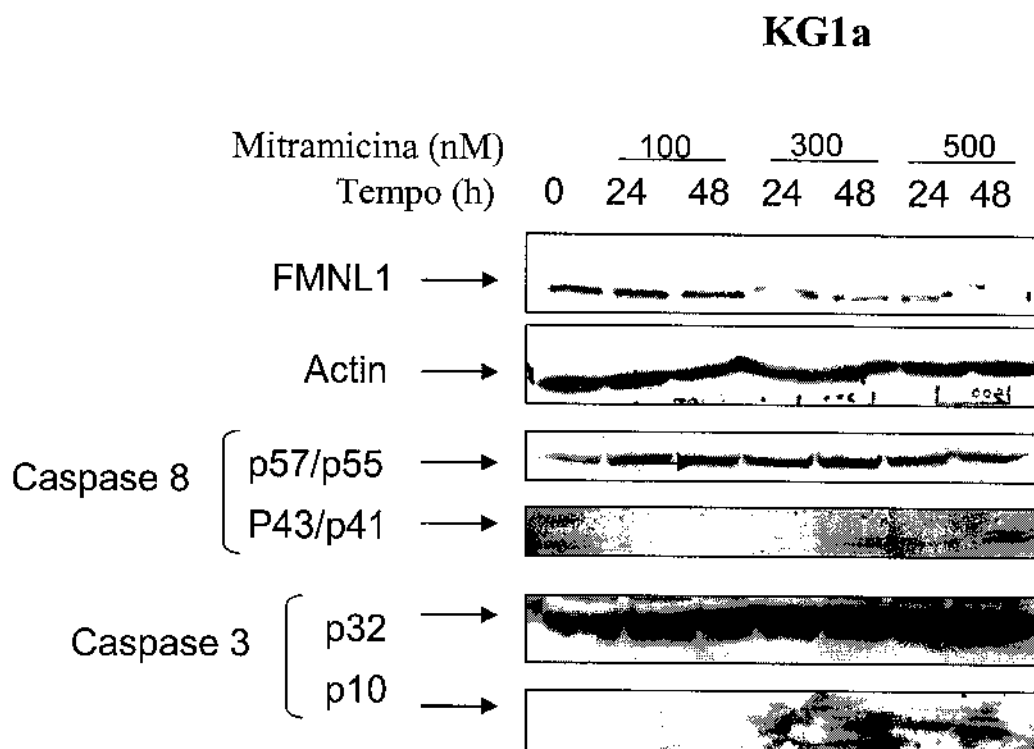
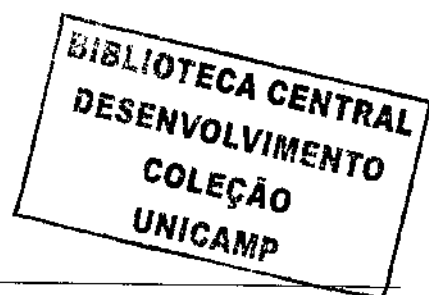


Figura 19: Análise por *Western Blotting* da expressão de FMNL1 em células KG1a tratadas com diferentes concentrações de mitramicina (100, 300 ou 500 nM), coletadas em

ativação da via das caspases a mesma membrana foi incubada com os anticorpos anti-caspase 8 e 3. Como controle da quantidade de amostra aplicada no gel, a expressão de actina foi analisada.



## ***DISCUSSÃO***

---

No presente estudo, um novo gene humano, da família das forminas, foi identificado através das informações geradas pelo projeto Genoma do Câncer Humano (DIAS NETO et al., 2000). Por apresentar expressão preferencial em tecidos linfóides, inicialmente o novo gene foi depositado no banco de dados do NCBI com o nome *Formina Leucocitária Humana* (número de acesso no GenBank AY278319). Posteriormente, baseando-se na nomenclatura de novos genes e proteínas, aprovada pelo Gene Nomenclature Committee HUGO (POVEY et al., 2001), o novo gene foi renomeado *formin-like 1*, com a sigla *FMNL1*.

Análises computacionais revelaram que este novo gene, *FMNL1*, está localizado no cromossomo 17, banda 17q21.31 e é composto de 27 exons. O cDNA possui 3959 bp e codifica uma proteína de 1100 aminoácidos, a qual apresenta 3 domínios característicos da família das forminas: FH1, FH2 e FH3. Além disso, foi observado que a proteína codificada pelo gene *FMNL1* é ortóloga a outra proteína de mamífero descrita em camundongos FRL (YAYOSHI-YAMAMOTO et al., 2000), sugerindo a conservação deste gene durante a evolução. Essas proteínas da família das forminas são bastante conservadas e estão presentes em fungos, plantas e animais.

Análise por *Northern Blotting* em tecidos humanos normais revelou expressão preferencial do RNAm de *FMNL1* em alguns tecidos: alta expressão em leucócitos de sangue periférico, e expressões menores em timo, baço, placenta e pulmão. Por outro lado, não foi observada expressão do RNAm de *FMNL1* em músculo esquelético, útero, cólon, intestino delgado, bexiga, coração, estômago, próstata, cérebro e rim. Em contraste, o RNAm de *FRL*, a sequência ortóloga de *FMNL1*, mostrou-se expresso na maioria dos tecidos murinos normais (YAYOSHI-YAMAMOTO et al., 2000). Curiosamente, o RNAm de *FMNL1* mostrou-se expresso em diferentes linhagens neoplásicas, sendo que a linhagem MOLT-4, derivada de leucemia linfoblástica T, apresentou a maior expressão.

Com a produção de um anticorpo policlonal específico para esta proteína, foi possível o estudo da sua expressão em diversos tecidos humanos. Dentre os tecidos humanos normais, através da técnica de *Western Blotting*, foi observada expressão apenas em células mononucleares de sangue periférico e em linfonodo. Os outros tecidos normais estudados como rim, baço, cérebro, estômago, coração, intestino delgado, músculo esquelético, fígado e pulmão não indicaram expressão de *FMNL1*.

Além disso, subpopulações celulares de tonsilas normais foram estudadas quanto à expressão da proteína FMNL1. As células CD19<sup>-</sup> apresentaram expressão maior da proteína em questão, quando comparadas com as células CD19<sup>+</sup>, que representam as células B. Da mesma maneira, as células B foram separadas em duas subpopulações: *naive* (CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>) e memória (CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>), e estas comparadas quanto à expressão de FMNL1. As células de memória, que possuem grande longevidade (GRAY, 1994; MANZ et al., 1997; SCHITTEK e RAJEWSKY, 1990; SLIFKA e AHMED, 1998), apresentaram expressão preferencial. Esse resultado indica um possível envolvimento da proteína FMNL1 na sobrevivência celular, visto que a proteína ortóloga em camundongos também está envolvida na transmissão de sinais essenciais para a sobrevivência celular (YAYOSHI-YAMAMOTO et al., 2000).

O estudo publicado com a proteína ortóloga de camundongo, FRL (YAYOSHI-YAMAMOTO et al., 2000), mostrou que a superexpressão do domínio truncado de FH3 leva à diminuição da migração, inibição do crescimento celular e indução da apoptose na linhagem celular de macrófago P338D1. Nesse mesmo estudo, mostrou-se que a associação de RAC com FRL parece ter um papel importante na reorganização do citoesqueleto de actina, na adesão e migração dessas células. Entretanto, com relação à apoptose, parece improvável que a regulação desse fenômeno seja feita através de sinalização via RAC, uma vez que FRL não se associa à PAK (YAYOSHI-YAMAMOTO et al., 2000), o que levaria a uma ativação da cascata JNK/SAPK, uma das vias de regulação de apoptose. Desse modo, a proteína ortóloga no camundongo está envolvida na transmissão de um sinal essencial para a sobrevivência celular, mas ainda não está clara a via de sinalização envolvida.

O estudo da expressão da proteína FMNL1 em tecidos neoplásicos mostrou que, dentre as linhagens celulares neoplásicas, a expressão foi maior em MOLT-4 e Jurkat, quando comparadas com outras linhagens mielóides, indicando expressão preferencial da proteína em neoplasia linfóide. Além disso, alta expressão da proteína foi observada em células mononucleares de sangue periférico de 20 pacientes com LLC, quando comparadas com células mononucleares de sangue periférico de indivíduos normais. Realmente, parte deste novo gene, um cDNA incompleto, denominado KW-13, já havia sido descrito como um antígeno de tumor superexpresso em LLC (KRACKHARDT et al., 2002). Nesse estudo, pela técnica SEREX ("serologic identification by recombinant expression

cloning”), foi possível identificar possíveis antígenos candidatos à imunoterapia na LLC. KW-13 foi um dos antígenos identificados apenas nos pacientes com LLC.

Quando a expressão da proteína FMNL1 foi estudada em diferentes tipos histológicos de LNH e em linfonodos reativos, novamente, foi observada expressão preferencial no tecido neoplásico em relação ao tecido normal. Nos tecidos humanos normais, há uma regulação fina do balanço entre proliferação e morte celular e a dinâmica desse balanço depende do tipo celular. Diferentemente, nos tecidos neoplásicos há um desequilíbrio entre proliferação e morte celular, ocorrendo tanto o aumento na proliferação celular quanto a falência da célula neoplásica em entrar em apoptose ou morte celular programada. Uma consequência importante para as células que perdem a habilidade de entrar em apoptose é a provável transmissão de danos irreparáveis para as células filhas. Outra implicação é em relação à terapia anticâncer, pois as células neoplásicas podem apresentar resistência à quimioterapia, decorrente de sua resistência de entrar em apoptose. Assim, a descrição de genes envolvidos na regulação de proliferação ou morte celular na célula neoplásica pode levar a novos alvos para as terapias anticâncer.

Dentre os diferentes LNH e linfonodos reacionais, foi observada expressão da proteína FMNL1 significativamente maior no LNH-T. LNH-T representam aproximadamente 10% a 15% de todos os linfomas, sendo esse tipo mais agressivo e os pacientes apresentam um pior prognóstico, quando comparados com os pacientes com LNH B correspondentes. Assim, pode-se sugerir novamente o envolvimento da proteína FMNL1 com mecanismos anti-apoptóticos, que favorecem a agressividade desse tipo de LNH. Mais uma vez, é importante ressaltar que a identificação de genes relevantes envolvidos na patogênese do LNH-T, e que estejam relacionados com vias de sinalização regulatórias, pode levar a novos candidatos para a terapia molecular nessa doença (CORN e EL-DEIRY, 2002).

Com o uso do anticorpo policlonal anti-FMNL1 também foi possível determinar a localização celular da proteína FMNL1. Estudos de localização de proteína da família da formina são mais frequentes em fibroblastos, e o padrão encontrado nessas células é a localização de formina nas membranas plasmática e perinuclear (UETZ et al., 1996). Leder e colaboradores demonstraram que formina IV, um membro da família das forminas,

candidato à participação da formação dos túbulos epiteliais renais (WOYCHIK et al., 1985; ZELLER et al., 1989), está localizada no núcleo de fibroblastos, com pequena concentração na membrana (CHAN e LEDER, 1996). Outro estudo mostrou que formina IV em células NIH3T3 está localizada perinuclearmente, na membrana e também dentro do núcleo (O'ROURKE et al., 2000). Esses estudos sugerem que em fibroblastos quiescentes, formina IV está localizada ao redor do núcleo. Já em células epiteliais, mIMCD-3, formina IV foi localizada na periferia de clusters celulares, nos sítios de contato célula-célula. Essa localização é similar à organização de actina, descrito para outras células epiteliais, quando estas são cultivadas em confluência. Em contraste com os estudos citados, FMNL1, em células Jurkat e em células mononucleares de sangue periférico de um indivíduo normal, foi localizada no citoplasma, sem apresentar um padrão similar à organização de actina.

Análises em células Jurkat e em células mononucleares de sangue periférico de um paciente com LLC revelaram a associação de FMNL1 com AKT, sendo que esta associação é independente da ativação de AKT. Proteína Kinase B (PKB), também denominada AKT, é um importante regulador da proliferação e sobrevivência celular. Já foi demonstrado que a ativação da via de sinalização da AKT leva à glicogênese, à síntese protéica, à captação de glicose e à indução da sobrevivência celular (CHAN et al., 1999; COFFER et al., 1998), entre outras funções. Assim, se FMNL1 participa de algum mecanismo de sobrevivência celular, como o sugerido com a proteína ortóloga, a interação entre AKT e FMNL1 poderia ser uma explicação para tal, sendo que os domínios FH2 e FH3 participam dessa associação. Além disso, pode-se sugerir o envolvimento de FMNL1 na regulação da atividade de AKT ou que FMNL1 seja uma proteína de suporte para AKT.

Apoptose refere-se a uma forma específica de morte celular programada e é executada por proteases específicas, as caspases. Uma das vias da apoptose, chamada extrínseca, é ativada através de receptores nas células como FasL, TNF, TRAIL, dentre outros. Desse modo, a partir da ativação destes receptores, ocorre o recrutamento de várias proteínas, entre elas, as caspases, que são as grandes efetoras da morte celular programada (SHI, 2004). É notório que pouco se sabe da relação de forminas com a ativação da via das caspases. Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho mostraram diminuição da expressão de FMNL1 em linhagens celulares Jurkat e KG1a, após tratamento com agentes

apoptóticos, sugerindo a participação de FMNL1 na via das caspases, talvez como alvo direto que é consumido durante a ativação desta via.

Finalmente, o presente estudo é o início da caracterização de uma nova proteína da família das forminas, FMNL1, identificada inicialmente em neoplasia de medula óssea, através do projeto Genoma do Câncer. A expressão preferencial dessa proteína em tecidos neoplásicos linfóides, como mostrado até agora, sustenta a hipótese de que FMNL1 esteja envolvida na fisiopatologia dessas neoplasias hematológicas, e pode ser candidata para terapia alvo-específico.

## ***CONCLUSÃO***

---

1. *FMNL1* possui 3959pb sem a cauda poli-A e apresenta um quadro aberto de leitura de 3302bp. O novo gene está localizado no braço longo do cromossomo 17 (banda 17q21.31).
2. O RNAm de *FMNL1* está expresso restritamente em alguns tecidos humanos normais: leucócito de sangue periférico, timo, baço, placenta e pulmão.
3. Há maior expressão do RNAm de *FMNL1* em linhagens neoplásicas se comparadas com tecidos normais. Dentre as linhagens de células neoplásicas, observou-se preferencialmente a expressão em MOLT-4, uma leucemia linfoblástica de célula T. Já as linhagens HL-60, HeLa S3, K-562, linfoma de Burkitt, adenocarcinoma colorretal (SW480) e carcinoma de pulmão (A549), apresentaram menor expressão.
4. Em relação à expressão da proteína *FMNL1* em tecido normal, observou-se fraca expressão em linfonodo e em células mononucleares de sangue periférico. MOLT-4 e Jurkat, ambas linhagens celulares neoplásicas linfóides, apresentaram a maior expressão em relação às linhagens celulares neoplásicas estudadas.
5. Em tonsilas normais, a subpopulação de células  $CD19^-$  apresentou maior expressão da proteína *FMNL1* quando comparada com a subpopulação de células  $CD19^+$ . Além disso, as células B de memória ( $CD19^+/CD27^+$ ) apresentaram maior expressão quando comparadas com as células B naïve ( $CD19^+/CD27^-$ ).
6. Em células mononucleares de sangue periférico de 20 pacientes com LLC a expressão foi maior quando comparada com células mononucleares de sangue periférico de 10 indivíduos normais.
7. A proteína *FMNL1* apresenta expressão preferencial em LNH em relação aos linfonodos reacionais. Além disso, *FMNL1* está significativamente mais expressa no grupo de LNH-T.
8. A proteína *FMNL1* está localizada no citoplasma de células Jurkat e de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos normais.
9. *FMNL1* está associada com AKT, sendo que os domínios FH2 e FH3 participam dessa interação. Essa associação não é dependente da ativação de AKT.

10. O tratamento com agentes apoptóticos em linhagens celulares Jurkat e KG1a leva à diminuição da expressão de FMNL1.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

- A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. **N Engl J Med**, 329(14): 987-94, 1993.
- AGEMATSU, K.; HOKIBARA, S.; NAGUMO, H. KOMIYAMA, A. CD27: a memory B-cell marker. **Immunol Today**, 21(5): 204-6, 2000.
- AGEMATSU, K.; NAGUMO, H.; OGUCHI, Y.; NAKAZAWA, T.; FUKUSHIMA, K.; YASUI, K. et al. Generation of plasma cells from peripheral blood memory B cells: synergistic effect of interleukin-10 and CD27/CD70 interaction. **Blood**, 91(1): 173-80, 1998.
- AHMAD, S.; SINGH, N. GLAZER, R. I. Role of AKT1 in 17beta-estradiol- and insulin-like growth factor I (IGF-I)-dependent proliferation and prevention of apoptosis in MCF-7 breast carcinoma cells. **Biochem Pharmacol**, 58(3): 425-30, 1999.
- ALESSI, D. R.; DEAK, M.; CASAMAYOR, A.; CAUDWELL, F. B.; MORRICE, N.; NORMAN, D. G. et al. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. **Curr Biol**, 7(10): 776-89, 1997a.
- ALESSI, D. R.; JAMES, S. R.; DOWNES, C. P.; HOLMES, A. B.; GAFFNEY, P. R.; REESE, C. B. et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. **Curr Biol**, 7(4): 261-9, 1997b.
- BARKETT, M. GILMORE, T. D. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. **Oncogene**, 18(49): 6910-24, 1999.
- BERVEN, L. A. CROUCH, M. F. Cellular function of p70S6K: a role in regulating cell motility. **Immunol Cell Biol**, 78(4): 447-51, 2000.
- BLUME-JENSEN, P. HUNTER, T. Oncogenic kinase signalling. **Nature**, 411(6835): 355-65, 2001.
- BRODBECK, D.; CRON, P. HEMMINGS, B. A. A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. **J Biol Chem**, 274(14): 9133-6, 1999.

- BRUNET, A.; BONNI, A.; ZIGMOND, M. J.; LIN, M. Z.; JUO, P.; HU, L. S. et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. **Cell**, 96(6): 857-68, 1999.
- CASTRILLON, D. H. WASSERMAN, S. A. Diaphanous is required for cytokinesis in *Drosophila* and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. **Development**, 120(12): 3367-77, 1994.
- CHAN, D. C.; BEDFORD, M. T. LEDER, P. Formin binding proteins bear WWP/WW domains that bind proline-rich peptides and functionally resemble SH3 domains. **Embo J**, 15(5): 1045-54, 1996.
- CHAN, D. C. LEDER, P. Genetic evidence that formins function within the nucleus. **J Biol Chem**, 271(38): 23472-7, 1996.
- CHAN, T. O.; RITTENHOUSE, S. E. TSICHLIS, P. N. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. **Annu Rev Biochem**, 68(965-1014, 1999.
- CHENG, J. Q.; GODWIN, A. K.; BELLACOSA, A.; TAGUCHI, T.; FRANKE, T. F.; HAMILTON, T. C. et al. AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 89(19): 9267-71, 1992.
- CHOMCZYNSKI, P. SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, 162(1): 156-9, 1987.
- CHOU, P. Y. FASMAN, G. D. Prediction of beta-turns. **Biophys J**, 26(3): 367-73, 1979.
- COFFER, P. J.; JIN, J. WOODGETT, J. R. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. **Biochem J**, 335 ( Pt 1)(1-13, 1998.
- CORN, P. G. EL-DEIRY, W. S. Derangement of growth and differentiation control in oncogenesis. **Bioessays**, 24(1): 83-90, 2002.
- CROSS, D. A.; ALESSI, D. R.; COHEN, P.; ANDJELKOVICH, M. HEMMINGS, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, 378(6559): 785-9, 1995.

- DATTA, S. R.; BRUNET, A. GREENBERG, M. E. Cellular survival: a play in three Akts. **Genes Dev**, 13(22): 2905-27, 1999.
- DATTA, S. R.; DUDEK, H.; TAO, X.; MASTERS, S.; FU, H.; GOTOH, Y. et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. **Cell**, 91(2): 231-41, 1997.
- DEL PESO, L.; GONZALEZ-GARCIA, M.; PAGE, C.; HERRERA, R. NUNEZ, G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. **Science**, 278(5338): 687-9, 1997.
- DIAS NETO, E.; CORREA, R. G.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; BRIONES, M. R.; NAGAI, M. A.; DA SILVA, W., JR. et al. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97(7): 3491-6, 2000.
- DUVERGER, V.; MURPHY, A. M.; SHEEHAN, D.; ENGLAND, K.; COTTER, T. G.; HAYES, I. et al. The anticancer drug mithramycin A sensitises tumour cells to apoptosis induced by tumour necrosis factor (TNF). **Br J Cancer**, 90(10): 2025-31, 2004.
- EMMONS, S.; PHAN, H.; CALLEY, J.; CHEN, W.; JAMES, B. MANSEAU, L. Cappuccino, a Drosophila maternal effect gene required for polarity of the egg and embryo, is related to the vertebrate limb deformity locus. **Genes Dev**, 9(20): 2482-94, 1995.
- EVANGELISTA, M.; BLUNDELL, K.; LONGTINE, M. S.; CHOW, C. J.; ADAMES, N.; PRINGLE, J. R. et al. Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. **Science**, 276(5309): 118-22, 1997.
- EVANGELISTA, M.; ZIGMOND, S. BOONE, C. Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. **J Cell Sci**, 116(Pt 13): 2603-11, 2003.
- FLOREA, L.; HARTZELL, G.; ZHANG, Z.; RUBIN, G. M. MILLER, W. A computer program for aligning a cDNA sequence with a genomic DNA sequence. **Genome Res**, 8(9): 967-74, 1998.
- FRANKE, T. F.; KAPLAN, D. R.; CANTLEY, L. C. TOKER, A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. **Science**, 275(5300): 665-8, 1997.

- FRECH, M.; ANDJELKOVIC, M.; INGLE, E.; REDDY, K. K.; FALCK, J. R. HEMMINGS, B. A. High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. **J Biol Chem**, 272(13): 8474-81, 1997.
- FUJITA, E.; JINBO, A.; MATUZAKI, H.; KONISHI, H.; KIKKAWA, U. MOMOI, T. Akt phosphorylation site found in human caspase-9 is absent in mouse caspase-9. **Biochem Biophys Res Commun**, 264(2): 550-5, 1999.
- GOODE, B. L.; DRUBIN, D. G. BARNES, G. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. **Curr Opin Cell Biol**, 12(1): 63-71, 2000.
- GRAY, D. Regulation of immunological memory. **Curr Opin Immunol**, 6(3): 425-30, 1994.
- IMAMURA, H.; TANAKA, K.; HIHARA, T.; UMIKAWA, M.; KAMEI, T.; TAKAHASHI, K. et al. Bnlp and Bnrlp: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. **Embo J**, 16(10): 2745-55, 1997.
- JONES, P. F.; JAKUBOWICZ, T. HEMMINGS, B. A. Molecular cloning of a second form of rac protein kinase. **Cell Regul**, 2(12): 1001-9, 1991a.
- JONES, P. F.; JAKUBOWICZ, T.; PITOSI, F. J.; MAURER, F. HEMMINGS, B. A. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 88(10): 4171-5, 1991b.
- KAMEI, T.; TANAKA, K.; HIHARA, T.; UMIKAWA, M.; IMAMURA, H.; KIKYO, M. et al. Interaction of Bnrlp with a novel Src homology 3 domain-containing Hoflp. Implication in cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, 273(43): 28341-5, 1998.
- KATOH, M. Identification and characterization of human FMNL1, FMNL2 and FMNL3 genes in silico. **Int J Oncol**, 22(5): 1161-8, 2003.
- KAUFMANN, S. H. GORES, G. J. Apoptosis in cancer: cause and cure. **Bioessays**, 22(11): 1007-17, 2000.
- KLIPPEL, A.; KAVANAUGH, W. M.; POT, D. WILLIAMS, L. T. A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. **Mol Cell Biol**, 17(1): 338-44, 1997.

- KOBATA, T.; JACQUOT, S.; KOZLOWSKI, S.; AGEMATSU, K.; SCHLOSSMAN, S. F. MORIMOTO, C. CD27-CD70 interactions regulate B-cell activation by T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 92(24): 11249-53, 1995.
- KOHNO, H.; TANAKA, K.; MINO, A.; UMIKAWA, M.; IMAMURA, H.; FUJIWARA, T. et al. Bni1p implicated in cytoskeletal control is a putative target of Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. **Embo J**, 15(22): 6060-8, 1996.
- KOPS, G. J.; DE RUITER, N. D.; DE VRIES-SMITS, A. M.; POWELL, D. R.; BOS, J. L. BURGERING, B. M. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. **Nature**, 398(6728): 630-4, 1999.
- KOZAK, M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. **Gene**, 234(2): 187-208, 1999.
- KRACKHARDT, A. M.; WITZENS, M.; HARIG, S.; HODI, F. S.; ZAULS, A. J.; CHESSIA, M. et al. Identification of tumor-associated antigens in chronic lymphocytic leukemia by SEREX. **Blood**, 100(6): 2123-31, 2002.
- KYTE, J. DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **J Mol Biol**, 157(1): 105-32, 1982.
- LAUDER, A.; CASTELLANOS, A. WESTON, K. c-Myb transcription is activated by protein kinase B (PKB) following interleukin 2 stimulation of T cells and is required for PKB-mediated protection from apoptosis. **Mol Cell Biol**, 21(17): 5797-805, 2001.
- LAWRENCE, J. C.; LIN, T. A.; MCMAHON, L. P. CHOI, K. M. Modulation of the protein kinase activity of mTOR. **Curr Top Microbiol Immunol**, 279(199-213, 2004.
- MANZ, R. A.; THIEL, A. RADBRUCH, A. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. **Nature**, 388(6638): 133-4, 1997.
- MARTE, B. M. DOWNWARD, J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. **Trends Biochem Sci**, 22(9): 355-8, 1997.
- MAYO, L. D. DONNER, D. B. The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. **Trends Biochem Sci**, 27(9): 462-7, 2002.
- MEIER, R. HEMMINGS, B. A. Regulation of protein kinase B. **J Recept Signal Transduct Res**, 19(1-4): 121-8, 1999.
- NAGUMO, H.; AGEMATSU, K.; SHINOZAKI, K.; HOKIBARA, S.; ITO, S.; TAKAMOTO, M. et al. CD27/CD70 interaction augments IgE secretion by promoting

- the differentiation of memory B cells into plasma cells. **J Immunol**, 161(12): 6496-502, 1998.
- NAKATANI, K.; SAKAUE, H.; THOMPSON, D. A.; WEIGEL, R. J. ROTH, R. A. Identification of a human Akt3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylation site. **Biochem Biophys Res Commun**, 257(3): 906-10, 1999.
- O'ROURKE, D. A.; LIU, Z. X.; SELLIN, L.; SPOKES, K.; ZELLER, R. CANTLEY, L. G. Hepatocyte growth factor induces MAPK-dependent formin IV translocation in renal epithelial cells. **J Am Soc Nephrol**, 11(12): 2212-21, 2000.
- PETERSEN, J.; NIELSEN, O.; EGEL, R. HAGAN, I. M. FH3, a domain found in formins, targets the fission yeast formin Fus1 to the projection tip during conjugation. **J Cell Biol**, 141(5): 1217-28, 1998.
- POVEY, S.; LOVERING, R.; BRUFORD, E.; WRIGHT, M.; LUSH, M. WAIN, H. The HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). **Hum Genet**, 109(6): 678-80, 2001.
- PRUYNE, D.; EVANGELISTA, M.; YANG, C.; BI, E.; ZIGMOND, S.; BRETSCHER, A. et al. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. **Science**, 297(5581): 612-5, 2002.
- REN, R.; MAYER, B. J.; CICHETTI, P. BALTIMORE, D. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. **Science**, 259(5098): 1157-61, 1993.
- RIDLEY, A. J. Stress fibres take shape. **Nat Cell Biol**, 1(3): E64-6, 1999.
- SAGOT, I.; KLEE, S. K. PELLMAN, D. Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. **Nat Cell Biol**, 4(1): 42-50, 2002.
- SCHITTEK, B. RAJEWSKY, K. Maintenance of B-cell memory by long-lived cells generated from proliferating precursors. **Nature**, 346(6286): 749-51, 1990.
- SHAN, X.; CZAR, M. J.; BUNNELL, S. C.; LIU, P.; LIU, Y.; SCHWARTZBERG, P. L. et al. Deficiency of PTEN in Jurkat T cells causes constitutive localization of Itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to CD3 stimulation. **Mol Cell Biol**, 20(18): 6945-57, 2000.
- SHI, Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. **Protein Sci**, 13(8): 1979-87, 2004.

- SLIFKA, M. K. AHMED, R. Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. **Curr Opin Immunol**, 10(3): 252-8, 1998.
- STECK, P. A.; PERSHOUSE, M. A.; JASSER, S. A.; YUNG, W. K.; LIN, H.; LIGON, A. H. et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. **Nat Genet**, 15(4): 356-62, 1997.
- STEPHENS, L.; ANDERSON, K.; STOKOE, D.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; PAINTER, G. F.; HOLMES, A. B. et al. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. **Science**, 279(5351): 710-4, 1998.
- STOKOE, D.; STEPHENS, L. R.; COPELAND, T.; GAFFNEY, P. R.; REESE, C. B.; PAINTER, G. F. et al. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. **Science**, 277(5325): 567-70, 1997.
- TANAKA, K. Formin family proteins in cytoskeletal control. **Biochem Biophys Res Commun**, 267(2): 479-81, 2000.
- UETZ, P.; FUMAGALLI, S.; JAMES, D. ZELLER, R. Molecular interaction between limb deformity proteins (formins) and Src family kinases. **J Biol Chem**, 271(52): 33525-30, 1996.
- VANHAESEBROECK, B. ALESSI, D. R. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. **Biochem J**, 346 Pt 3(561-76, 2000.
- VANHAESEBROECK, B. WATERFIELD, M. D. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. **Exp Cell Res**, 253(1): 239-54, 1999.
- VARGAS, D. A.; TAKAHASHI, S. RONAI, Z. Mdm2: A regulator of cell growth and death. **Adv Cancer Res**, 89(1-34, 2003.
- VLAHOS, C. J.; MATTER, W. F.; HUI, K. Y. BROWN, R. F. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). **J Biol Chem**, 269(7): 5241-8, 1994.
- WALLAR, B. J. ALBERTS, A. S. The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. **Trends Cell Biol**, 13(8): 435-46, 2003.
- WASSERMAN, S. FH proteins as cytoskeletal organizers. **Trends Cell Biol**, 8(3): 111-5, 1998.

- WATSON, J. D. CRICK, F. H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, 171(4356): 737-8, 1953.
- WOYCHIK, R. P.; STEWART, T. A.; DAVIS, L. G.; D'EUSTACHIO, P. LEDER, P. An inherited limb deformity created by insertional mutagenesis in a transgenic mouse. **Nature**, 318(6041): 36-40, 1985.
- YAYOSHI-YAMAMOTO, S.; TANIUCHI, I. WATANABE, T. FRL, a novel formin-related protein, binds to Rac and regulates cell motility and survival of macrophages. **Mol Cell Biol**, 20(18): 6872-81, 2000.
- ZELLER, R.; HARAMIS, A. G.; ZUNIGA, A.; MCGUIGAN, C.; DONO, R.; DAVIDSON, G. et al. Formin defines a large family of morphoregulatory genes and functions in establishment of the polarising region. **Cell Tissue Res**, 296(1): 85-93, 1999.
- ZELLER, R.; JACKSON-GRUSBY, L. LEDER, P. The limb deformity gene is required for apical ectodermal ridge differentiation and anteroposterior limb pattern formation. **Genes Dev**, 3(10): 1481-92, 1989.
- ZIGMOND, S. H. Formin-induced nucleation of actin filaments. **Curr Opin Cell Biol**, 16(1): 99-105, 2004.

## ***APÊNDICES***

---

## Artigos Publicados

**1. Human leukocyte formin: a novel protein expressed in lymphoid malignancies and associated with Akt. Bergamo Favaro PM, de Souza Medina S, Traina F, Sanchez Basseres D, Ferreira Costa F, Teresinha Olalla Saad S. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Nov 14;311(2):365-371.**

**2. High expression of FMNL1 protein in T non-Hodgkin's lymphomas. Patricia MB Favaro; Fabiola Traina; Jose Vassallo; Pierre Brousset; George Delsol; Fernando F Costa; Sara TO Saad. *Leukemia Research* (no prelo).**



## Human leukocyte formin: a novel protein expressed in lymphoid malignancies and associated with Akt

Patricia M. Bergamo Favaro,<sup>a</sup> Samuel de Souza Medina,<sup>a</sup> Fabíola Traina,<sup>a</sup>  
Daniela Sanchez Bassères,<sup>a</sup> Fernando Ferreira Costa,<sup>a,b</sup>  
and Sara Teresinha Olalla Saad<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Hematologia e Hemoterapia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP 13083-970, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Clínica Médica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP 13083-970, Brazil

Received 29 September 2003

### Abstract

The very large family of Formin proteins is involved in processes such as morphogenesis, embryonic differentiation, cell polarity, and cytokinesis. A novel human gene from the Formin family, denominated human leukocyte formin gene, was cloned. The cDNA of the gene was determined to be 3959 bp long with an open reading frame of 3302 bp and computational analysis located this gene on chromosome 17, suggesting that it is composed of 27 exons. Northern blot analysis revealed a restricted expression of mRNA in the thymus, spleen, and peripheral blood leukocytes in normal human tissues. Western blot analysis demonstrated that the protein encoded by this gene is overexpressed in lymphoid malignancies; cancer cell lines and peripheral blood leukocyte from chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients. Furthermore, the human leukocyte formin protein was observed to associate with Akt, a critical survival regulator in many different cell types.

© 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Formin; Human leukocyte formin; Lymphoid malignancies; PKB/Akt

Formins are cytoskeleton-organizing proteins present in fungi, plants, and animals that are implicated in regulating cytokinesis, polarized growth, stress fiber formation [1,2], and actin nucleation [3–5]. Formins bear a proline-rich formin homology-1 (FH1) domain, which binds profilin [6], protein–protein interaction modules (such as SH3 [7] and WW domains [8,9]), and an adjacent FH2 domain that seems to induce actin nucleation [4,5]. FH3 is located at the N terminus of Formin-related proteins and is required for the intracellular localization of Fus1 in *Schizosaccharomyces pombe* [10].

Recently, a mammalian member of the formin gene family, formin-related gene in leukocyte (*frl*) [11], was described in mouse. *Frl* may play a role in the control of

reorganization of the actin cytoskeleton and also in the regulation of the signal for cell survival in a murine macrophage cell line [11].

We have cloned a novel human gene with the characteristics of the formin-related genes, mainly expressed in leukocytes, denominated by us as human leukocyte formin. The human leukocyte formin protein is orthologous to the *frl* protein, in mouse [11]. In the present study, we report the cloning and characterization of the human leukocyte formin gene and the protein encoded by it. In addition, the interaction of this new protein with Akt in leukemic cells is demonstrated, suggesting a potential role for the human leukocyte formin protein in the Akt signaling pathway.

### Materials and methods

**Subjects.** Mononuclear cells from two normal controls and five patients with chronic lymphocytic leukemia were obtained by Ficoll–Hypaque gradient separation for Western blot analysis or flow

\* Corresponding author. Present address: Rua Carlos Chagas, 480, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Barão Geraldo, CEP: 13083-970 Caixa Postal: 6198 Campinas-SP, Brazil. Fax: +55-19-3289-1089.

E-mail address: [sara@unicamp.br](mailto:sara@unicamp.br) (S. Teresinha Olalla Saad).

cytometry. Human tissues were obtained from autopsy. The National Ethical Committee has approved the study.

**Cell lines.** Human cancer cell lines Jurkat, MOLT-4, K562, U-937, NB4, and HL60 were obtained from ATCC, Philadelphia, PA.

**Computational analysis.** To identify new potential proteins as part of our functional genomics project, we searched the ORESTES database (available at <http://www.ludwig.com.br>) using a keyword search against all expressed sequence tags (ESTs) classified as potential paralogs. Among other ESTs, EST IL5-MT0208-210201-356-f01 (GenBank Accession No. BI028593) was selected and further analyzed through similarity searches against different databases available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the BLAST search algorithm (available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Prosite database searches were performed at <http://www.expasy.cbr.nrc.ca/tools>, using the InterProScan search tool. We also used the sim4 software (downloaded from <http://www.globin.esu.psu.edu>) to compare Human Leukocyte Formin cDNA with its genomic DNA region to obtain the exon-intron structure.

**PCR and sequencing.** The *in silico* inclusion of new sequences to our transcript was confirmed experimentally using PCR of Jurkat cell line cDNA. The cDNA was obtained by means of reverse transcription of Jurkat cell line poly(A)<sup>+</sup> mRNA using Superscript II (Invitrogen Life technologies). Primers were designed using the GeneRunner software (available at <http://www.generunner.com>) and their sequences are available upon request. A schematic representation of the location of the primers in relation to the transcript sequence is depicted in Fig. 1. Amplified products were purified and sequenced in an ABI310 prism automated sequencer. The chromatograms obtained were assembled using the Phred/Phrap/Consed software package (<http://www.phrap.org>).

**Rapid amplification of cDNA ends.** The 5' rapid amplification of cDNA ends (RACE) assays were performed according to the 5' RACE System (Invitrogen Life technologies) protocol. Gene-specific primers were used for reverse transcription of the Jurkat cell poly(A)<sup>+</sup> mRNA, RACE-PCR, and nested PCR (Fig. 1). 3' RACE was performed according to the 3' RACE System (Life Technologies) protocol. In this case reverse transcription was carried out using the 3' RACE adapter primer (supplied in the kit). RACE-PCR and nested PCR were performed with designed primers (Fig. 1).

**Northern blotting.** A 160 bp probe (primers 1 and 2 as depicted in Fig. 1) spanning a region with no conserved domains of human leukocyte formin was amplified from Jurkat cell line cDNA, labeled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP, and used for hybridization to poly(A)<sup>+</sup> mRNA isolated from different normal human tissues (Human 12-lane Multiple Tissue Northern Bolt, and Human Muscle Multiple Tissue Northern Bolt, Human Multiple Tissue Northern Bolt III, Clontech, CA, USA) and from human cancer cell lines (Human Cancer cell line Multiple Tissue Northern Bolt, Clontech, CA, USA).  $\beta$ -Actin was used as an internal control in all hybridization experiments.

**Western blotting.** Equal amounts of protein were used for total extracts or for immunoprecipitation with specific antibodies followed by SDS-PAGE and Western blot analysis with the indicated antibodies and ECL Western Blotting Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, UK) as described [12,13]. Dr. Watanabe (Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan) kindly provided the rabbit polyclonal antibody against Human Leukocyte Formin. Polyclonal antibody against Akt was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Rabbit polyclonal normal IgG (Santa Cruz, CA, USA) was used as control for immunoprecipitation and anti-actin antibody (Santa Cruz, CA, USA) was used as control for immunoblotting.

**Flow cytometry.** For intracellular staining, a sample of the peripheral blood leukocytes ( $1 \times 10^5$  cells) was collected and washed with phosphate-buffered saline (PBS). Cells were fixed and permeabilized in 250  $\mu$ l of Cytofix/Cytoperm solution (Pharmingen, CA, USA), for 20 min, at 4°C in the dark. After the incubation, cells were washed twice in 1  $\times$  Perm/Wash solution (Pharmingen, CA, USA). The cells were incubated with the rabbit polyclonal antibody anti-formin for 20 min, at 4°C, and then washed and stained with FITC-labeling antibody anti-rabbit IgG (Santa Cruz, CA, USA). An isotypic antibody (rabbit polyclonal) was used as control (Santa Cruz, CA, USA). These aliquots were mixed gently and incubated for 20 min at 4°C in the dark, washed in Perm/Wash, and resuspended in staining buffer (PBS-BSA). Fluorescence cell analysis was performed with a FACS-calibur (Becton-Dickinson, CA, USA).

## Results

### Identification of the human leukocyte formin

In a search of the ORESTES database, generated from the Human Cancer Genome Project [14], for ESTs similar to known cytoskeletal proteins (or proteins related to them), the EST IL5-MT0208-210201-356-f01 (GenBank Accession No. BI028593) was found. This EST, 314 bp, was isolated from bone marrow and observed to be similar to the Formin-related proteins. In an attempt to obtain the full-length sequence of this partial cDNA, we employed similarity searches against the human genome database at NCBI and used the genomic sequences obtained to search for new ESTs, which could belong to the same transcript. Primers were designed (Fig. 1) according to the genomic sequence, covered by the ESTs, and PCR and sequencing of the Jurkat cDNA

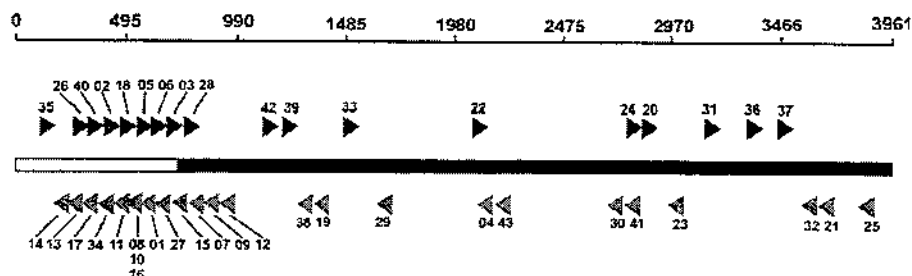


Fig. 1. Schematic representation of the set of primers designed to confirm the known cDNA sequence (1, 2, 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 43) and to obtain the 5' and 3' end sequences by RACE (RACE 5': 7 to 17; RACE 3': 36, 37). Primers 1 and 2 were used to produce the probe for Northern blot analysis. The known KW13 sequence (GenBank Accession No. AF432213) is represented by a filled rectangle and the novel identified 5' sequence is represented by an open rectangle.

were used to validate the inclusion of new sequences into the transcript. It was found that this new partial sequence was highly similar to *Homo sapiens* CLL-associated antigen KW-13 (GenBank Accession No. AF432213), a 3435 bp partial cDNA found in human chronic lymphocytic leukemia (CLL). Again, primers were designed according to this sequence (Fig. 1), and PCR and sequencing methods validated our finding. Rapid amplification of cDNA ends (RACE) was also performed to obtain the 5' and 3' end sequences. Using this approach the whole coding sequence of this gene was obtained and denominated human leukocyte formin.

The cDNA sequence of human leukocyte formin is 3959 bp without the poly(A) tail (GenBank Accession No. AY278319) and has an open reading frame of 3302 bp that starts with an ATG codon at position 201 (Fig. 2), similar to the consensus Kozak initiation sequence (bearing a G at position +4 and an A at position -3) [15], resulting in a 1100 amino acid-containing protein. A potential polyadenylation signal was identified 9 bp upstream of the poly(A) tail.

Analysis of the predicted protein sequence of human leukocyte formin via a search of Protein-Blast, NCBI,

revealed the *frl* protein, in mouse [11], to be orthologous to this protein. The human leukocyte formin protein demonstrated the FH1, FH2, and FH3 domains, which are highly conserved among formin-related proteins (Fig. 3A). The FH1, FH2, and FH3 domains from human leukocyte formin present approximately 88% identity to the mouse *frl* domains (Fig. 3B).

#### Genomic analysis of human leukocyte formin

Computer-generated genomic analysis revealed that this novel gene presents similarity to one contig on the long arm of chromosome 17 (band 17q21.31): NT\_010748.10 (Blastn score = 3824). A sim4 comparison [16] of the chromosome 17 regions with the cDNA sequence suggests that the gene is composed of 27 exons (Fig. 2), spanning a region of at least 30 kb.

#### Expression of the human leukocyte formin gene in human tissues and cell lines

Northern blot analysis of poly(A)<sup>+</sup> RNA isolated from a panel of different human normal tissues revealed

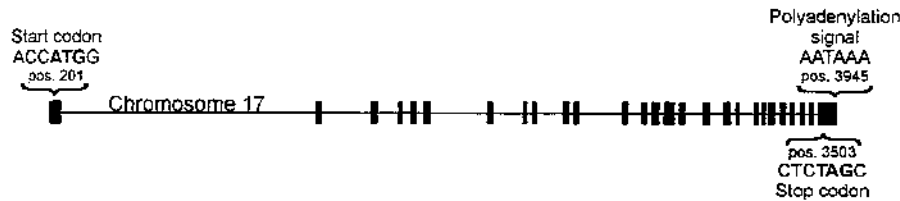


Fig. 2. Schematic view of the genomic organization of human leukocyte formin in chromosome 17 (band 17q21.31). Vertical lines represent exons. The whole coding sequence encompasses at least 30 kb. Start codon, stop codon, and polyadenylation signal are indicated.

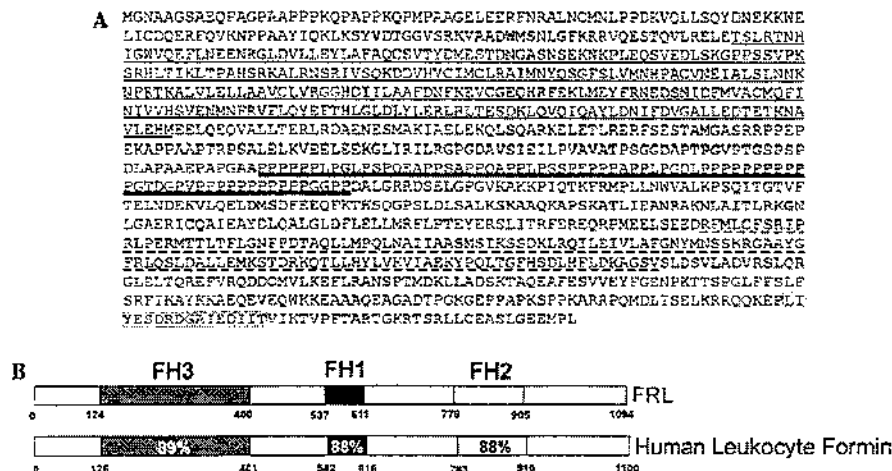


Fig. 3. Protein structure of human leukocyte formin and mouse *frl*. (A) Deduced amino acid sequence of the human leukocyte formin. The FH1 domain is indicated by a bold underline and FH2 by a thin broken line. The FH3 domain is indicated by a thin underline. The peptide used for antibody preparation is shown as an open rectangle. (B) Schematic presentation of human leukocyte formin protein and *frl*. Homology was confirmed by calculating the ratio of the number of identical amino acids from *frl* protein to the number of corresponding amino acids of human leukocyte formin protein and is expressed as a percentage in each indicated region (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). The position of the first and last amino acids in each domain is shown.

a mRNA band of approximately 4.4 kb (Fig. 4). Expression was restricted to the thymus, spleen, and peripheral blood leukocytes in normal human tissues, with a very low expression also observed in placenta and lung. Among cancer cell lines, expression was observed in HL-60, HeLa S3, K-562, Burkitt's, SW 480, A549, and G-36, with the highest expression observed in MOLT-4, a lymphoblastic leukemia.

#### Expression of human leukocyte formin protein in human tissues and cell lines

Western blot analysis was performed for different normal human tissues and cancer cell lines to detect the expression of the endogenous human leukocyte formin protein. Among normal human tissues, no expression of the protein was observed, with the exception of a low

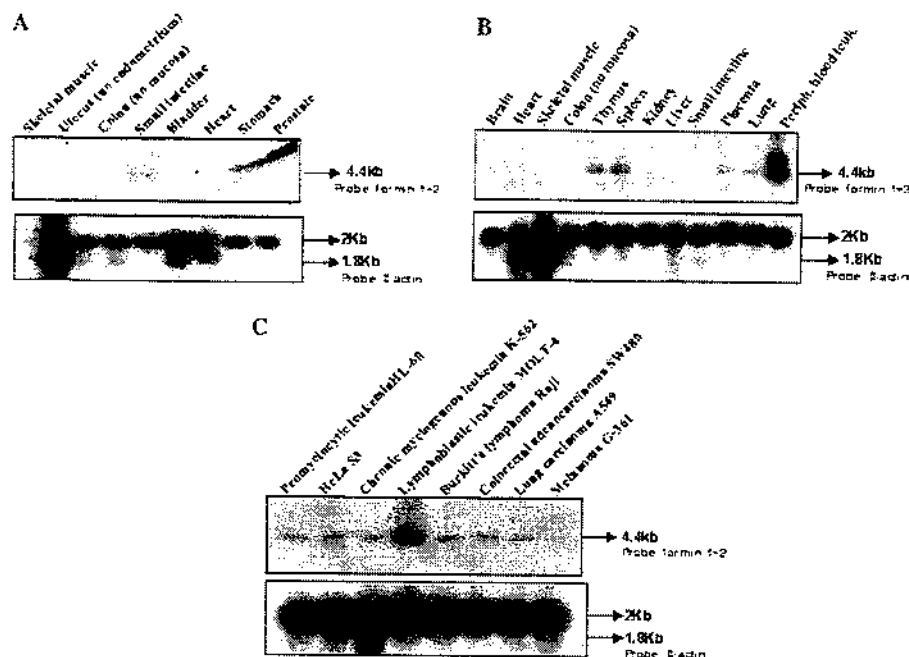


Fig. 4. Northern blot analysis of the human leukocyte formin gene in normal human tissues (A and B) and in human cancer cell lines (C). Primers formin 1 and 2 were used to produce the probe. The amounts of loaded RNA were normalized by the level of  $\beta$ -actin mRNA.

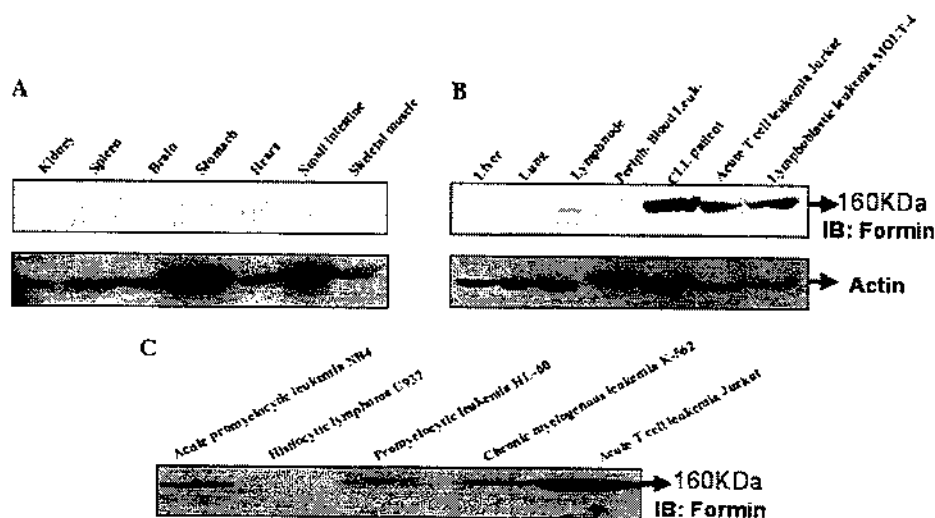


Fig. 5. Western blot analysis of various human normal tissues (A and B) and human cancer cell lines (B and C) for the expression of the human leukocyte formin protein. Total tissue or cell extracts were blotted with rabbit anti-human leukocyte formin antibody and developed with the ECL Western Blotting Analysis System. Membranes A and B were stripped and immunoblotted with anti-actin antibody (Santa Cruz, CA, USA).

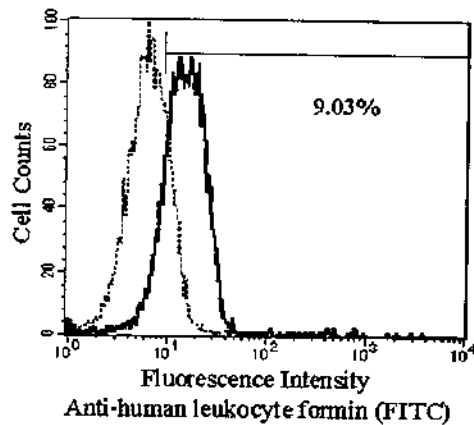


Fig. 6. Flow cytometry of normal human peripheral blood leukocytes. The histogram depicts analysis of 10,000 event lymphocytes incubated with anti-human leukocyte formin protein and stained with a secondary antibody conjugated with FITC. Isotype nonspecific control antibodies were used (dot-dash underline) to determine background levels. The annotated percentage of positive cells (continuous underline) was calculated by subtracting the mean channel fluorescence value from the isotype control values.

expression in lymphonode and normal peripheral blood leukocytes (Fig. 5). Conversely, a high expression of the protein was detected in the lymphoid malignancies, Jurkat cell line (acute T cell leukemia), MOLT-4 cell line (lymphoblastic leukemia), and peripheral blood leukocytes from chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients ( $n = 5$ ). Myeloid and myelomonocytic cancer cell lines; K562, U-937, NB4 and HL60 presented a lower expression (Fig. 5).

Flow cytometry studies confirmed the low expression of the human leukocyte formin protein in normal peripheral blood lymphocytes (Fig. 6). The expression of this protein was detected by flow cytometry only after membrane permeabilization of peripheral blood lymphocytes (Fig. 6) and the Jurkat and K562 cell lines (data not shown), suggesting that the human leukocyte protein is not located on the cell surface.

#### Association of human leukocyte formin with Akt in vivo

Previous evidence suggests that the orthologous mouse protein, *fhl*, may be involved in cell survival signaling, since the overexpression of FH3-*fhl* truncated protein induces apoptosis in a macrophage cell line [11]. The mechanism of this signaling pathway, however, is still unknown. Protein Kinase B, or Akt (PKB/Akt), has emerged as an important regulator of cell survival [17]. In order to investigate whether the human leukocyte formin protein could be involved in the Akt signaling pathway, the interaction between human leukocyte formin and Akt was examined.

Immunoprecipitation analysis was carried out using anti-Akt antibody. As shown in Fig. 7, human leukocyte formin was co-immunoprecipitated with Akt in a protein

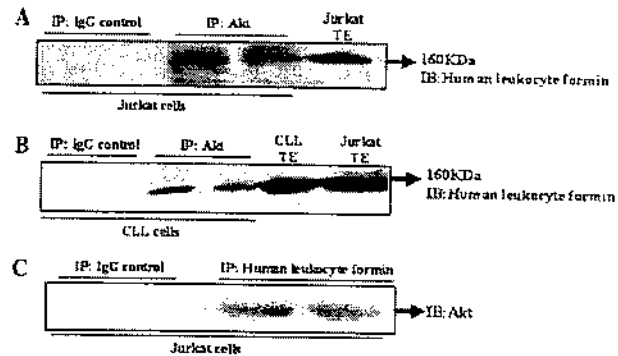


Fig. 7. Association of human leukocyte formin protein with Akt in Jurkat cells (A) and in CLL peripheral blood leukocyte (B). Lysates from the cells containing equal amounts of protein were immunoprecipitated (IP) with anti-Akt antibodies and immunoblotted (IB) with anti-human leukocyte formin antibodies. (A) Representative figure of eight independent experiments and immunoprecipitation was carried out in duplicate. (B) Representative figure of two independent experiments and immunoprecipitation was carried out in duplicate, using cells from CLL patients ( $n = 5$ ). Total extract (TE) from CLL peripheral blood leukocyte and/or from Jurkat cells was used as positive control for the immunoblotting. (C) Reverse assay: lysates from Jurkat cells containing equal amounts of protein were immunoprecipitated (IP) with anti-human leukocyte formin antibodies (duplicate) and immunoblotted (IB) with anti-Akt antibodies. (C) Representative figure of two independent experiments. All experiments were carried out with rabbit polyclonal IgG control for IP. The Western blots were developed with the ECL Western Blotting Analysis System.

extract of the Jurkat cell line (Fig. 7A) and in peripheral blood leukocytes from CLL patients ( $n = 5$ ) (Fig. 7B). To double check this interaction, we performed a reverse assay (Fig. 7C); Akt was co-immunoprecipitated with human leukocyte formin in the protein extract of Jurkat cell, indicating that human leukocyte formin protein associates with Akt in vivo. As a negative control for all assays, we used a rabbit polyclonal IgG. When Jurkat cell lysates were immunoprecipitated with rabbit polyclonal IgG and immunoblotted with anti-Akt or anti-human leukocyte formin, no band was observed (Fig. 7).

#### Discussion

We, herein, report the identification of a novel human gene, related to the formin family, which demonstrates a restricted expression in lymphopoietic tissues and cancer cell lines. This new gene was denominated human leukocyte formin (GenBank Accession No. AY278319). The identification of a previously reported orthologous mouse gene (GenBank Accession No. AF006466) [11] indicates that this human leukocyte formin might belong to a protein family conserved through evolution. This new gene is located in chromosome 17, band 17q21.31 and composed of 27 exons. The cDNA is 3959 bp long and codes for an 1100 amino acid protein, containing the FH1, FH2, and FH3 domains, characteristic in all formin-like proteins.

Northern blot analysis of normal human tissues demonstrated a restricted expression in peripheral blood leukocytes, spleen, and thymus, in contrast to the orthologous mouse gene, which had a much more widespread expression [11]. Among different human cancer cell lines, MOLT-4, a lymphoblastic leukemia cell line, presented the highest expression. Western blot showed no expression of human leukocyte formin protein in normal tissues, except for a low expression in lymph node and peripheral blood leukocytes. Conversely, the human leukocyte formin protein was overexpressed in Jurkat and Molt-4 cell lines and chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. Indeed, part of the human leukocyte formin gene, named KW-13, has already been described as a tumor antigen overexpressed in CLL [18] (GenBank Accession No. AF432213). The pattern of expression of the KW-13 antigen mRNA was similar to that of the human leukocyte formin gene; however, the authors did not report protein studies.

Flow cytometry studies confirmed the low expression of the human leukocyte formin protein in normal peripheral blood lymphocytes. The expression of this protein was detected by flow cytometry only after membrane permeabilization of cells, suggesting that the human leukocyte protein is not located on the cell surface.

It is important to point out that a high expression of human leukocyte formin protein was observed in lymphoid malignancies. In fact, the protein was overexpressed in Jurkat and Molt-4 cell lines as well as in CLL peripheral blood leukocytes. Interestingly, in lymphoid malignancies, lack of PTEN has been described. PTEN is a tumor suppressor gene that is mutated/deleted in a variety of different human tumors. Cells lacking PTEN have elevated levels of  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_2$  and  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  and constitutive activation of PI3K signaling pathways including high basal levels of PKB/Akt function [19–21]. Many T leukemia cell lines lack PTEN and, consequently, have high basal levels of PKB activity [21,22]. The Jurkat cell line, for example, presents high basal levels of PKB activity. The absence of PTEN protein in B-CLL with normal PTEN genotype has been recently demonstrated, suggesting that this phosphatase has a role in the molecular pathology of B-CLL [23]. The fact that the overexpression of human leukocyte formin protein is only observed in cells that coincidentally have a deregulation of PTEN expression suggests a relationship between these two phenomena.

Studies performed in the orthologous mouse protein [11], *fhl*, showed that the overexpression of truncated FH3 domain-*fhl* leads to a decrease in migrating activity, inhibition of cell growth, and induced apoptotic cell death in a macrophage cell line. These results suggest that *fhl* may play a role in the control of reorganization of the actin cytoskeleton in association with Rac and also in the regulation of the signal for cell survival;

however, the pathway involved in cell survival is still unknown. In recent years, Akt has emerged as a critical survival regulator in many different cell types. We found an association between Akt and human leukocyte formin protein in Jurkat cells and peripheral blood leukocytes from CLL patients. The interaction between Akt and human leukocyte formin protein suggests a potential role of this human leukocyte formin protein in the Akt signaling pathway. In Jurkat cells, Akt is constantly activated and membrane localized, but the mechanism for regulation of membrane bound Akt activity is unknown. Alternatively, the association of Akt and human leukocyte formin may aid in the regulation of the PKB activity.

Finally, we have identified a novel human gene, human leukocyte formin, overexpressed in lymphoid cancer cells and associated with Akt. Future studies to describe the function of this protein should be performed to better understand its role in the cancer molecular pathology of CLL.

## Acknowledgments

We thank David Gordon, Brent Ewing, and Phil Green for the Phred/Phrap/Consed software package, and Dr. Takeshi Watanabe for providing the rabbit polyclonal anti-FRL antibody. We would also like to thank Dr. Nicola Conran for English revision. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), and Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## References

- [1] A.J. Ridley, Stress fibres take shape, *Nat. Cell Biol.* 1 (1999) E64–E66.
- [2] S. Wasserman, FH proteins as cytoskeletal organizers, *Trends Cell Biol.* 8 (1998) 111–115.
- [3] R. Zeller, A.G. Haramis, A. Zuniga, C. McGuigan, R. Dono, G. Davidson, S. Chabanis, T. Gibson, Formin defines a large family of morphoregulatory genes and functions in establishment of the polarising region, *Cell Tissue Res.* 296 (1999) 85–93.
- [4] D. Pruyne, M. Evangelista, C. Yang, E. Bi, S. Zigmond, A. Bretscher, C. Boone, Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association, *Science* 297 (2002) 612–615.
- [5] I. Sagot, A.A. Rodal, J. Moseley, B.L. Goode, D. Pellman, An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin, *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) 626–631.
- [6] H. Imamura, K. Tanaka, T. Hihara, M. Umikawa, T. Kamei, K. Takahashi, T. Sasaki, Y. Takai, Bni1p and Bnrlp: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*, *Embo J.* 16 (1997) 2745–2755.
- [7] R. Ren, B.J. Mayer, P. Cicchetti, D. Baltimore, Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site, *Science* 259 (1993) 1157–1161.
- [8] D.C. Chan, M.T. Bedford, P. Leder, Formin binding proteins bear WWP/WW domains that bind proline-rich peptides and functionally resemble SH3 domains, *Embo J.* 15 (1996) 1045–1054.

- [9] M.T. Bedford, D.C. Chan, P. Leder, FBP WW domains and the Abl SH3 domain bind to a specific class of proline-rich ligands, *Embo J.* 16 (1997) 2376–2383.
- [10] J. Petersen, O. Nielsen, R. Egel, I.M. Hagan, FH3, a domain found in formins, targets the fission yeast formin Fus1 to the projection tip during conjugation, *J. Cell Biol.* 141 (1998) 1217–1228.
- [11] S. Yayoshi-Yamamoto, I. Taniuchi, T. Watanabe, FRL, a novel formin-related protein, binds to Rac and regulates cell motility and survival of macrophages, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 6872–6881.
- [12] F. Traina, J.B. Carnevali, M.J. Saad, F.F. Costa, S.T. Saad, BCR-ABL binds to IRS-1 and IRS-1 phosphorylation is inhibited by imatinib in K562 cells, *FEBS Lett.* 503 (2003) 17–22.
- [13] F. Folli, M.J. Saad, J.M. Backer, C.R. Kahn, Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 22171–22177.
- [14] E. Dias Neto, R.G. Correa, S. Verjovski-Almeida, M.R. Briones, M.A. Nagai, W. Da Silva Jr., M.A. Zago, S. Bordin, F.F. Costa, G.H. Goldman, A.F. Carvalho, A. Matsukuma, G.S. Baia, D.H. Simpson, A. Brunstein, P.S. De Oliveira, P. Bucher, C.V. Jongeneel, M.J. O'hare, F. Soares, R.R. Brentani, L.F. Reis, S.J. De Souza, A.J. Simpson, Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 3491–3496.
- [15] M. Kozak, Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes, *Gene* 234 (1999) 187–208.
- [16] L. Florea, G. Hartzell, Z. Zhang, G.M. Rubin, W. Miller, A computer program for aligning a cDNA sequence with a genomic DNA sequence, *Genome Res.* 8 (1998) 967–974.
- [17] K.M. Nicholson, N.G. Anderson, The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy, *Cell Signal.* 14 (2002) 381–395.
- [18] A.M. Krackhardt, M. Witzens, S. Harig, F.S. Hodi, A.J. Zauls, M. Chessia, P. Barrett, J.G. Gribben, Identification of tumor-associated antigens in chronic lymphocytic leukemia by SEREX, *Blood* 100 (2002) 2123–2131.
- [19] V. Stambolic, A. Suzuki, J.L. De La Pompa, G.M. Brothers, C. Mirtsos, T. Sasaki, J. Ruland, J.M. Penninger, D.P. Siderovski, T.W. Mak, Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN, *Cell* 95 (1998) 29–39.
- [20] L.C. Cantley, B.G. Neel, New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 4240–4245.
- [21] X. Shan, M.J. Czar, S.C. Bunnell, P. Liu, Y. Liu, P.L. Schwartzberg, R.L. Wange, Deficiency of PTEN in Jurkat T cells causes constitutive localization of Itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to CD3 stimulation, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 6945–6957.
- [22] E. Astoul, C. Edmunds, D.A. Cantrell, S.G. Ward, PI 3-K and T-cell activation: limitations of T-leukemic cell lines as signaling models, *Trends Immunol.* 22 (2001) 490–496.
- [23] N. Leupin, B. Cenni, U. Novak, B. Hugli, H.U. Graber, A. Tobler, M.F. Fey, Disparate expression of the PTEN gene: a novel finding in B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL), *Br. J. Haematol.* 121 (2003) 97–100.