

LUCIANA SARMENTO MOREIRA

**GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM CÉLULAS
ERITRÓIDES TRATADAS COM HIDROXIURÉIA E
POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS COM A REATIVAÇÃO DA
SÍNTESE DE HEMOGLOBINA FETAL**

***CAMPINAS
2008***

LUCIANA SARMENTO MOREIRA

**GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM CÉLULAS
ERITRÓIDES TRATADAS COM HIDROXIURÉIA E
POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS COM A REATIVAÇÃO DA
SÍNTESE DE HEMOGLOBINA FETAL**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título de
Doutor em Clínica Médica, área de concentração
Ciências Básicas.*

ORIENTADOR: *Prof. Dr. Fernando F. Costa*

**CAMPINAS
2008**

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

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

M813g	Moreira, Luciana Sarmento “Genes diferencialmente expressos em células eritroides tratadas com hidroxiuréia e potencialmente envolvidos com a reativação da síntese de hemoglobina fetal” / Luciana Sarmento Moreira. Campinas, SP : [s.n.], 2008. Orientador : Fernando Ferreira Costa Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Hidroxiuréia. 2. Células eritroides. 3. Expressão gênica. 4. Anemia falciforme. 5. Biblioteca gênica. I. Costa , Fernando Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	---

Título em inglês : “Differentially expressed genes in hydroxyurea treated erythroid cells and potentially involved in the reactivation of fetal hemoglobin”

Keywords:

- Hydroxyurea
- Erythroid cells
- Gene Expression
- Sickle cell anemia
- Library genic

Titulação: Doutor em Clínica Médica
Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa
Prof. Dr. Nicola Conran Zorzetto
Prof. Dr. Antonio Fabron Junior
Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto
Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves

Data da defesa: 14 - 08 - 2008

Banca examinadora da tese de Doutorado

Luciana Sarmiento Moreira

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Marilda de Souza Gonçalves

2. Prof. Dr. Antonio Fabron Junior

3. Prof^a. Dr^a. Nicola Amanda Conran Zorzetto

4. Prof^a. Dr^a. Helena Zerlotti Wolf Grotto

5. Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

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

Data: 14/08/2008

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, pela receptividade, orientação e dedicação demonstrada ao longo deste doutorado;

Aos funcionários e colegas dos laboratórios do hemocentro – UNICAMP, especialmente à Ducineia, Anderson, Flávia, Roberto e Fabíola, que auxiliaram o desenvolvimento dos experimentos relativos a este trabalho, minha gratidão pela ajuda e dedicação incessante;

Aos meus queridos amigos da UNICAMP, em especial Márcia e Eliane, pelo apoio constante nesse período;

Aos meus pais “in memoriam”, pela educação e formação que me permitiram trilhar meu caminho com êxito e felicidade;

Aos meus familiares, em especial à tia Valderez, pela confiança e felicidade sempre presentes durante todos esses anos;

Ao Tiago, meu companheiro, por todo apoio na elaboração, realização e conclusão desta tese e pelo companherismo durante os anos que trabalhamos juntos;

Aos meus amigos de Maceió, em especial Rosa, pelo carinho e apoio mesmo à distância em todos os momentos;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro;

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente, não só para realização desse trabalho mas também para minha vida durante esses anos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE FIGURAS	xix
RESUMO	xxv
ABSTRACT	xxix
1- Introdução	33
1.1. Hemoglobinas.....	35
1.2. Causa genética e fisiopatologia da AF:	39
1.3. Reativação de Hb F por Hidroxiuréia.....	40
2- Objetivos	45
2.1 - Objetivo Geral.....	47
2.2 - Objetivos Específicos.....	47
3- Casuísticas e Métodos	49
3.1. Pacientes e Dados Hematológicos:.....	51
3.2. Isolamento de Reticulócitos:	52
3.3. Cultura de Linhagem K562	52
3.4. Citometria de Fluxo	53
3.5. Extração de RNA.....	54
3.6. Identificação de genes diferencialmente expressos utilizando Bibliotecas Subtrativas Supressivas (<i>Subtractive Suppression Hybridization-SSH</i>).	55
3.6.1. Síntese e amplificação de cDNA para construção das bibliotecas	57
3.6.2. Purificação do cDNA e Digestão com RsaI	59
3.6.3. Ligação dos adaptadores.....	60
3.6.4. Hibridizações Subtrativas.....	60
3.6.5. Teste de eficiência da Subtração	61
3.6.6. Amplificações por PCR.....	64
3.6.7. Clonagem e sequenciamento	67
3.6.8. Análise das seqüências geradas	68

3.7. PCR quantitativo em tempo Real (qRT-PCR).....	68
4- Resultados	73
4.1. Bibliotecas Subtrativas	75
4.2. Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real	90
5- Discussão.....	97
6- Conclusões	111
7- Referências Bibliográficas	115
8-Anexos.....	131

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Anemia Falciforme
cAMP	AMP cíclico
CBP	<i>Creb Binding Protein</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	deoxinucleotídeo trifosfato
Hb F	Hemoglobina Fetal
Hb S	Hemoglobina S
HS	<i>Hypersensitivity sites</i>
HU	Hidroxiuréia
Kb	Kilobase
LCR	<i>Locus Control Region</i>
L	Litros
µL	Microlitros
min	Minutos
mL	Mililitros
mmol	Milimol
ng	Nanogramas

pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain reaction</i>
pmol	Picomol
PYR	<i>Polypyrimidine-rich</i>
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real.
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
r.p.m	Rotações por minuto
SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
Seg.	Segundos
SSH	<i>Subtractive Suppresion Hybridization</i>
U	Unidades

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados clínicos e hematológicos dos grupos de pacientes portadores de AF estudados.	51
Tabela 2. Iniciadores usados em análise de expressão gênica, utilizando experimentos de PCR em tempo real, em Biblioteca Subtrativas.	71
Tabela 3. Transcritos encontrados na biblioteca K562-0h.	76
Tabela 4. Transcritos encontrados na biblioteca K562-HU72hs.	81
Tabela 5. Transcritos encontrados na biblioteca RetHU-SSH.	86
Tabela 6. Transcritos encontrados na biblioteca Ret-SSH.	88
Tabela 7. Resultados de qRT-PCR para culturas de K562. Valores correspondem à média obtida de duas culturas independentes e normalizados utilizando GAPDH e B2M como controles internos.	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização dos genes de globina nos cromossomos 11 e 16 e <i>switching</i> de globinas ao longo do desenvolvimento ontogenético humano. Adaptado de WEATHERALL 2001.....	38
Figura 2. Citometria de fluxo com anticorpo anti-HbF. Em A, células de K562 sem tratamento com HU (K562-0h) e em B, células após 72hs de tratamento com HU.....	53
Figura 3. Representação do processo de obtenção de bibliotecas subtrativas. O detalhamento do processo pode ser encontrado no texto. Adaptado de DIATCHENKO <i>et al</i> , 1996.....	57
Figura 4. Padronização do número de ciclos de PCR para amplificação do cDNA a ser utilizado na construção da biblioteca subtrativa. As amostras de cDNA correspondem a pacientes com AF tratados com HU. 1 - Marcador de peso molecular ϕ X Hae III; 2- 26 ciclos; 3- 28 ciclos; 4- 30 ciclos; 5- 32 ciclos; 6- 34 ciclos; 7- 36 ciclos; 8- 38 ciclos; 9- 40 ciclos.	59
Figura 5. Padronização do número de ciclos de PCR para amplificação do cDNA a ser utilizado na construção da biblioteca subtrativa. As amostras de cDNA correspondem a pacientes com AF não submetidos ao tratamento com HU. 1 - Marcador de peso molecular ϕ X Hae III; 2- 26 ciclos; 3- 28 ciclos; 4- 30 ciclos; 5- 32 ciclos; 6- 34 ciclos; 7- 36 ciclos; 8- 38 ciclos; 9- 40 ciclos.....	60
Figura 6. Teste de eficiência de subtração para as amostras de cDNA de cultura de K562 0h. A- PCR de amostras após hibridização subtrativa. B – PCR das amostras não subtraídas. Marcador de peso molecular ϕ X 174 HaeIII; 2- 18 ciclos; 3 – 23 ciclos; 4. 28 ciclos; 5 – 33 ciclos.....	62
Figura 7. Teste de eficiência de subtração para as amostras de cDNA de cultura de K562-HU72h. A- PCR de amostras após hibridização subtrativa. B – PCR das amostras não subtraídas. Marcador de peso molecular ϕ X 174 HaeIII; 2- 18 ciclos; 3 – 23 ciclos; 4. 28.....	63

Figura 8. 1ª amplificação do cDNA subtraído de amostras de K562. 1- Marcador de peso molecular ϕ X 174 HaeIII; 2- cDNA de K562-0h após subtração; 3- cDNA K562-0h não subtraído; 4- cDNA de K562-HU72hs após subtração; 6- cDNA de K562-HU72hs não subtraído.....	65
Figura 9. 1ª amplificação do cDNA subtraído de amostras de pacientes com AF. 1- Marcador de peso molecular ϕ X 174 HaeIII; 2- cDNA de pacientes AF tratados com HU, após subtração; 3- cDNA de pacientes AF tratados com HU, não subtraído; 4- cDNA de pacientes AF não submetidos a tratamento com HU, após subtração; 6- cDNA de pacientes AF não submetidos a tratamento com HU, não subtraído.	65
Figura 10. 2ª amplificação do cDNA subtraído (PCR <i>Nested</i>) de pacientes com AF. 1- Marcador de peso molecular ϕ X 174 HaeIII; 2- cDNA de pacientes AF tratados com HU, após subtração; 3- cDNA de pacientes AF tratados com HU, não subtraído; 4- cDNA de pacientes AF não submetidos a tratamento com HU, após subtração; 6- cDNA de pacientes AF não submetidos a tratamento com HU, não subtraído.	66
Figura 11. 2ª amplificação do cDNA subtraído (PCR <i>Nested</i>) de K562. 1 - Marcador de peso molecular ϕ X 174 HaeIII; 2- cDNA de K562-0h após subtração; 3- cDNA K562-0h não subtraído; 4- cDNA de K562-HU72hs após subtração; 6- cDNA de K562-HU72hs não subtraído.....	66
Figura 12. Amplificação dos insertos das bibliotecas subtrativas com iniciadores M13. 1 e 13- Marcador de peso molecular ϕ X 174 haeIII. 2-12 e 14-24 - Clones das bibliotecas subtrativas.	68
Figura 13. Expressão por qRT-PCR de genes selecionados em culturas de K562 tratadas e não tratadas com HU. Os valores apresentados representam as porcentagens de expressão gênica diferencial em amostras com HU após 72hs da administração (K562-HU72hs), relativas à células de K562 sem HU (K562-0h).	91

Figura 14. Experimentos de expressão gênica em reticulócitos de pacientes com AF tratados e não tratados com HU, de genes detectados nas bibliotecas de K562. Para cada grupo, o número de pacientes foi de 8 indivíduos, com exceção de STAT5A no grupo não tratado com HU (n=6). Os genes das globinas HBA, HBB e HBG também foram estudados nestes pacientes. Os valores de P foram significativos para HBG (p=0.014), STAT5B (p=0.01), NACA (p<0.001) e CRT2 (p=0.019). HBA (p=0.29), HBB (p=0.32), STAT5A (p=0.41), SMARCA4 (p=0.16), ZHX1 (p=0.52).	94
Figura 15. Experimentos de expressão gênica em reticulócitos de pacientes com AF tratados e não tratados com HU, de genes detectados nas bibliotecas de reticulócitos. Os dados para globinas também são apresentados como referência. Para cada grupo, o número de pacientes foi de 8 indivíduos. Os valores de P foram significativos para HBG (p=0.014) e ZDHHC2 (p=0.005). PHC3 (p=0.25), HBA (p=0.29), HBB (p=0.32).	95

RESUMO

Anemia Falciforme (AF) é uma desordem hereditária das hemoglobinas, causada por uma substituição de um único nucleotídeo adenina por timina (GAG→GTG), que resulta na presença de um aminoácido valina ao invés de ácido glutâmico na cadeia β e na formação de uma hemoglobina anormal denominada hemoglobina S (Hb S). Hb S possui uma tendência de polimerização no estado deoxigenado. O grau de polimerização de Hb S na circulação determina o quanto um indivíduo terá crises vaso-oclusivas ou outro evento adverso. Altos níveis de hemoglobina fetal (Hb F) durante a vida adulta estão associados a uma melhora nos sintomas clínicos da AF devido à sua habilidade em inibir a polimerização de Hb S. Consequentemente, a busca por moduladores terapêuticos de Hb F continua a motivar a pesquisa básica e clínica, resultando em vários agentes farmacológicos que tem demonstrado um efeito no aumento da produção de Hb F. Hidroxiuréia (HU) é um fármaco que tem sido utilizado com sucesso na terapia de AF. Estudos multicêntricos demonstram que a administração de HU a pacientes com AF aumenta significativamente a produção de HbF e melhora os sintomas clínicos, pela redução da frequência de crises de dor e vaso-oclusivas, síndrome torácica aguda, necessidade de transfusões e hospitalizações. Acredita-se que HU beneficie indivíduos com AF através de vários mecanismos, incluindo o aumento dos níveis de Hb F. HU também promove a proliferação de precursors eritróides e uma diferenciação eritróide acelerada. Entretanto, o mecanismo completo de atuação da HU permanece desconhecido. Tem sido demonstrado que HU induz a expressão do gene γ -globina, possivelmente pela indução da via da guanilato ciclase, ou pelo aumento da expressão de fatores de transcrição, como EGR1, GATA-1 e outros genes com papel importante na eritropoese. Em um estudo recente, o padrão de expressão gênica global de células de medula óssea humana foi avaliado em uma paciente com AF antes e após a administração de HU, utilizando SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*). Os autores identificaram vários genes envolvidos em diversos processos biológicos, tais como fatores de transcrição, transdução de sinal e atividade de transporte de canal ou poro, que podem representar novos alvos para a terapia da AF. Aqui, neste trabalho, nós investigamos o possível envolvimento de genes na indução da transcrição de

γ -globina, utilizando o método SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*) como um rastreamento inicial para identificar transcritos diferencialmente expressos na linhagem eritroleucêmica K562 com e sem a administração de HU, e reticulócitos obtidos de pacientes com AF (SSH) submetidos ou não submetidos ao tratamento com HU. A expressão de alguns genes identificados também foi avaliada por PCR em tempo real. Nós identificamos NACA (*nascent-polypeptide-associated complex alpha subunit*), STAT5 (*signal transducer and activator of transcription-5*), CRTC2 (*CREB regulated transcription coactivator 2*), ZDHHC2 (*zinc finger, DHHC-type containing 2*), dentre outros genes diferencialmente expressos, e confirmamos, por PCR em tempo real, seu aumento de expressão em reticulócitos de um grupo de pacientes em tratamento com HU. Como discutido aqui, estes genes podem desempenhar um papel importante no mecanismo de ação da HU. Este é o primeiro estudo demonstrando uma associação entre o tratamento com HU e a expressão dos genes descritos em células eritróides. Entretanto, estas alterações podem ter um papel importante no aumento típico de HbF nas células de pacientes tratados com HU e na diferenciação eritróide. Estudos funcionais posteriores com os genes mencionados podem ajudar na elucidação de seu papel potencial na regulação de globinas e na diferenciação eritróide mediada por HU ou outros agentes quimioterápicos, bem como contribuir para a compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos em patologias das células eritróides, como AF e talassemias.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is an inherited disorder of hemoglobin, caused by a single nucleotide substitution of thymidine for adenine (GAG→GTG) in the β -chain that results in the presence of the amino acid valine instead of glutamic acid and the formation of an abnormal hemoglobin called hemoglobin S (Hb S). Hb S is responsible for alterations in the properties of the hemoglobin tetramer, which has a tendency to polymerize in the deoxygenated state. The degree of Hb S polymerization in the circulation determines how likely the individual is to experience a vaso occlusive crisis or other adverse event. High levels of fetal haemoglobin (Hb F) during adult life have long been recognized to ameliorate the clinical symptoms of SCA due to its ability to inhibit the polymerization of Hb S. Consequently, the decades-long search for therapeutic modulators of Hb F has continued to motivate basic and clinical investigators alike. As a result, several pharmacological agents have been shown to increase Hb F production. A drug that has been successfully used for therapy in SCA is hydroxyurea (HU). Multicenter studies have shown that HU administration to SCA patients significantly increases Hb F production and improves clinical symptoms by reducing the frequency of pain and vaso-occlusive crisis, acute chest syndrome, transfusion requirements and hospitalizations. This drug is thought to benefit SCA individuals via several mechanisms, including the increase of Hb F levels. HU also promotes proliferation of erythroid precursors and an accelerated erythroid differentiation. However the complete pathway by which HU acts remains unclear. HU has been shown to induce the expression of γ -globin genes, possibly by the induction of guanylate cyclase protein kinase G pathways, or by the enhancement of the expression of transcription factors, such as early growth response 1 (EGR1), GATA-1 and other genes with important roles in erythropoiesis. In a recent study, Costa et. al. evaluated the global gene expression pattern of human bone marrow cells from a SCA patient before and after the administration of HU, using SAGE (Serial Analysis of Gene Expression). These authors identified a set of genes involved in various such as pathways as transcriptional factors, signal transduction and channel or pore class transporter activity that may represent new targets for SCA therapy. We herein, investigated the possible involvement of genes in HU-

mediated induction of fetal globin transcription, using the suppression subtractive hybridization (SSH) method as an initial screen to identify differentially-expressed transcripts in K562 erythroleukemia cell line without and under HU administration and reticulocytes obtained from SCA patients in use or not of HU treatment. The expression of some of the detected genes were also evaluated using Real Time PCR. We identified NACA (nascent-polypeptide-associated complex alpha subunit), STAT5 (Signal transducer and activator of transcription-5), CRTCL2 (CREB regulated transcription coactivator 2), ZDHHC2 (zinc finger, DHHC-type containing 2) transcripts, among other differentially expressed genes, and confirmed, by Real-Time PCR, their over-expression upon HU treatment in circulating reticulocytes from SCA patients. As discussed herein, these genes may play an important role in the mechanism of action of HU.

1- Introdução

As anemias em geral são caracterizadas por diminuição na capacidade de transporte de oxigênio nas células. Esse quadro pode ser decorrente da baixa concentração de hemoglobinas (Hb) nas hemácias ou da diminuição da disponibilidade destas células. A Anemia Falciforme (AF), é uma hemoglobinopatia autossômica recessiva, caracterizada clinicamente como anemia hemolítica crônica. Na AF as hemácias sofrem modificações e tornam-se bastante anormais, falcizadas, forma celular que caracteriza a doença (BUNN, 1997; STEINBERG *et al.*, 2003).

Estudos indicam que a origem da AF se deu no oeste da África, sendo trazida no período da escravidão para as Américas (STEINBERG *et al.*, 2003). Atualmente é encontrada também na Europa e Ásia. No Brasil, o percentual estimado de afros-descendentes portadores da forma heterozigótica de Hb S é de cerca de 5 a 10% da população. Entretanto, no Sudeste do país o valor percentual de portadores é menor que o encontrado nacionalmente, cerca de 2% (ZAGO *et al.*, 1983; GONCALVES *et al.*, 1994). Embora haja prevalência da AF na população negra, os brancos, particularmente aqueles provenientes de regiões do Mediterrâneo (Grécia, Itália), Oriente Médio e Índia, também apresentam a doença. No Brasil, além da considerável população negra, ainda ocorre intensa miscigenação racial, o que contribui para a presença de alelos falciformes em população não negra (ZAGO *et al.* 1983).

Os indivíduos homozigotos para esta hemoglobinopatia apresentam diversas manifestações clínicas, principalmente em razão da obstrução vascular, como: distúrbio hemolítico, atraso no crescimento, infecções repetidas, infartos dolorosos em diversos tecidos e hipofunção esplênica. A gravidade da doença é considerada variável e a mortalidade pode não ser elevada se o paciente dispuser de assistência médica (PISSARD *et al.*, 1994; RODGERS, 1997).

1.1. Hemoglobinas

A molécula de Hb é um tetrâmero globular, formado por duas subunidades de cadeias polipeptídicas denominadas globinas, sendo duas cadeias do tipo α e duas cadeias do tipo β . Os dois tipos de cadeias são bastante semelhantes tanto na seqüência de aminoácidos, possuindo a cadeia α -globina 141 aminoácidos e a β -globina 146, quanto na

configuração tridimensional da proteína. A Hb possui também um grupamento prostético, que combina-se reversivelmente com o oxigênio permitindo o seu transporte. O mesmo é representado por um radical heme, formado por quatro núcleos de ferriporfirina que a mantém no estado ferroso, lhe confere a coloração vermelha característica e a classifica como pertencente ao grupo das cromoproteínas (BUNN, 1997).

Os genes que codificam as cadeias de globinas constituem uma família multigênica separada em dois grupos (*clusters*), contidos nos cromossomos 16 e 11 (Figura 1). No braço curto do cromossomo 16 são encontrados os genes do grupo α e no 11 os do grupo β . O primeiro grupo inclui os genes para as cadeias zeta (ζ), alfa (α) e teta (θ), além do pseudogene $\Psi\alpha_1$. Os quatro genes funcionais desse grupo são genes duplicados, ou seja, existem dois genes ζ (ζ_2 e ζ_1) e dois genes α (α_1 e α_2). Enquanto que o segundo grupo é constituído pelos genes que codificam as cadeias épsilon (ϵ), gama (γ^A e γ^G), delta (δ), beta (β) e o pseudogene $\Psi\beta$. A estrutura similar encontrada entre essas cadeias sugere que esses genes se originaram, em algum ponto primitivo da evolução, a partir da duplicação de um único gene ancestral comum (PAPAYANNOPOULOU & STAMATOYANNOPOULOS, 1980).

A expressão destes genes se dá na mesma ordem linear em que estão dispostos nos cromossomos, levando a produções equimolares das cadeias de globina similares a α e β , mudanças (*switching*) na expressão gênica das globinas de cada grupo, e no sítio de eritropoese ao longo do desenvolvimento (BUNN & FORGET, 1986; BARON, 1997). A composição de globinas varia, assim, nas fases embrionária, fetal e pós-nascimento ou adulto, resultando em hemoglobinas diferentes (STAMATOYANNOPOULOS *et al.* 2001).

Durante o período embrionário são sintetizadas as hemoglobinas Gower I formada por cadeias ζ_2 e ϵ_2 ; Gower II, formada por α_2 e ϵ_2 e Portland formada por ζ_2 e γ_2 , sendo o saco vitelino o principal sítio de eritropoese. No período fetal, a partir da quinta semana de gestação, ocorre a síntese de hemoglobina fetal (Hb F), formada por cadeias α_2 e γ_2 e transferência do sítio de eritropoese para o fígado e baço. A Hb F

permanece sendo expressa em níveis elevados até o nascimento do bebê onde constitui cerca de 70% da Hb total, decaindo após seis meses de nascimento para cerca de 1%. Durante a vida adulta são expressas Hb A₁ (α_2 e β_2), com cerca de 97% do total da hemoglobina e Hb A₂ (α_2 e δ_2), com 2 a 3%, além da Hb F em baixas quantidades (STAMATOYANNOPOULOS *et al.* 2001). Neste estágio a medula óssea passa a ser o principal sítio de eritropoese. (BLAU & STAMATOYANNOPOULOS, 1994; BUNN, 1997; BARON, 1997; (STAMATOYANNOPOULOS *et al.* 2001). (Figura 1).

A regulação dos genes dispostos no *cluster* da β -globina humana é um dos modelos de expressão gênica mais estudados e envolve elementos regulatórios *cis*, que compreendem promotores, silenciadores, o *Locus Control Region* (LCR), e fatores de transcrição (elementos *trans*) ubíquos ou eritróide específicos (HARJU *et al.*, 2002; BANK 2006). Alguns fatores de transcrição importantes para a regulação das globinas incluem NF-E2 (ANDREWS *et al.*, 1993; GONG *et al.*, 1996; SHAVIT *et al.*, 1998; FOSBERG *et al.*, 2000), o *zinc finger* eritróide específico GATA-1, que possui múltiplos sítios de ligação nos promotores dos genes e no LCR, (MERIKA *et al.*, 1993; RAICH *et al.*, 1995; LI *et al.*, 1998); FOG (*friend of GATA-1*) (TSANG *et al.*, 1997; TSANG *et al.*, 1998); KLF1 ou EKLF (*Erythroid Krüppel-like factor*), um *zinc finger* ativador da transcrição de β -globina, (MILLER *et al.*, 1993) que também tem participação na estrutura cromatínica do locus e tem sido implicado no processo de troca de globinas (DONZE *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 1999); KLF11 ou FKLF (*Fetal Krüppel-like factor*) com participação importante na expressão dos genes ϵ e γ (ASANO *et al.*, 2000), dentre outros.

Acredita-se que a combinação de vários fatores seja necessária para taxas máximas ou adequadas de transcrição, e a habilidade para interagir em múltiplos padrões permite um potencial para uma enorme diversidade de funções, o que destaca a complexidade da regulação da expressão destes genes (JANE, 1998; STAMATOYANNOPOULOS *et al.*, 2001).

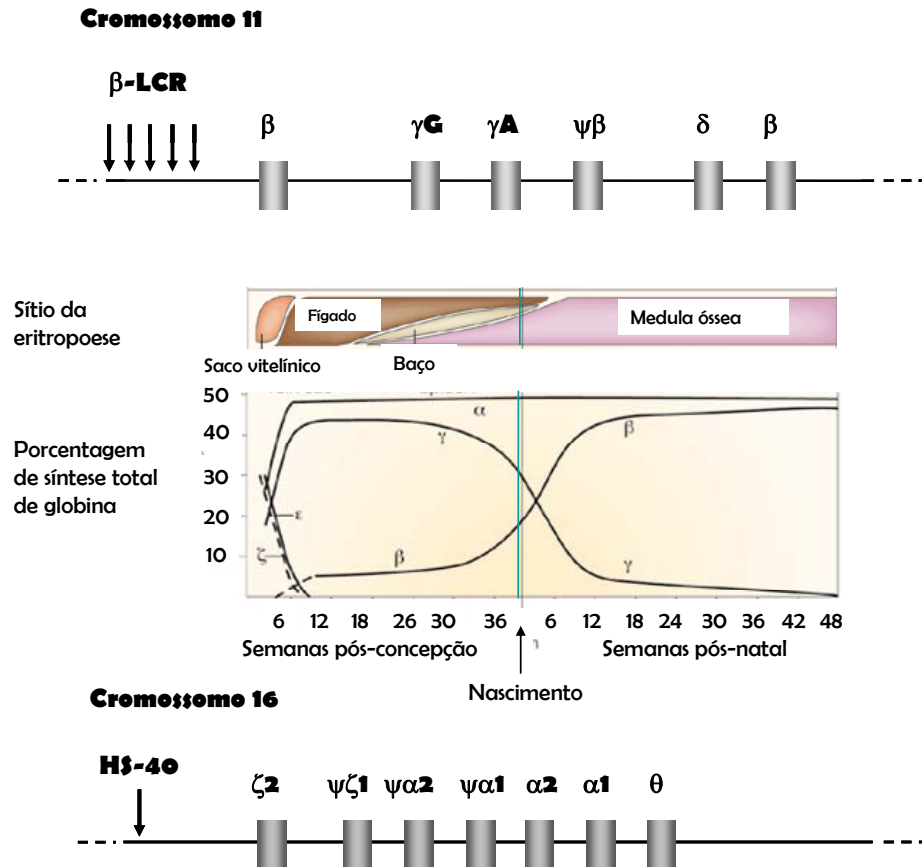


Figura 1. Organização dos genes de globina nos cromossomos 11 e 16 e *switching* de globinas ao longo do desenvolvimento ontogenético humano. Adaptado de WEATHERALL 2001.

1.2. Causa genética e fisiopatologia da AF:

A AF é caracterizada molecularmente por uma mutação de ponto no códon seis do gene β globina, levando a formação de uma variante estrutural denominada Hb S, composta por cadeias α_2 e β_2^S . A mutação consiste em uma substituição de uma adenina por uma timina ($GAG \rightarrow GTG$) levando a produção de uma valina ao invés de um ácido glutâmico (BUNN 1997). A homozigose para esta mutação é a causa da AF, já os heterozigotos que possuem Hb A e Hb S, apresentam o traço falcêmico e são clinicamente normais. Suas hemácias afoiçam-se quando submetidas à pressão de oxigênio muito baixa *in vitro*, entretanto, as ocasiões em que este fenômeno pode ocorrer *in vivo* são incomuns (BUNN 1997).

Quando a Hb S encontra-se na presença de ambiente com baixa tensão de oxigênio torna-se insolúvel e agrega-se em longos polímeros. A polimerização é a responsável pela redução da deformabilidade de membrana da hemácia, causando como consequência a obstrução de vasos e posteriormente lesão tecidual (SCHECHTER & RODGERS, 2000).

Além da concentração de oxigênio, a concentração de Hb S, o grau de desidratação da célula, a concentração de Hb normais como a Hb F, o tempo de circulação dos eritrócitos na microcirculação, pressão, força iônica e pH são alguns dos principais fatores que influenciam a polimerização da Hb S (DE FRANCESCHI & CORROCHE, 2004).

O processo de falcização pode ser revertido com a oxigenação. Entretanto, após episódios repetidos de oxigenação-desoxigenação, as hemácias podem ser irreversivelmente falcizadas (NAGEL & STEINBERG, 2001). Estas células são sequestradas por macrófagos do sistema reticulo-endotelial e retiradas rapidamente da corrente sanguínea, resultando na anemia hemolítica crônica característica da doença (NAGEL & STEINBERG, 2001).

Eritrócitos falcizados aderem-se com maior facilidade ao endotélio vascular, contribuindo para aumentar os episódios de obstrução vascular associados à AF. A hipóxia decorrente da obstrução vascular gera infartos teciduais e orgânicos, e proporciona crises de dor ou danos teciduais crônicos e provavelmente irreversíveis em regiões como rins, baço, medula óssea, retina e cabeça do fêmur (LABIE e ELION, 1999).

A obstrução vascular é um processo bastante complexo, onde estão envolvidas hemácias, células endoteliais, leucócitos, plaquetas e proteínas plasmáticas envolvidas com

a coagulação. O processo crônico inflamatório característico da AF envolve o aumento das células do endotélio vascular envolvidas com adesão, bem como o aumento da função e expressão de moléculas de superfície dessas células, de leucócitos e hemácias (GAMBERO, S. *et al.*, 2006; CANALLI, A. A. *et al.*, 2007). Moléculas de adesão como integrina VLA-4 (CD49d/CD29), CD36 e BCAM/Lu, expressas em reticulócitos e eritrócitos falcêmicos, medeiam o processo de adesão celular (SWERLICK, R. A. *et al.*, 1993; JONECKIS, C. C. *et al.*, 1993; GEE, B. E. & PLATT, O. S., 1995).

1.3. Reativação de Hb F por Hidroxiuréia

Alguns estudos têm demonstrado uma relação inversa entre a gravidade da AF e níveis elevados de Hb F. A Hb F atua melhorando a sintomatologia da doença pelo aumento da solubilidade da Hb S, reduzindo a polimerização de seus tetrâmeros (KAUFMAN, 1992; CHARACHE *et al.*, 1995). Tratamentos específicos capazes de reativar a expressão de Hb F após o nascimento tem sido alvo de investigações em pesquisa básica e clínica, levando à descoberta de vários agentes farmacológicos capazes de aumentar a síntese de Hb F (HALSEY & ROBERTS, 2003).

A utilização da droga citotóxica hidroxiuréia (HU), para tratar pacientes com anemia falciforme, tem demonstrado aumento nos níveis de concentração de Hb F, com comprovada redução de várias manifestações clínicas da doença (RODGERS, 1997; YANG *et al.*, 1997; SALEH *et al.*, 1998). Pesquisas apontam para uma redução por volta de 50% na frequência das hospitalizações, episódios de dor, infartos e transfusão sanguínea (CHARACHE *et al.*, 1995). Um estudo multicêntrico, com seguimento de pacientes com crises frequentes tratados com HU por nove anos, demonstrou também mortalidade reduzida (STEINBERG *et al.*, 2003). Neste caso, a sobrevivência foi relacionada com o aumento de Hb F e a menor frequência de eventos vaso-oclusivos.

A HU é uma inibidora de ribonucleotídeo redutase, enzima que impede a síntese de DNA prevenindo a formação de desoxiribonucleotídeos a partir de seus ribonucleosídeos precursores. Ela também vem sendo utilizada, para tratar neoplasias, policitemia vera e câncer de cabeça e pescoço (RODRIGUEZ, 1998). Várias hipóteses quanto às vias de

atuação da droga vem sendo formuladas mas, aparentemente, a HU utiliza múltiplos mecanismos de ação, ainda não totalmente esclarecidos (COSTA *et al.*, 2007).

Inicialmente acreditava-se que a HU estava somente envolvida em aumentar os níveis de Hb F, atuando diretamente na síntese dos genes da γ -globina (STEINBERG & RODGERS, 2001). Atualmente, acredita-se também que HU pode atuar na medula óssea, selecionando uma população de precursores eritróides, capazes de sintetizar quantidades elevadas de Hb F (KAUFMAN, 1992; GLADWIN e SCHECHTER, 2001; HALSEY e ROBERTS, 2003; HAYNES *et al.*, 2004). Outros estudos sugerem que a redução de neutrófilos, monócitos e reticulócitos, vinculada a HU, poderiam estar correlacionada com a diminuição da aderência ao endotélio vascular, e a conseqüente redução das crises vaso-oclusivas (STEINBERG & RODGERS, 2001).

Um dos principais mecanismos pelos quais a HU aumenta a expressão de γ -globina envolve possivelmente a indução da via da guanilato ciclase, aumentando os níveis de cGMP, que atua como segundo mensageiro de diversos processos celulares e fisiológicos (IKUTA *et al.*, 2001; COKIC *et al.*, 2003). A guanilato ciclase é ativada pelo NO (óxido nítrico), que pode ser produzido a partir da oxidação de HU, *in vitro* ou *in vivo* (COKIC *et al.*, 2003). Pacientes com AF apresentaram comumente níveis abaixo do normal de NO e durante as crises de dor, desencadeadas pelo processo de vasoclusão, esses níveis caem ainda mais. Os níveis de NO aumentam quando há melhora destas crises (LOPEZ *et al.*, 2000).

HU e outros doadores de NO aumentam a expressão do gene γ -globina em linhagens de células K562 e em progenitores eritróides humanos de maneira dose dependente (COKIC *et al.*, 2003). Pacientes tratados com a HU apresentaram, além do aumento na expressão do gene γ -globina, aumento nos níveis de nitrito, nitrato e ferro nitrosil hemoglobina, os quais são marcadores de produção do NO. A ativação da guanilato ciclase induz a expressão do gene γ -globina tanto em células K562 quanto em progenitores eritróides. O tratamento com inibidores desta enzima foi capaz de bloquear o aumento de γ -globina (IKUTA *et al.*, 2001; COKIC *et al.*, 2003; REITER & GLADWIN, 2003). Níveis aumentados de cGMP e da expressão do gene γ -globina também foram detectados em resposta à administração da HU em progenitores eritróides de pacientes com AF, o que

reforça o comprometimento da HU com a via da guanilato ciclase (NAHAVANDI *et al.*, 2002; CONRAN *et al.*, 2004).

As proteínas de sinalização celular e os fatores de transcrição que participam da reativação de γ -globina em células eritróides ainda não são conhecidos, apesar dos avanços neste campo. ERK1 (*Extracellular Signal-Regulated Kinase 1*), por exemplo, tem níveis de fosforilação diminuídos em células da linhagem eritroleucêmica K562 tratadas com HU, enquanto P38 tem níveis aumentados. Estas proteínas fazem parte da família de MAPKs (*RAS-mitogen-activated Protein Kinases*), proteíno-quinases envolvidas na regulação de uma série de processos celulares, tais como a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (PARK *et al.*, 2001; NAGAI *et al.*, 2003).

Além disto, vários genes sofrem modificações de expressão induzida por HU, como demonstrado em alguns trabalhos com metodologias de análise de expressão gênica em larga escala. Utilizando microarranjos em células da linhagem AC133⁺ não tratadas e tratadas com HU, WANG e cols (WANG *et al.* 2002) avaliaram a expressão de genes envolvidos com o controle do ciclo celular, apoptose e várias vias de transdução de sinal. Com altas doses de HU, houve um aumento significativo na expressão de genes associados com apoptose (DR5, CASPASE 3, CASPASE 10, BAX e BCL-XL) e ciclo celular (P21, SKP-1, GADD45 e MDM2). A administração de baixas doses de HU aumentou a expressão de genes atuando em diversas vias celulares, como o fator de transcrição EGR1 (*Early Growth Response 1*). Este estudo também mostra que a expressão dos fatores de transcrição GATA-1 e GATA-2 sofre alteração induzida por HU em cultura líquida duas fases de células eritróides (WANG *et al.*, 2002).

Utilizando a metodologia de SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), Costa e cols. investigaram o perfil de expressão gênica diferencial em células da medula óssea de uma paciente com AF antes e após tratamento com HU (COSTA *et al.*, 2007). Foram identificados diversos genes com expressão diferencial, envolvidos com funções celulares distintas. Genes associadas a atividades transcricionais e de síntese de proteínas apresentaram aumento moderado em seu padrão de expressão após o tratamento com a HU. A categoria funcional *atividade repressora da transcrição* (*transcriptional repressor activity*), estabelecida de acordo com o *Gene Ontology* (www.geneontology.org) apresentou

uma diminuição de expressão após o tratamento, na avaliação global dos transcritos. O fator de transcrição EGR1 também foi um dos genes identificados que apresentou maior indução da expressão após a administração da HU. Estes dados indicam uma alteração global no padrão de expressão gênica induzida pelo tratamento com HU.

Para melhor compreender os mecanismos moleculares envolvidos na reativação de γ -globina por HU, nós realizamos neste trabalho um estudo de expressão gênica diferencial em células da linhagem K562 e em reticulócitos de pacientes com AF, submetidos e não submetidos a tratamento com HU.

2- Objetivos

2.1 - Objetivo Geral

Identificar genes que estejam potencialmente relacionados com o mecanismo molecular de ação de HU no aumento de Hb F em células eritróides.

2.2 - Objetivos Específicos

2.2.1. Estabelecer bibliotecas subtrativas de linhagem celular K562 tratada e não tratada com HU;

2.2.2. Estabelecer bibliotecas subtrativas de reticulócitos obtidos de sangue periférico de pacientes com AF submetidos e não submetidos a tratamento com HU;

2.2.3. Avaliar a expressão diferencial de genes encontrados nas bibliotecas subtrativas por PCR em tempo real em células de K562 e reticulócitos coletados de pacientes com AF, tratados e não tratados com HU.

3- Casuísticas e Métodos

3.1. Pacientes e Dados Hematológicos:

Foram coletadas amostras de sangue periférico de dezesseis pacientes portadores de AF, sendo seus dados hematológicos determinados eletronicamente. Todos eram homozigotos para o genótipo Hb S e a quantificação dos níveis de Hb A₂, Hb S e Hb F foi realizada utilizando o equipamento *Variant II Hemoglobin Testing System* (Bio-Rad, CA-USA). A eletroforese de hemoglobina foi realizada em acetato de celulose com tampão Tris-EDTA-ácido bórico em pH 8.9. A análise das globinas foi realizada em gel de urea-triton-acrilamida (BETKE *et al.*, 1959). Oito dos dezesseis pacientes foram submetidos a tratamento com 20-30mg/Kg/d de HU nos três meses anteriores à coleta de amostras. Todos os pacientes foram acompanhados por médicos do Centro de Hematologia e Hemoterapia – UNICAMP e foram informados dos procedimento e dados que seriam gerados, ao iniciarmos este projeto de pesquisa. Posteriormente, os mesmos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP. Os dados hematológicos dos pacientes portadores de AF participantes deste estudo estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Dados clínicos e hematológicos dos grupos de pacientes portadores de AF estudados.

	AF (n=8)	AFHU (n=8)
Homens/Mulheres	5/3	5/3
Idade	34 (37, 20, 44)	32 (31, 25, 45)
Células vermelhas (x10 ⁶ µL)	2.72 (2.39, 1.92, 4.33)	2.7 (2.64, 2.46, 3.11)
Hematócrito (%)	23.58 (22.1, 19, 32.5)	28.27 (27.5, 23.4, 35.1)
Hemoglobina (g/dL)	7.9 (7.6, 6.5, 10.3)	9.63 (9.75, 8, 11.8)
Volume corpuscular médio (fL)	89 (88, 75, 103)	106 (102, 92, 123)
Hemoglobina corpuscular média (µL)	29.9 (30.5, 23.8, 35)	35.66 (36.9, 30.2, 40.6)
HbF (%)	4.35 (2.4, 0.7, 11.9)	12.58 (11.9, 3.7, 22)
Reticulócitos (x10 ⁹ /L)	309 (300, 185, 437)	309 (270, 123, 719)

AF- pacientes com Anemia Falciforme sem tratamento com HU.; AFHU- pacientes com Anemia Falciforme em tratamento com HU (20–30 mg/kg/d por pelo menos 3 meses); HbF -hemoglobina fetal. Os dados apresentados (com exceção dos valores para homens e mulheres) são média (mediana, mínimo, máximo).

3.2. Isolamento de Reticulócitos:

O sangue periférico foi coletado com anticoagulante EDTA, posteriormente foi transferido para tubo Falcon de 15mL e submetido a centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos a 4°C em centrífuga Sorvall (rotor SLA 600TC). O plasma que foi separado no processo de centrifugação foi descartado e foi adicionado 5x o volume de células de solução de lise de hemácias (0.144M NH_4Cl ; 0.01M NH_4HCO_3). As amostras foram incubadas por 30 minutos em gelo, com agitação vigorosa a cada 5 minutos. Após centrifugação a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C em centrífuga Sorvall (rotor SLA 600TC), o sobrenadante contendo hemácias e reticulócitos lisados foi transferido para novo tubo, homogeneizado com 1/10 de volume de uma solução de Sucrose/KCl (1.5M $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$; 0.15M KCl, filtrada ou preparada com H_2O tratada com DEPC) e centrifugado novamente a 5.000 rpm por 20 minutos a 4°C em centrífuga Sorvall (rotor SLA 600TC). O sobrenadante contendo agora apenas reticulócitos foi transferido para novo tubo, tratado com Ácido acético 10% e centrifugado a 5.000 rpm 20 minutos a 4°C em centrífuga Sorvall (rotor SLA 600TC). O precipitado (*pellet*) foi então ressuspensionado e homogeneizado em 1mL de Trizol® (Invitrogen-Life Technologies-Life Technologies) e estocado em freezer de ultra-baixa temperatura (-80°C) para posterior extração de RNA.

3.3. Cultura de Linhagem K562

Duas garrafas de cultura (Nunc, Naperville, IL, USA) contendo 5×10^5 cells por 75cm^2 da linhagem celular humana eritroleucêmica K562 obtidas da American Type Culture Collection (ATCC; catalogo número CCL-243) foram mantidas em meio RPMI 1640 (GibcoBRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100U/ml penicilina (GibcoBRL) e 100mg/ml streptomomicina (Gibco BRL). As duas culturas foram mantidas em atmosfera umidificada a 5% CO_2 e temperatura de 37° e à uma delas foi adicionada 100 μM HU (Sigma, St Louis, MO, USA). As coletas para extração de RNA foram realizadas no tempo de 0h (sem HU) e após 72h de cultivo com HU. Este procedimento foi repetido em duplicata.

3.4. Citometria de Fluxo

Foi realizada citometria de fluxo com anticorpo anti HbF para acompanhamento de diferenciação celular e indução da síntese de Hb F. Para cada cultura de K562 foram preparados 2 tubos de ensaio contendo 100µL. Em cada 100µL de cultura de K562, foi adicionado 50uL da solução de fixação A, envolvido em papel alumínio e incubado por 15 min a 4°C. Após a incubação foi realizada uma lavagem com 500uL de PBS 1X e centrifugado a 1600 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado a solução de fixação B (50µL) em cada tubo. Em um dos tubos foi adicionado 3µL de anticorpo IgG (SIGMA, USA) e no outro tubo 3µL de anticorpo anti-HbF (SIGMA, USA). Os tubos foram incubados por 30min a 4°C e posteriormente realizada uma lavagem com PBS 1X (500µL), centrifugado a 1600 rpm por 5 min e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 400µL de paraformaldeído para preservação. Posteriormente foi realizada leitura em Citômetro de fluxo. Como mostra a Figura 2, as células tratadas com HU apresentam maiores níveis de HbF.

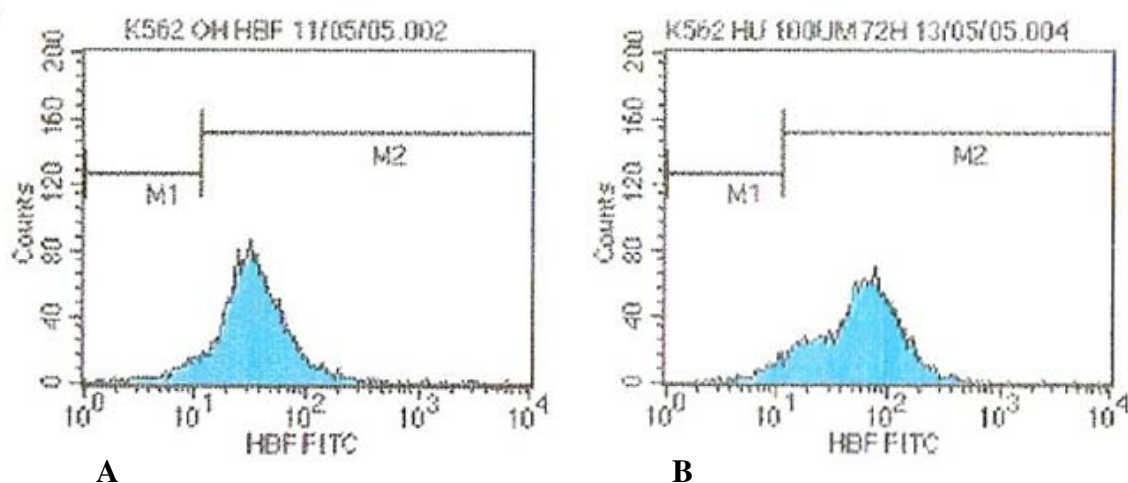


Figura 2. Citometria de fluxo com anticorpo anti-HbF. Em A, células de K562 sem tratamento com HU (K562-0h) e em B, células após 72hs de tratamento com HU.

3.5. Extração de RNA

Para extração do RNA total foi utilizando o reagente Trizol[®](Invitrogen-Life Technologies), que é composto de uma solução monofásica formada por fenol e guanidina isocianato. O composto rompe as células, dissolvendo os componentes celulares sem comprometer a integridade do RNA. O precipitado gerado pelo Trizol foi incubado a temperatura ambiente a fim de que houvesse completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos. Após agitação vigorosa desta amostra contendo clorofórmio, foi realizada uma nova incubação. Foi realizada posteriormente centrifugação a 14000 RPM a 4° C com recuperação da fase orgânica da amostra em novo tubo. Após foi adicionado isopropanol gelado para precipitação do RNA. Foi realizada nova incubação à temperatura ambiente seguida de centrifugação a 14000 RPM a 4° C. Após esta centrifugação, o precipitado foi lavado com etanol 70% gelado para que houvesse completa remoção de sal, e então submetida à nova centrifugação, a 11500 RPM a 4° C. O centrifugado foi ressuspensionado em água estéril contendo dietilpirocarbonato (DEPC) e incubado a 55° C por 10 minutos inicialmente, e 2 horas em gelo para solubilização do RNA. Para amostras de reticulócito foram adicionados cerca de 10 µL de água DEPC.

A quantificação do RNA foi realizada através da leitura da densidade óptica em espectrofotômetro nanodrop no comprimento de onda de 260 nm. A integridade da amostra foi verificada em eletroforese em gel desnaturante 1,2%. As amostras com qualidade adequada do RNA apresentavam íntegras as duas subunidades ribossomais: 18 S e 28 S. Após a eletroforese, as amostras de RNA foram armazenadas em freezer - 80° C. Previamente à síntese de cDNA, 5µg de RNA das amostras foram incubados, como sugerido pelo fabricante, em 1U de DNase I (Invitrogen, USA) para remoção de eventuais moléculas de DNA contaminantes.

3.6. Identificação de genes diferencialmente expressos utilizando Bibliotecas Subtrativas Supressivas (*Subtractive Suppression Hybridization-SSH*).

Partindo dos RNAs oriundos de reticulócitos de sangue periférico de pacientes com AF e de células de linhagem K562, foram realizadas quatro Bibliotecas de cDNA Subtrativa Supressiva (*Subtractive Suppression Hybridization-SSH*). O primeiro grupo foi formado por duas bibliotecas de reticulócitos, sendo a primeira construída a partir de uma mistura de amostras (pool) de RNA de três pacientes portadores de AF tratados com HU 20-30mg/Kg/d e a segunda a partir da mistura de amostras (pool) de cDNA de três pacientes portadores de AF, não tratados com HU. O segundo grupo de bibliotecas foi obtido a partir de duas culturas de células da linhagem K562, sendo uma tratada com 100µg/mL de HU e a outra não tratada com a droga.

Foi utilizado o método de SSH (*Subtractive Suppression Hybridization-SSH*) (DIATCHENKO *et al*, 1996) para obtenção de perfis transcricionais que pudessem identificar genes diferencialmente expressos nessas condições, e que pudessem ser correlacionados com a expressão aumentada de Hb F e possível relação com a melhora do quadro clínico verificado nos pacientes tratados com HU. O método consiste na construção de bibliotecas de cDNA que contenham apenas aqueles genes com expressão diferente entre as duas condições estudadas (Figura 3). Baseia-se nos seguintes princípios:

1- Hibridização subtrativa: as duas populações de cDNA estudadas (paciente tratado com HU e não tratado (controle), por exemplo) são misturadas, após digestão com uma enzima de restrição, sob condições que permitam a hibridização de moléculas complementares, correspondentes a transcritos do mesmo gene. Uma destas populações (denominada *Tester*) é ligada a adaptadores contendo seqüências para iniciadores de PCR, e misturada com excesso da outra população (*Driver*), sem adaptadores. Assim, após a hibridização (geralmente duas hibridizações consecutivas), apenas aqueles transcritos que não sofreram hibridização (com adaptadores) são amplificados por PCR, enquanto os transcritos comuns (sem adaptadores) não sofrem amplificação.

2- PCR supressivo: antes da primeira hibridização, a população *Tester* é separada em duas alíquotas e ligadas a adaptadores diferentes. Após a primeira e segunda

hibridizações, as moléculas de cDNA dupla fita, contendo os mesmos adaptadores nas duas extremidades sofrem um efeito denominado PCR supressivo na reação (DIATCHENKO *et al*, 1996). Estas moléculas correspondem aos transcritos mais abundantes, já que estes tem maior probabilidade de hibridização dentro da mesma população de cDNA. Como adaptadores idênticos contém seqüências complementares invertidas, e a ligação intramolecular ocorre mais facilmente que entre moléculas (neste caso entre os iniciadores e o molde ou adaptadores), a reação de amplificação não ocorre a partir destes cDNAs. Apenas aquelas moléculas de cDNA dupla fita, com adaptadores diferentes nas extremidades sofrem amplificação exponencial e podem ser detectadas. Esta estratégia permite a normalização da biblioteca, evitando que os transcritos de alta expressão tenham amplificação preferencial, e prejudiquem a detecção dos transcritos menos expressos ou raros.

3- Clonagem e sequenciamento: após amplificação, os transcritos normalizados e diferencialmente expressos podem ser clonados e submetidos a sequenciamento para identificação e análise dos genes correspondentes. Esses procedimentos devem ser realizados para cada um dos perfis desejados. Assim, obtivemos dois grupos de duas bibliotecas supressivas subtrativas, representando os perfis transcricionais (genes mais expressos) em indivíduos com AF tratados e não tratados com HU e células da linhagem K562 tratadas e não tratadas com HU.

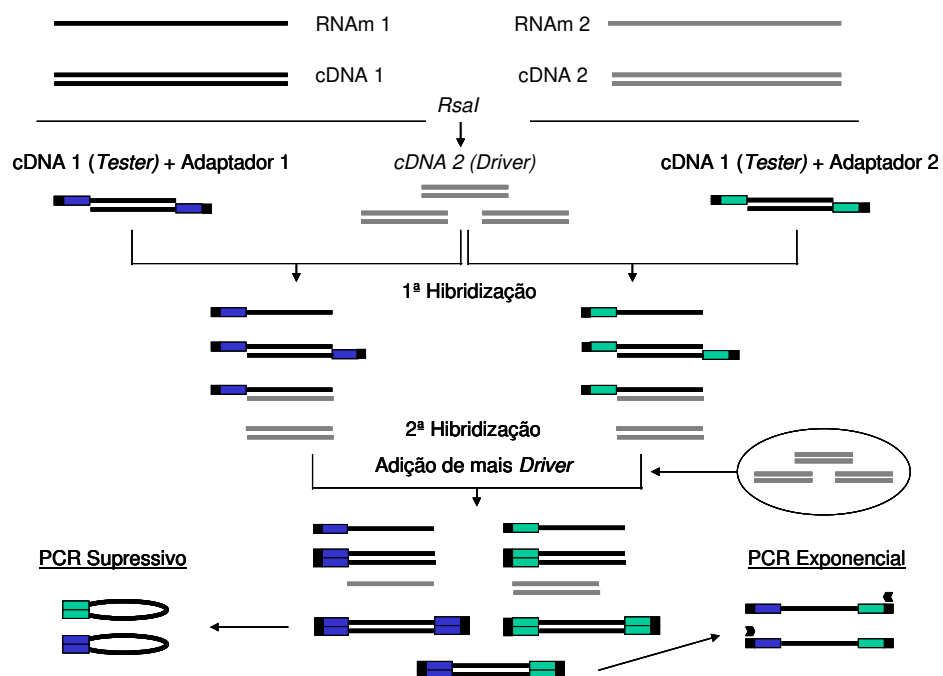


Figura 3. Representação do processo de obtenção de bibliotecas subtrativas. O detalhamento do processo pode ser encontrado no texto. Adaptado de DIATCHENKO *et al*, 1996.

3.6.1. Síntese e amplificação de cDNA para construção das bibliotecas

O cDNA utilizado para construções das bibliotecas subtrativas foi obtido por amplificação de moléculas de cDNA de tamanho completo. O procedimento se inicia com a síntese da primeira fita de cDNA utilizando um *oligo(dT)* modificado (3'BD SMART CDS IIA), complementar à cauda poli-A do RNAm. Quando a transcriptase reversa alcança a extremidade 5' da molécula, a atividade transferase terminal da enzima adiciona preferencialmente deoxicitidinas na porção 3' do cDNA. Um outro oligonucleotídeo adicionado à reação (SMART IIA), que possui um *oligo(G)*, se hibridiza à sequência de citidinas, criando um molde estendido. A transcriptase reversa muda então de molde e continua replicando até o final do oligo (ZHU *et al*, 2001).

O cDNA fita simples resultante contém a sequência completa 5' do RNAm, bem como sequências complementares aos oligonucleotídeos BD SMART, que podem ser utilizados com pontos de ancoramento para iniciadores em reações de RT-PCR, amplificando desta maneira as sequências completas de cDNA dos transcritos da amostra

em estudo. O protocolo que se segue é similar ao descrito no protocolo do Kit *BD SMART PCR cDNA Synhtesis Kit* (BD Biosciences), com adapatações. 1-2µg de RNA de reticulócitos (8µL) foi tratado primeiramente com DNase (Invitrogen) 15 minutos a temperatura ambiente, numa reacção final de 10µL. Síntese da primeira fita: 2µL (20µM) de cada iniciador (3'BD SMART CDS IIA: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT₍₃₀₎VN-3', onde V=A, G ou C E N=qualquer uma das bases; SMART IIA: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3') foi adicionado ao RNA tratado e as amostras foram incubadas 70°C por 2 minutos. Foi adicionado então um mix com 2.5µL de tampão RT 10X, 1.5µL MgCl₂ 25mM, 2.5µL dNTPs 10mM, 0.5µL DTT 100µM, 2.0µL de "RNAse OUT" e 2.0µL de *Superscript III* (Invitrogen). As amostras foram incubadas 42°C por 1h, foi adicionado 20µL de H₂O e incubadas 7 minutos a 72°C para inativação da enzima.

Síntese da segunda fita/amplificação do cDNA: as reacções de amplificação foram padronizadas para reacções de PCR utilizando enzima de alta fidelidade (*Platinum High Fidelity Polymerase* - Invitrogen), nas seguintes condições: tampão de PCR HiFi 1X, 2mM de MgSO₄, 10µM de cada dNTP, 20 µM de iniciador (5' PCR Primer IIA: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'), 0.5µL da enzima, 2µL do cDNA fita simples, para um volume final de 50µL. Os parâmetros de amplificação foram desnaturação inicial a 95°C por 1 min, seguida por 34 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 seg, anelamento a 60°C por 15 seg e extensão a 68°C por 7 min. O número de ciclos ideal foi determinado com a realização de testes de amplificação das amostras em diferentes ciclos. Como exemplo, as Figuras 4 e 5 mostram a padronização de ciclos para as amostras de reticulócitos. O ciclo escolhido deve estar antes do ponto de saturação da reacção. Para nossos experimentos, seleccionamos 26 ciclos para a amostra de cDNA de pacientes tratados com HU e 34 ciclos para as demais amostras. As bandas de maior intensidade nos géis representam aqueles transcritos mais freqüentes.

3.6.2. Purificação do cDNA e Digestão com RsaI

As reações de PCR contendo o cDNA dupla fita das amostras foram purificadas e concentradas com colunas GFX (Amershan). Foram purificadas duas reações de 50µL por coluna, em um total de 3 colunas por amostra, recuperando um volume final de 120µL. Destes, 115µL foram digeridos com 13µL de enzima RsaI (5U/µL) e tampão adequado 1X, num volume final de 130µL, a 37°C 16-20hs. As amostras de digestão foram homogeneizadas com igual volume de uma mistura fenol: clorofórmio: álcool isoamílico e centrifugadas a velocidade máxima por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e o DNA precipitado com 2.0 M de acetato de sódio e 2 volumes de etanol absoluto. Centrifugado a velocidade máxima por 20 minutos e lavado com etanol 75%. Centrifugado novamente em velocidade máxima 5 minutos, deixado secar e ressuspendido em 7µL de H₂O. Foi feita checagem com 1µL em gel de agarose.

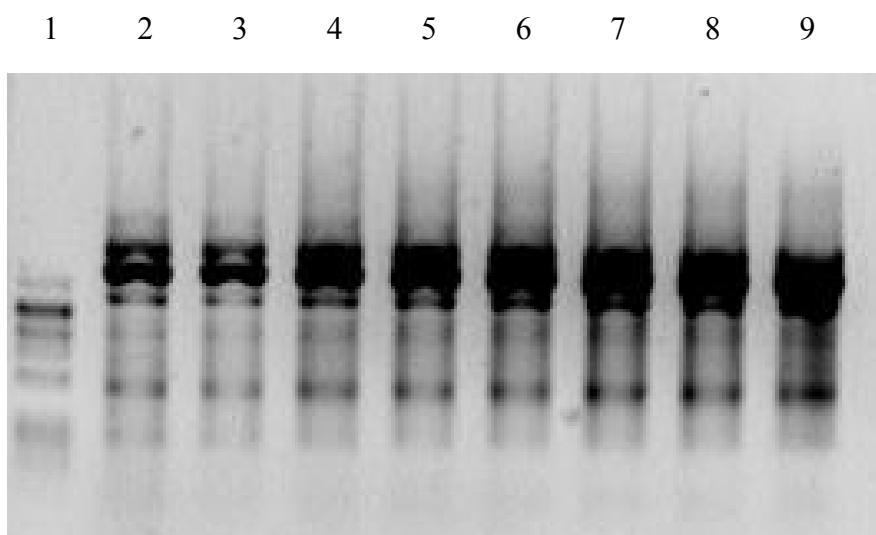


Figura 4. Padronização do número de ciclos de PCR para amplificação do cDNA a ser utilizado na construção da biblioteca subtrativa. As amostras de cDNA correspondem a pacientes com AF tratados com HU. 1 - Marcador de peso molecular ϕ X Hae III; 2- 26 ciclos; 3- 28 ciclos; 4- 30 ciclos; 5- 32 ciclos; 6- 34 ciclos; 7- 36 ciclos; 8- 38 ciclos; 9- 40 ciclos.

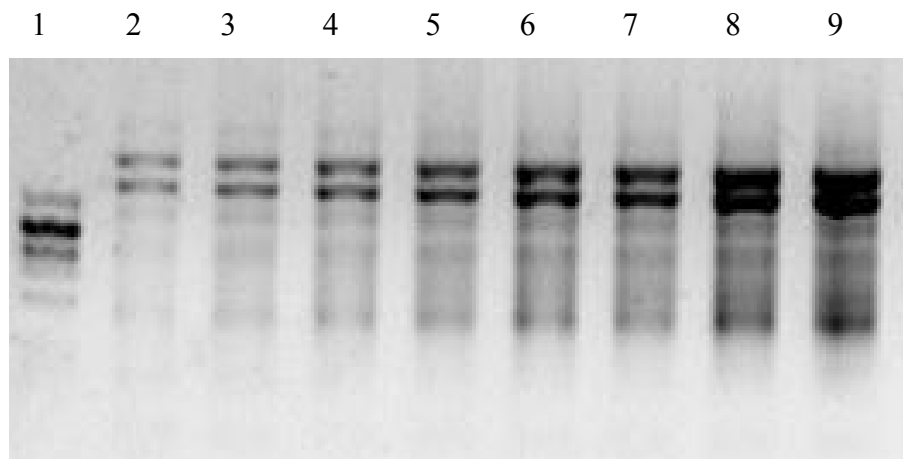


Figura 5. Padronização do número de ciclos de PCR para amplificação do cDNA a ser utilizado na construção da biblioteca subtrativa. As amostras de cDNA correspondem a pacientes com AF não submetidos ao tratamento com HU. 1 - Marcador de peso molecular ϕ X Hae III; 2- 26 ciclos; 3- 28 ciclos; 4- 30 ciclos; 5- 32 ciclos; 6- 34 ciclos; 7- 36 ciclos; 8- 38 ciclos; 9- 40 ciclos.

3.6.3. Ligação dos adaptadores

Os reagentes e procedimentos que se seguem foram feitos segundo *Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit* (Clontech). 1 μ L do cDNA *Tester* digerido com *RsaI* foi diluído em 5 μ L de H₂O. Desta diluição, 2 μ L foram misturados com 2 μ L de adaptador 1 ou 2R (10 μ M), 2 μ L de tampão de ligação 5X, 1 μ L de T4 Ligase e 3 μ L de H₂O. 2 μ L da ligação com Adaptador 1 e 2 μ L da ligação com Adaptador 2R foram misturados e reservados como teste não subtraído para análise posterior (Figuras 10 e 11 da 1^o subtração). As ligações foram incubadas durante 16-20hs a 16°C, posteriormente a 72°C para inativar a ligase e estocadas a -20°C.

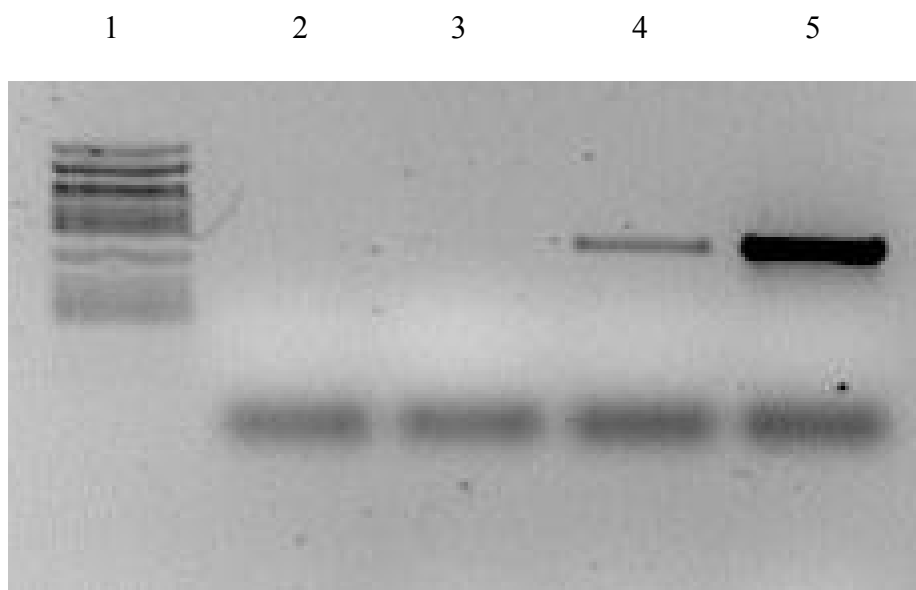
3.6.4. Hibridizações Subtrativas

Na 1^a hibridização, 1.5 μ L de cada ligação de cDNA *Tester* aos adaptadores foi misturado em separado com 1.5 μ L de cDNA *Driver* digerido com *RsaI*, mais 1 μ L de tampão de hibridização 4X. A mistura foi incubada 98°C por 1.5 minuto e posteriormente

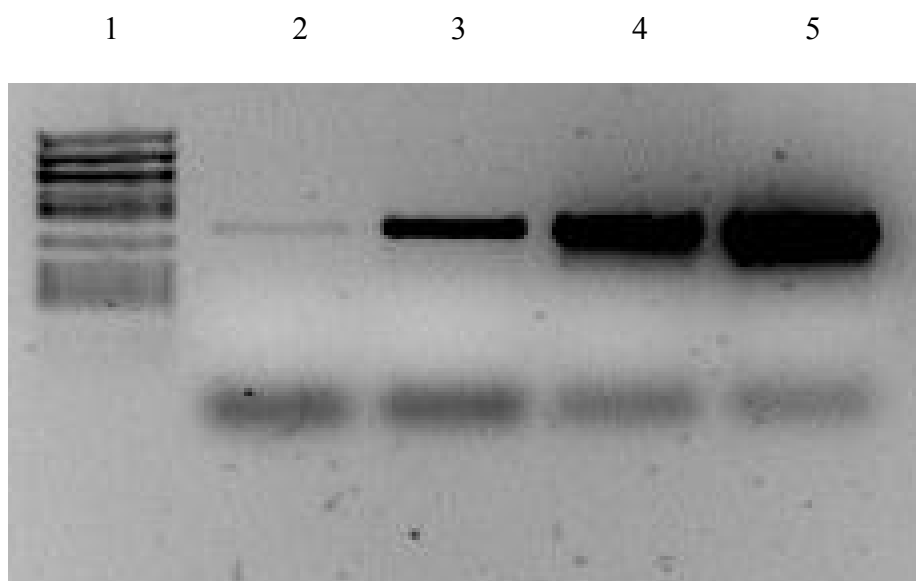
68°C por 8 horas. Na 2ª hibridização, 1µL da mistura de 2µL de H₂O, 1µL de tampão de hibridização 4X e 1µL de cDNA *Driver* digerido com RsaI foi pré-aquecida a 98°C por 1.5 minuto e misturada com as amostras de cDNA *Tester* da 1ª hibridização, como segue: com a pipeta marcando 15µL e tubos da 1ª hibridização a 68°C, foi pipetado todo o volume do tubo contendo o adaptador 2R, puxado um pouco de ar na ponteira e pipetado o novo *Driver* pré-aquecido a 98°C. Estas amostras foram então transferidas para o tubo da 1ª hibridização contendo o adaptador 1 (68°C) e misturado. Este procedimento permite que o conteúdo dos 3 tubos (cDNA *Tester* - adaptador 1 após 1ª hibridização; cDNA *Tester* - adaptador 2R após 1ª hibridização e novo *Driver*) sejam misturados ao mesmo tempo. As amostras foram incubadas 68°C 16-20hs. 200µL do tampão de diluição foi adicionado às amostras, que foram incubadas novamente a 68°C por 7 minutos e estocadas a -20°C.

3.6.5. Teste de eficiência da Subtração

Foram realizados testes para averiguar a eficiência do processo de subtração acima mencionado. Estes testes consistem na amplificação por PCR de uma região do gene constitutivo G3PDH em alíquotas das amostras subtraídas e não subtraídas, e análise dos produtos ao longo dos ciclos da reação. Como se trata de um gene com expressão constitutiva, espera-se que este seja expresso nas duas condições de estudo, tratado e não tratado, por exemplo. Neste caso, este gene deve sofrer subtração durante as hibridizações, levando à reduções nos seus níveis de cDNA. A eficiência da subtração é confirmada com menores quantidades dos produtos de PCR do gene nas amostras subtraídas, comparadas com as amostras que não foram submetidas ao processo de subtração. A detecção do produto de amplificação de amostras subtraídas se dá em ciclos mais adiantados da reação de PCR, como mostram as Figuras 6 e 7. Cada banda no gel corresponde à alíquotas de 5µL coletadas em diferentes ciclos da reação de PCR. Estes testes confirmam a eficiência da hibridização subtrativa das culturas de K562. As bibliotecas de reticulócitos não apresentaram produtos de amplificação nestes testes. Estes resultados são similares aos encontrados anteriormente para amostras de reticulócitos de indivíduos com PHHF (DE ANDRADE *et al*, 2006).

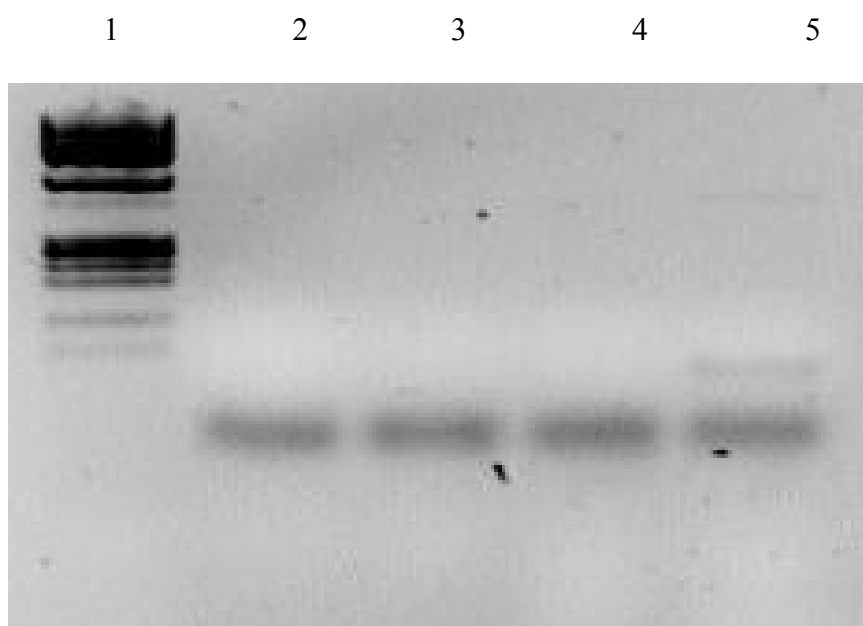


A. Subtraído

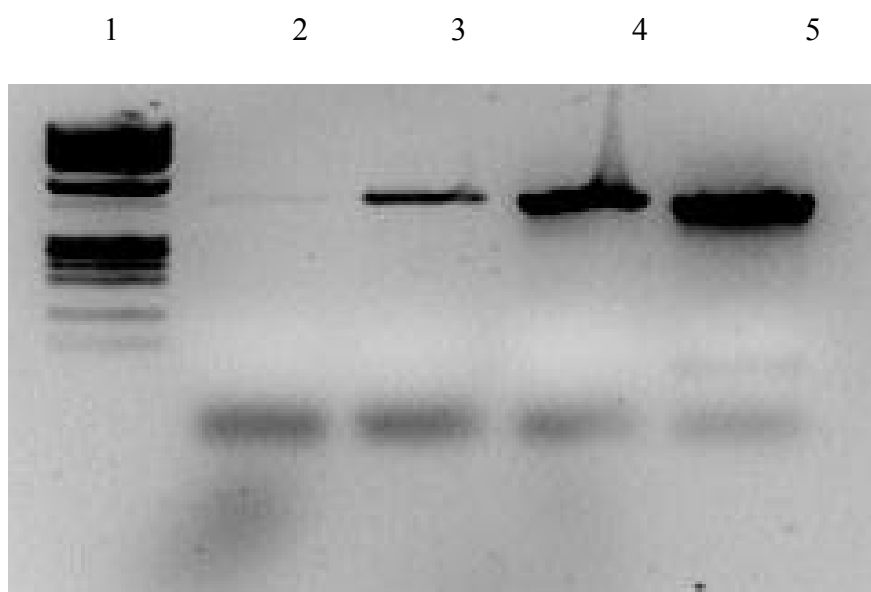


B. Não Subtraído

Figura 6. Teste de eficiência de subtração para as amostras de cDNA de cultura de K562 0h. A- PCR de amostras após hibridização subtrativa. B – PCR das amostras não subtraídas. Marcador de peso molecular ϕ X 174 HaeIII; 2- 18 ciclos; 3 – 23 ciclos; 4. 28 ciclos; 5 – 33 ciclos.



A. Subtraído



B. Não Subtraído

Figura 7. Teste de eficiência de subtração para as amostras de cDNA de cultura de K562-HU72h. A- PCR de amostras após hibridização subtrativa. B – PCR das amostras não subtraídas. Marcador de peso molecular ϕ X 174 HaeIII; 2- 18 ciclos; 3 – 23 ciclos; 4. 28

3.6.6. Amplificações por PCR

Nesta etapa, os cDNAs diferencialmente expressos são amplificados seletivamente, com iniciadores com seqüência homóloga aos adaptadores ligados às moléculas. Na primeira reação de PCR, somente cDNA de dupla fita com diferentes adaptadores ligados às extremidades são amplificados exponencialmente. Na segunda amplificação, iniciadores mais internos à seqüência do molde (*Nested*) são utilizados para reduzir ruído de fundo (*background*) e enriquecer aquelas seqüências diferencialmente expressas.

Primeiramente, as amostras são incubadas a 75°C por 5', para preencher as extremidades dos adaptadores na molécula dupla fita, seguindo imediatamente ao programa de PCR que se deu nas seguintes condições: desnaturação a 94°C por 30 segundos, seguida de 28 ciclos de desnaturação a 94°C 30 segundos, anelamento a 65°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1.5 minuto. 2µL do cDNA resultante da 2ª hibridização foi adicionado a uma reação contendo tampão de PCR 1X, 2mM de MgCl₂, 10mM de cada dNTP, 10µM de iniciador *PCR Primer 1* (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'), 1U da enzima Taq polimerase (Invitrogen), para um volume final de 25µL. 8µL da reação foram verificados em gel de agarose 2% (Figuras 8 e 9). Na segunda amplificação, 1µL do cDNA gerado na primeira reação de PCR foi adicionado a uma reação contendo tampão de PCR 1X, 2mM de MgCl₂, 10mM de cada dNTP, 10µM de iniciador *Nested PCR Primer 1* (5'-TCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGT-3'), 10µM de iniciador *Nested PCR Primer 2R* (5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'), 1U da enzima Taq polimerase (Invitrogen), para um volume final de 25µL.

A amplificação ocorreu com desnaturação inicial a 94°C por 30 segundos, seguida de 13 ciclos de desnaturação a 94°C 30 segundos, anelamento a 68°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1.5 minuto. 8µL da reação foram verificados em gel de agarose 2% (Figuras 10 e 11). Para estas duas séries de amplificações também foram avaliados o cDNA não subtraído (item 3.6.3) em diluição de 1µL para 1mL de H₂O.

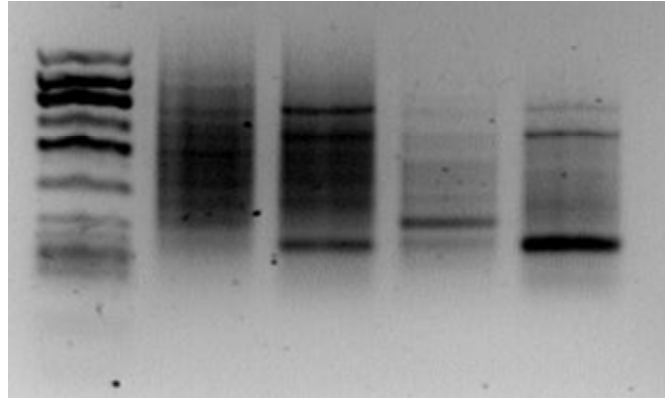


Figura 8. 1ª amplificação do cDNA subtraído de amostras de K562. 1- Marcador de peso molecular ϕ X 174 HaeIII; 2- cDNA de K562-0h após subtração; 3- cDNA K562-0h não subtraído; 4- cDNA de K562-HU72hs após subtração; 6- cDNA de K562-HU72hs não subtraído.

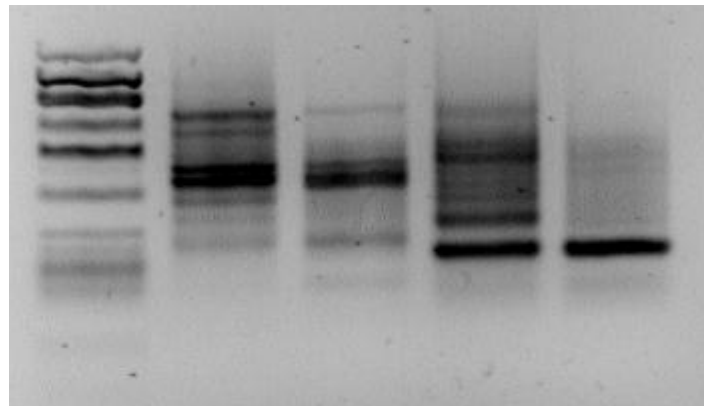


Figura 9. 1ª amplificação do cDNA subtraído de amostras de pacientes com AF. 1- Marcador de peso molecular ϕ X 174 HaeIII; 2- cDNA de pacientes AF tratados com HU, após subtração; 3- cDNA de pacientes AF tratados com HU, não subtraído; 4- cDNA de pacientes AF não submetidos a tratamento com HU, após subtração; 6- cDNA de pacientes AF não submetidos a tratamento com HU, não subtraído.

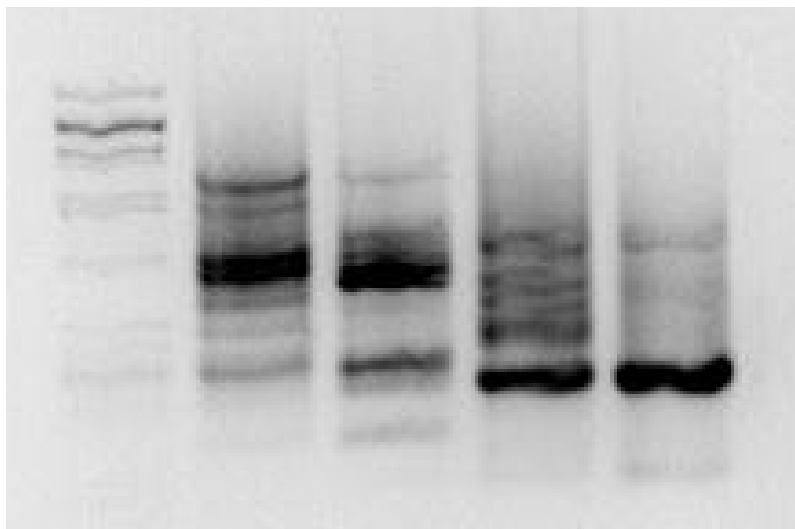


Figura 10. 2ª amplificação do cDNA subtraído (PCR *Nested*) de pacientes com AF. 1- Marcador de peso molecular ϕ X 174 HaeIII; 2- cDNA de pacientes AF tratados com HU, após subtração; 3- cDNA de pacientes AF tratados com HU, não subtraído; 4- cDNA de pacientes AF não submetidos a tratamento com HU, após subtração; 6- cDNA de pacientes AF não submetidos a tratamento com HU, não subtraído.

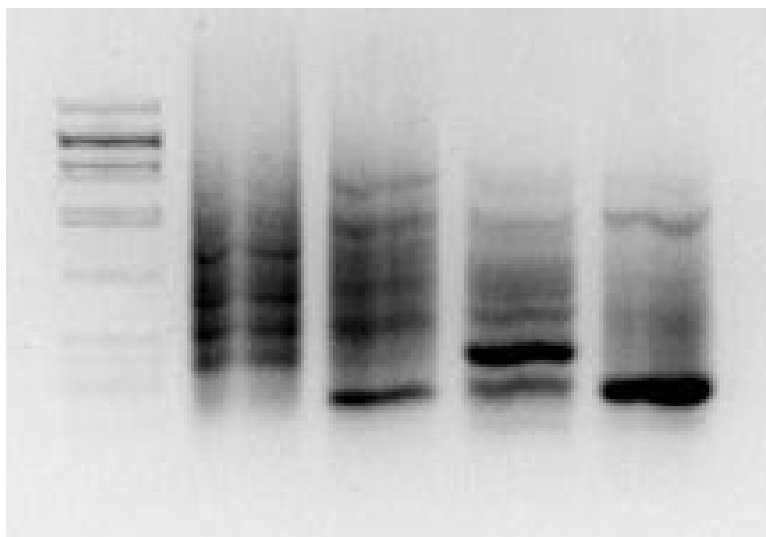


Figura 11. 2ª amplificação do cDNA subtraído (PCR *Nested*) de K562. 1 - Marcador de peso molecular ϕ X 174 HaeIII; 2- cDNA de K562-0h após subtração; 3- cDNA K562-0h não subtraído; 4- cDNA de K562-HU72hs após subtração; 6- cDNA de K562-HU72hs não subtraído.

3.6.7. Clonagem e sequenciamento

As amostras de cDNA resultantes da segunda amplificação foram clonadas em vetor para clonagem de PCR pGEMT (Promega). 3µL do cDNA foi adicionado a 5µL de tampão ligase 2X, 1µL de vetor pGEMT e 1µL de T4 ligase e a reação incubada a 4°C 16-20hs. 3-5µL da ligação foi transformado em 100µL de células DH5α competentes por choque térmico (20 minutos em gelo, 1.5 minutos a 42°C e 2 minutos em gelo). As células foram transferidas para 1mL de meio LB ou SOC sem ampicilina, incubadas sob agitação a 37°C, e plaqueadas em meio LB sólido com marcador ampicilina e sistema de galactosidade para seleção de colônias com inserto.

As colônias positivas para inserto (colônias de cor branca) foram inoculadas em placas de 96 poços contendo 120µL de meio LB com ampicilina por poço. Estas placas foram incubadas sob agitação a 120rpm a 37°C 12-16 hs. 2µL do inóculo foi submetido a reação de PCR contendo iniciadores padrões M13 para amplificação dos insertos (Figura 12). 1µL do PCR foi seqüenciado com 5pmol de iniciador sense do PCR (M13 sense), utilizando pré-mix (Amersham - Kit para MegaBace), em reações de 14µL por poço. As condições foram desnaturação 94°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação 94°C 20 segundos, 58°C 15 segundos e 60°C 1 minuto.

O sequenciamento foi purificado como segue: 2µL de acetato de amônio 7.5M e 50µL de etanol absoluto foi adicionado a cada poço e homogeneizado por *vortex*. As placas foram incubadas 20 minutos em gelo, em ambiente escuro e centrifugadas 45 minutos 4.000rpm 4°C. O etanol foi retirado por inversão das placas. 100µL de etanol 70% foi adicionado a cada poço, as placas centrifugadas 4.000 rpm 4°C por 15 minutos, o etanol 70% removido por inversão e depois por *spin* (200 rpm por 5-7 segundos) com as placas invertidas e secadas a 65°C por aproximadamente 10 minutos.

O DNA da reação de sequenciamento foi ressuspendido por *vortex* em 10µL de tampão de aplicação em *MegaBace* (Amersham) e estocadas a 4°C até aplicação no sequenciador automático *MegaBace*.

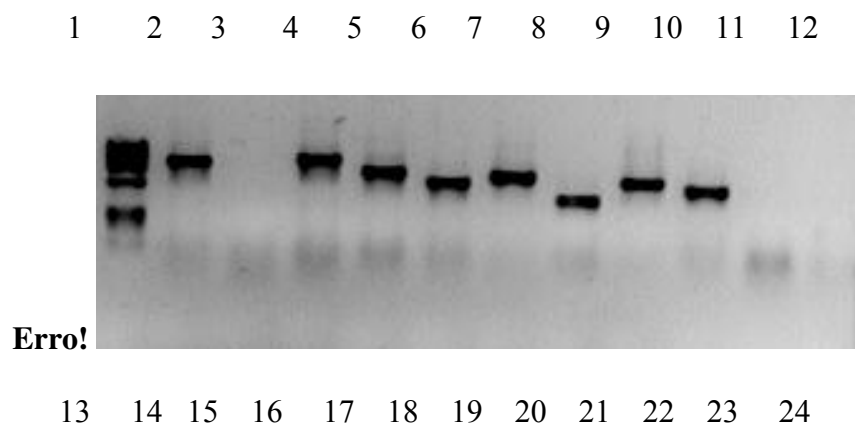


Figura 12. Amplificação dos insertos das bibliotecas subtrativas com iniciadores M13. 1 e 13- Marcador de peso molecular ϕ X 174 haeIII. 2-12 e 14-24 - Clones das bibliotecas subtrativas.

3.6.8. Análise das seqüências geradas

As seqüências geradas pelo *MegaBace* foram trimadas para o vetor pGEM-T e a qualidade de cada sequência analisada utilizando software *Phred/Phrap*. O software BLASTn (*Basic Local Alignment search Tool*) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) contra o genoma humano e bibliotecas de ESTs foi utilizado para encontrar similaridades entre as seqüências obtidas e outros genes descritos. Alinhamentos mostrando similaridade com um valor esperado de $\leq 1 \cdot 10^{-4}$ foram considerados significantes. A classificação funcional dos genes foi baseada no *Gene Ontology Consortium* (www.geneontology.org).

3.7. PCR quantitativo em tempo Real (qRT-PCR)

A expressão de alguns genes encontrados nas bibliotecas foi analisada por PCR em tempo real (*Real-Time PCR*) em K562 e reticulócitos de pacientes com AF tratados e não tratados com HU. Os iniciadores foram desenhados com o uso do software *Primer Express* (Applied Biosystems) e estão dispostos na Tabela 2.

Foram feitos testes para padronização da concentração e eficiência de cada conjunto de iniciadores. A eficiência de amplificação é obtida da fórmula $10^{(-1/\text{slope})}$, onde *slope* significa o coeficiente de inclinação da curva (MEIJERINK *et al.*, 2001; PFAFFL, 2001).

Os transcritos testados demonstraram altas taxas de eficiência no PCR em tempo real com mais de 99% para todos os iniciadores utilizados (coeficiente de correlação de Pearson $r > 0.95$). A amplificação de GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) foi utilizada como um controle para determinar a quantidade e qualidade do cDNA produzido.

A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento *ABI 5700 Sequence Detector System*® (Applied Biosystems) utilizando o reagente *SYBRGreen PCR Master Mix*® (Applied Biosystems), que além de conter todos os reagentes necessários para a realização de uma reação de PCR (*dNTPs*, *MgCl₂*, *Tampão*, *Taq Ampli-Gold*) contém também o corante *SYBRGreen*, componente intercalante de DNA dupla-fita necessário para a detecção da reação ciclo a ciclo pelo equipamento acima citado.

Todas as amostras foram amplificadas sempre em duplicata em placas de 96 poços (Sorenson, BioScience Inc) com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. As reações foram realizadas em um volume total de 25 µl contendo 10 ng de cDNA dos pacientes, obtido a partir da transcrição reversa com *oligo(dT)* e *Superscript III* (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante, 12.5 µl de *SYBRGreen Master Mix PCR* (Applied Biosystems), e os iniciadores nas concentrações pré-estabelecidas. Os dados são coletados na forma de emissão de fluorescência durante os ciclos da reação e analisados em forma de curva.

Para certificação de que a fluorescência emitida não estava sendo gerada por amplificações inespecíficas, foi feita a análise da curva de dissociação, baseada na *T_m* (*Melting Temperature*) específica de cada produto, que é determinada pela sua composição de nucleotídeos. A cada variação da temperatura, que acontece entre 60°C à 95°C logo após o término do PCR, são coletados dados de fluorescência. A curva de dissociação ocorre quando em determinada temperatura ocorre desnaturação do produto de PCR e conseqüente queda de fluorescência gerada pelo *SYBRGreen*, já que este se intercala somente fita dupla de DNA.

A determinação dos valores para quantificação da expressão é feita com a determinação do *threshold*, que representa o momento em que o sistema detecta luz de maneira “inequívoca” nas amostras, diferenciando o sinal real do ruído de fundo. O ponto de encontro entre esta linha e a curva de amplificação é denominado *threshold cycle*, ou *Ct*.

Quanto maior a expressão do gene, mais precocemente ele será amplificado e, conseqüentemente, menor será o Ct. Os dados de Ct de cada gene foram exportados para uma planilha de Excell (Microsoft Corporation), para análise. O método de quantificação da expressão gênica utilizado é denominado “análise relativa dos dados”, onde a expressão dos genes escolhidos é quantificada em relação a uma situação considerada como referência, que constitui a amostra calibradora.

A análise relativa dos dados foi obtida segundo Vandesompele e cols. (VANDESOMPELE *et al.* 2002), utilizando o programa Gnorm. A expressão dos genes estudados foi normalizada usando GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) e B2M (beta-2-microglobulin) como controle internos constitutivos. Para K562, as análises foram realizadas a partir da média dos valores normalizados de duas culturas independentes. Nestes experimentos, K562-0h foi utilizada como referência. Os resultados são apresentados como a diferença de expressão (*fold change*), como a percentagem de expressão diferencial em comparação com as amostras de referência não tratadas (K562), ou como valores normalizados para os grupos de pacientes (reticulócitos). Os dados foram comparados entre os grupos de pacientes usando o teste não paramétrico de Mann-Whitney e a significância estatística foi definida como $P < 0.05$.

Tablela 2. Iniciadores usados em análise de expressão gênica, utilizando experimentos de PCR em tempo real, em Biblioteca Subtrativas.

Gene	Iniciadores	Concentração (nmol/L)
HBA	Forward: 5'-TGGTCCCCACAGACTCAGAGA - 3' Reverse: 5'-CGGCCTTGACGTTGGTCTT-3'	150
HBB	Forward: 5'-AGGCACCGAGCACTTTCTTG-3' Reverse: 5'-ATCTGTCCACTCCTGATCCAGTT-3'	300
HBG	Forward: 5'-CATGGCAAGAAGGTGCTGACT-3' Reverse: 5'-GCAAAGGTGCCCTTGAGATC-3'	150
ZDHHC2	Forward: 5'-CTGATTCTCAGTCTTGGACGG-3' Reverse: 5'-CATGGTTAATGCAGGATTGCT-3';	300
PHC3	Forward: 5'-GCGAGAGAAACATATCCTTAGG -3' Reverse: 5'-AGTTGTCATAGCAGATGGCACA -3';	150
NACA	Forward: 5'- CAGTCAGTAAAGCAAAACAGAGT -3' Reverse: 5'- CGAAGACCCAGTTTGGACA -3';	150
STAT5A	Forward: 5'- GGCCACTTAACATGGCAGGA -3' Reverse: 5'- CATAATCTACCAAGGTCATGGATCG-3'	300
STAT5B	Forward: 5'- TGTGTCCCCAGGCTCACTATAAC -3' Reverse: 5'- GAAGTCCCCATCGGTGTCAA -3';	150
ZHX1	Forward: 5'- GACACTTGGAACCTCCACG-3' Reverse: 5'- GGCAAATTCACAGTAAATCAGACAT-3';	300
MIER1	Forward: 5'- GGGCTCCATGTTTCAAGCA -3' Reverse: 5'- TCAGGGTCCCACAGGAGC-3';	150
CRCT2	Forward: 5'- GACCCACTGTTCCCGCC-3' Reverse: 5'- TTAGAGAAACCTGGAGAGGAGTCC-3';	150
SMARCA4	Forward: 5'- CGTCATGCTCCTGTGCCA-3' Reverse: 5'- GGTGAAGACCGACTGCAAGA-3';	300
PHF2	Forward: 5'- AAAGGCTCAGACGACGCTC-3' Reverse: 5'- TGTACCCTCACGCACAGGC-3';	150
ZNF160	Forward: 5'- ACCGCACCCTCCACCT-3' Reverse: 5'- AGCCGGGATCTCTCTAGG-3';	300
B2M	Forward: 5'-TGACTTTGTACAGCCCAAGATA-3' Reverse: 5'-GGCATCTTCAAACCTCCATGA-3';	150
GAPDH	Forward: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' Reverse: 5'-CCACTTGATTTTGGAGGGATCT-3'	300

HBA (α -globina); *HBB* (β -globina); *HBG* (γ -globina); *NACA* (nascent-polypeptide-associated complex alpha subunit); *STAT5* (Signal transducer and activator of transcription-5); *ZHX1* (zinc fingers and homeoboxes 1); *MIER1* (mesoderm induction early response 1); *CRCT2* (CREB regulated transcription coactivator 2); *SMARCA4* (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4); *PHF2* (PHD finger protein 2); *ZNF160* (zinc finger protein 160); *ZDHHC2* (zinc finger, DHHC-type containing 2); *PHC3* (polyhomeotico homologo 3); *B2M* (beta-2-microglobulin); *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

4- Resultados

4.1. Bibliotecas Subtrativas

No intuito de identificar genes com expressão diferencial induzida por HU, foram estabelecidas quatro bibliotecas subtrativas supressivas (SSH) de cDNA, correspondendo a genes com expressão aumentada e diminuída tanto em células da linhagem K562 tratadas e não tratadas com HU, bem como em reticulócitos de pacientes com AF submetidos e não submetidos ao tratamento com esta droga. Testes de eficiência foram realizados para as bibliotecas de cultura, utilizando iniciadores para GAPDH, e confirmaram subtração de transcritos comumente expressos (Figuras 6 e 7). Os testes para bibliotecas de reticulócitos não apresentaram produtos de amplificação detectáveis em nenhuma das condições, reproduzindo achados prévios para bibliotecas subtrativas de reticulócitos (DE ANDRADE *et al.*, 2006).

Um total de 139 sequências de cDNA foram geradas para a biblioteca subtrativa K562-0h (sem tratamento) e 167 sequências para a biblioteca K562-HU72h (após 72hs de tratamento com 100µM de HU), todas com altos escores no alinhamento com BLAST. Destas, 103 representaram sequências únicas em K562-0h e 87 sequências únicas em K562-HU72h. Foram detectados 55 genes com expressão diferencial em K562-0h, podendo representar transcritos com expressão diminuída em células de K562 após tratamento com HU. K562-HU72h apresentou 58 genes com expressão possivelmente aumentada após administração de HU.

Os genes identificados correspondem à várias funções distintas e estão listados na Tabela 3 para K562-0h e Tabela 4 para K652-HU72h, com o número de clones detectados e função molecular, de acordo com o *Gene Ontology*. Aqueles genes com participação em processos de transcrição gênica e transdução de sinal, possivelmente envolvidos na regulação gênica de globinas e na diferenciação eritróide, estão destacados nas tabelas 3 e 4. Também são apresentadas as proteínas hipotéticas identificadas nas duas bibliotecas.

Tabela 3. Transcritos encontrados na biblioteca K562-0h.

Nome do Gene	Gene (Sigla)	Função Molecular (GO)	Número de Clones
FATORES DE TRANSCRIÇÃO			
PHD finger protein 2	PHF2	Metal ion binding, protein binding, transcription factor activity, zinc ion binding	1
THAP domain containing 4	THAP4	DNA binding, metal ion binding, zinc ion binding	1
zinc fingers and homeoboxes 1	ZHX1	Metal ion binding, protein binding, sequence-specific DNA binding, zinc ion binding	1
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	SMARCA4	ATP binding, DNA binding, helicase activity, hydrolase activity, nucleotide binding, protein binding, transcription coactivator activity, transcription factor activity	1
zinc finger protein 160	ZNF160	DNA binding, metal ion binding, nucleic acid binding, zinc ion binding	1
polymerase (RNA) I polypeptide A, 194kDa	POLR1A	DNA binding, DNA-directed RNA polymerase activity, metal ion binding, protein binding, transferase activity, zinc ion binding	1
SINALIZAÇÃO CELULAR			
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	YWHAZ	Monooxygenase activity, protein domain specific binding, transcription factor binding	4
mesoderm induction early response 1 homolog (Xenopus laevis)	MIER1	DNA binding, signal transducer activity	1
CREB regulated transcription coactivator 2	CRTC2	Protein binding	1
polo-like kinase 1 (Drosophila)	PLK1	ATP binding, nucleotide binding, protein binding, protein serine/threonine kinase activity, transferase activity	1

ethanolamine kinase 1	ETNK1	Ethanolamine kinase activity, kinase activity, transferase activity	1
Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	ARHGEF7	Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity, guanyl-nucleotide exchange factor activity	1
ralA binding protein 1	RALBP1	ATPase activity, coupled to movement of substances, GTPase activator activity, Rac GTPase activator activity, Rac GTPase binding, Ral GTPase binding, protein binding	1
axin 1	AXIN1	Protein binding, signal transducer activity	1
OUTRAS FUNÇÕES			
tubulin, alpha 1b	TUBA1B	GTP binding, GTPase activity, nucleotide binding, structural molecular activity	4
synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	SYNCRIP	RNA binding, protein binding, nucleotide binding, nucleic acid binding	3
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 27	DDX27	ATP binding, ATP-dependent helicase activity, hydrolase activity, nucleic acid binding, nucleotide binding	3
phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class S	PIGS	GPI-anchor transamidase activity, protein binding	2
translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog A (yeast)	TIMM17A	Protein translocase activity	2
solute carrier family 25, member 37	SLC25A37	Binding, iron ion binding, iron ion transporter activity	2
PEST proteolytic signal containing nuclear protein	PCNP	Protein binding Cell cycle, Proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process, protein ubiquitination	2
OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 1	OTUB1	Cysteine-type peptidase activity	2
coiled-coil domain containing 12	CCDC12	Unknown	1
UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 5	B4GALT5	Galactosyltransferase activity, manganese ion binding, metal ion binding,	1

zinc finger protein 403	ZNF403	transferase activity, transferring glycosyl groups Process: Cell differentiation, multicellular organismal development, spermatogenesis	1
pleckstrin homology domain containing, family O member 1	PLEKHO1	Unknown	1
voltage-dependent anion channel 1	VDAC1	Apoptogenic cytochrome C release channel activity, voltage-gated anion channel porin activity, voltage-gated ion-selective channel activity	1
testis enhanced gene transcript (BAX inhibitor 1)	TEGT	Apoptosis, negative regulation of apoptosis	1
thioredoxin domain containing 5	TXNDC5	Isomerase activity	1
transportin 2 (importin 3, karyopherin beta 2b)	TNPO2	Binding, nuclear localization sequence binding, protein transporter activity	1
stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	SCD	Iron ion binding, oxidoreductase activity, oxidoreductase activity, acting on paired donors, with oxidation of a pair of donor resulting in the reduction of molecular oxygen to two molecules of water, stearoyl-CoA 9-desaturase activity	1
synovial apoptosis inhibitor 1, synoviolin	SYVN1	Metal ion binding, protein binding, zinc ion binding	1
Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)	SSB	mRNA binding, nucleotide binding, tRNA binding	1
similar to SRR1-like protein	CTB- 1048E9.5	Unknown	1
ribosomal protein S2	RPS2	RNA binding, structural constituent of ribosome	1
replication protein A2, 32kDa	RPA2	Nucleic acid binding, protein binding, single-stranded DNA binding	1
platelet-derived growth factor alpha polypeptide	PDGFA	Growth factor activity, platelet-derived growth factor receptor binding	1
neurofibromin 2 (bilateral acoustic neuroma)	NF2	Cytoskeletal protein binding, structural molecule activity	1

citrate synthase	CS	Citrate (Si)- Synthase activity, transferase activity, transferase activity, transferring acyl groups, acyl groups converted into alkyl on transfer	1
eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, 110kDa	EIF3S8	translation initiation factor activit	1
eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	EEF1G	Protein binding, translation elongation factor activity	1
eukaryotic translation initiation factor 4B	EIF4B	RNA binding, nucleic acid binding, nucleotide binding, translation initiation factor activit	1
eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 9 eta, 116kDa	EIF3S9	RNA binding, nucleotide binding, translation initiation factor activity	1
cell division cycle 34 homolog (S. cerevisiae)	CDC34	Ligase activity, ubiquitin-protein ligase activity	1
capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1	CAPZA1	Actin cytoskeleton organization and biogenesis, barbed- end actin filament capping, cell motility, protein complex assembly	1
GDP-mannose pyrophosphorylase A	GMPPA	Acytransferase activity, nucleotidytransferase activity	1
germ cell-less homolog 1 (Drosophila)	GMCL1	Protein binding	1
geminin, DNA replication inhibitor	GMNN	Protein binding	1
nucleoporin 214kDa	NUP214	porin activity, protein binding, transporter activity	1
Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha	IDH3A	Isocitrate dehydrogenase (NAD+) activity, oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP acceptor	1
aldolase A, fructose-bisphosphate	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldose activity, lyase activity	1
PROTEINAS HIPOTÉTICAS			
DKFZp547E087 hypothetical gene LOC283846	DKFZp547E087	Unknown	1
hypothetical protein LOC92249	LOC92249	Unknown	1

hypothetical protein LOC283378	LOC283378	Unknown	1
hypothetical protein LOC92249	LOC92249	Unknown	1
FLJ14186 hypothetical gene supported by AK024248; AL137733	FLJ14186	Unknown	1

Tabela 4. Transcritos encontrados na biblioteca K562-HU72hs.

Nome do Gene	Gene (Sigla)	Função Molecular (GO)	Número de Clones
FATORES DE TRANSCRIÇÃO			
calcium binding and coiled-coil domain 1	CALCOCO 1	protein binding, transcription co activator activity	1
PHD finger protein 19	PHF19	Nucleic acid binding, protein binding, zinc ion binding	1
LIM domain only 4	LMO4	metal ion binding, zinc ion binding, transcription factor activity, transcription factor binding	1
myeloid/lymphoid or mixed- lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)	MLL	ATP binding, DNA binding, RNA polymerase II transcription factor activity, metal ion binding, protein binding, protein homodimerization activity, protein kinase activity, transcription factor activity, zinc ion binding	1
nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide	NACA	DNA binding	1
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 2	NFKBIL2	Binding, protein binding, transcription co repressor	1
zinc finger E-box binding homeobox 2	ZEB2	SMAD binding, metal ion binding, nucleic acid binding, phosphatase regulator activity, sequence-specific DNA binding, transcription factor activity, transcription repressor activity, zinc ion binding	1
polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E (80kD)	POLR3E	DNA-directed RNA polymerase activity,	1

		transferase activity	
SINALIZAÇÃO CELULAR			
G protein pathway suppressor 2	GPS2	GTPase inhibitor activity, protein binding	2
cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 2 (flamingo homolog, Drosophila)	CELSR2	G-protein coupled receptor activity, calcium ion binding, receptor activity	1
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	MAP3K1	ATP binding, MAP kinase activity, magnesium ion binding, nucleotide binding, protein binding, protein serine/threonine kinase activity, transferase activity, zinc ion binding	1
sequestosome 1	SQSTM1	SH2 domain binding, metal ion binding, protein binding, protein kinase binding, receptor tyrosine kinase binding, ubiquitin binding, zinc ion binding	1
signal transducer and activator of transcription 5A/B	STAT5A/B	Calcium ion binding, signal transducer activity, transcription factor activity	1
WD repeat and SOCS box-containing 1	WSB1	Biological process, intracellular signaling cascade	1
OUTRAS FUNÇÕES			
solute carrier family 25, member 37	SLC25A37	Binding, iron ion binding, iron ion transporter activity	14
chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	CCT2	ATP binding, nucleotide binding, unfolded protein binding	6
zinc finger, UBR1 type 1	ZUBR1	Ubiquitin-protein ligase activity, zinc ion binding	6
hexose-6-phosphate dehydrogenase (glucose 1-dehydrogenase)	H6PD	6-phosphogluconolactonase activity, glucose 1-dehydrogenase activity, glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase activity,	4

transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 2	TRPV2	hydrolase activity, oxidoreductase activity, Calcium channel activity, calcium ion binding, ion channel	4
Nischarin	NISCH	Phosphoinositide binding, protein binding	3
dynactin 4 (p62)	DCTN4	Protein N-terminus binding	2
glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6PD	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase activity, oxidoreductase activity	2
glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	GCLC	ADP binding, coenzyme binding, glutamate binding, glutamate-cysteine ligase activity, ligase activity, magnesium ion c, protein heterodimerization activity	2
hook homolog 2 (Drosophila)	HOOK2	Microtubule binding, protein binding	2
importin 9	IPO9	Ran GTPase binding, histone binding, protein transporter activity	2
translocation protein 1	TLOC1	Protein transporter activity, receptor activity	2
actin, gamma 1	ACTG1	ATP binding, nucleotide binding, protein binding, structural constituent of cytoskeleton	1
myosin binding protein C, cardiac			
Homo sapiens, Similar to cytochrome c oxidase III, clone	MYBPC3	Actin binding, protein binding, structural constituent of muscle	
adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit	AP2M1	Lipid binding, protein binding, transporter activity	1
alkB, alkylation repair homolog 5 (E. coli)	ALKBH5	Unknown	1
ankyrin repeat and IBR domain containing 1	ANKIB1	Metal ion binding, protein binding, small conjugating protein ligase activity, zinc ion binding	1
Cathepsin D	CTSD	Caphepsin D activity, pepsin A activity,	1

copine VII	CPNE7	peptidase activity	
cytochrome b5 reductase 3	CYB5R3	Transporter activity	1
		FAD binding, NAD binding, cytochrome-b5 reductase activity, oxidoreductase activity	1
eukaryotic translation elongation factor 2	EEF2	GTP binding, GTPase activity, nucleotide binding, translation elongation factor activity	1
eukaryotic translation initiation factor 1	EIF1	Translation initiation factor activity	1
farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1	FDFT1	Farnesyl-diphosphate farnesyl transferase activity, magnesium ion binding, axidoreductase activity, transferase activity	1
glycosyltransferase 25 domain containing 1	GLT25D1	Transferase activity	1
hemoglobin, alpha 2	HBA2	Heme binding, iron ion binding, metal ion binding, oxygen binding, oxygen transporter activity, protein binding	1
Hermansky-Pudlak syndrome 4	HPS4	Protein homodimerizatin activity	1
Homo sapiens mRNA similar to NADH dehydrogenase 1		Unknown	1
insulin induced gene 1	INSIG1	Unknown	1
leucine rich repeat containing 59	LRRC59	Protein binding	1
mannosidase, alpha, class 2A, member 2	MAN2A2	Alpha-mannosidase activity, hydrolase activity, acting on glycosyl bond, mannosyl-oligosaccharide 1,3-1,6-alpha-mannosidase activity	1
Moesin	MSN	Cytoskeletol protein binding, receptor binding, structural constituent of cytoskeleton	1

Myeloma overexpressed 2	MYEOV	Unknown	1
NEFA-interacting nuclear protein NIP30	NIP30	Unknown	1
N-myc downstream regulated gene 1	NDRG1	Protein binding	1
paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta	PILRB	Protein binding, receptor activity	1
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 1	PSMB1	Protein binding, theonine endopeptidase activity	1
Pyrroline-5-carboxylate reductase family, member 2	PYCR2	Oxidoreductase activity, pyrroline-5-carboxylate reductase activity	1
quaking homolog, KH domain RNA binding (mouse)	QKI	RNA binding	1
sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4B	SEMA4B	Receptor activity	1
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y ⁺ system), member 8	SLC7A8	L-amino acid transporter activity, amino acid permease activity, amino acid transporter activity, neural amino acid transporter activity, peptide antigen binding	1
tubulin, beta 2A	TUBB2A	GTP binding, GTPase activity, nucleotide binding, structural constituent of cytoskeleton	1
Ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	UQCRCF1	2 iron, 2 sulfur cluster binding, iron ion binding, metal ion binding, oxidoreductase activity, ubiquinol-cytochrome-c reductase activity	1
PROTEINAS HIPOTÉTICAS			
KIAA2013	KIAA2013	Unknown	2
KIAA0922	KIAA0922	Unknown	1
LOC284296 hypothetical	LOC284296	Unknown	1

Nas bibliotecas de reticulócitos foram identificadas 132 e 184 sequências com altos escores de homologia para Ret-SSH (pacientes sem tratamento) e RetHU-SSH (pacientes em tratamento com HU), respectivamente. Foram encontrados 11 genes conhecidos diferenciamamente expressos em Ret-SSH, que podem representar transcritos com expressão diminuída por HU. RetHU-SSH apresentou 19 genes conhecidos, 2 ORFs (*Open Reading Frames*), 1 proteína hipotética e 1 EST (*Expressed Sequence Tag*).

O gene com maior número de transcritos detectados em Ret-SSH foi SLC25A37 (*Solute carrier family 25, member 37*). Nas amostras sem HU, o gene mais expresso foi PHC3 (*Polyhomeotic homolog 3 - Drosophila*). As Tabelas 5 e 6 mostram a lista completa dos transcritos, representados nas duas bibliotecas e correspondendo aos genes anotados e às proteínas hipotéticas identificadas. As tabelas apresentam ainda o número total de clones detectados e a função molecular de acordo com o *Gene Ontology*, para cada transcrito.

Tabela 5. Transcritos encontrados na biblioteca RetHU-SSH.

Nome do Gene	Gene (Sigla)	Função Molecular (GO)	Número de Clones
solute carrier family 25, member 37	SLC25A37	Binding, iron ion binding, iron ion transporter activity	105
Homo sapiens cDNA FLJ13267 fis, clone OVARC1000964		Unknown	16
DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	DCUN1D1	Unknown	15
chromosome 6 open reading frame 62	C6orf62	Unknown	5
zinc finger, DHHC-type containing 2	ZDHHC2	Metal ion binding, palmitoyltransferase activity, transferase activity, zinc ion binding	4

chromosome 22 open reading frame 13	C22orf13	Unknown	3
family with sequence similarity 46, member C	FAM46C	Unknown	3
poly(A) binding protein, cytoplasmic 1	PABPC1	RNA binding, nucleotide binding, poly (A) binding, protein binding, translation activator activity	3
cell division cycle 34 homolog (S. cerevisiae)	CDC34	Ligase activity, ubiquitin-protein ligase activity	2
family with sequence similarity 104, member A	FAM104A	Unknown	2
Transmembrane protein 111	TMEM111	Unknown	2
6-phosphofructo-2- kinase/fructose-2,6- biphosphatase 2	PFKFB2	6-phosphofructo-2-kinase activity, fructose-2,6-bisphosphate 2- phosphatase activity, hydrolase activity, kinase activity, nucleotide binding, transferase activity	1
autocrine motility factor receptor	AMFR	Ligase activity, metal ion binding, protein binding, receptor activity, ubiquitin-protein ligase activity, zinc ion binding	1
fem-1 homolog a (C. elegans)	FEM1A	Receptor activity	1
frizzled homolog 5 (Drosophila)	FZD5	G- protein coupled receptor activity, non-G- protein coupled 7TM receptor activity, protein binding, receptor activity	1
Hephaestin	HEPH	Copper ion binding, copper ion transporter activity, iron ion binding, metal ion binding,	1

		oxireductase activity	
hypothetical LOC388969		Unknown	1
ribosomal protein S11	RPS11	rRNA binding, structural	1
		constituent of ribosome	
ribosomal protein S25	RPS25	RNA binding, structural	1
		constituent of ribosome	
RIO kinase 3 (yeast)	RIOK3	ATP binding, kinase activity, nucleotide binding, protein serine/threonine kinase activity, transferase activity	1
striatin, calmodulin binding protein 3	STRN3	Calmodulin binding	1
suppressor of defective silencing 3 homolog (S. cerevisiae)	SUDS3	Histone deacetylase binding, protein binding	1
ubiquitin-conjugating enzyme E2B	UBE2B	Ligase activity, protein binding, ubiquitin-protein ligase activity	1

Tabela 6. Transcritos encontrados na biblioteca Ret-SSH.

Nome do Gene	Gene (Sigla)	Função Molecular (GO)	Número de Clones
polyhomeotic homolog 3 (Drosophila)	PHC3	DNA binding, metal ion binding, zinc ion binding	9
ribosomal protein S29	RPS29	RNA binding, metal ion binding, structural constituent of ribosome, zinc ion binding	5
solute carrier family 4, anion exchanger, member 1	SLC4A1	Anion transporter activity, inorganic anion exchanger	5

(erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group)		activity, protein binding	
hemoglobin, alpha	HBA	Heme binding, iron ion binding, metal ion binding, oxygen binding, oxygen transporter activity, protein binding	3
basigin (Ok blood group)	BSG	Manose binding, signal transducer activity, sugar binding	2
Homo sapiens migration- inducing protein 6 (MIG6) mRNA, complete cds	MIG6	Unknown	2
phosphatase, orphan 1	PHOSPHO1	Hydrolase activity, magnesium ion binding, phosphoric monoester hydrolase activity	2
heparan sulfate proteoglycan 2	HSPG2	Cell adhesion, protein localization	1
Moesin	MSN	Cytoskeletal protein binding, receptor binding, structural constituent of cytoskeleton	1
nucleobindin 1	NUCB1	DNA binding, calcium ion binding	1
Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 1	TAX1BP1	Nucleic acid binding, protein binding	1

4.2. Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real

Para validar os resultados encontrados nas bibliotecas de K562, foram selecionados genes de globinas (HBA, HBB e HBG), NACA, STAT5A e STAT5B, representando genes com expressão potencialmente induzida, e MIER1 (mesoderm induction early response 1), PHF2 (PHD finger protein 2), SMARCA4 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4), ZNF160 (zinc finger protein 160), ZHX1 (zinc fingers and homeoboxes 1) e CRTC2 (CREB regulated transcription coactivator 2), representando genes com expressão reprimida por HU, para estudos com PCR em tempo real em K562. A EST correspondente à STAT5 detectada na biblioteca K562-HU72h não permite a distinção entre os dois genes proximalmente relacionados (STAT5A e STAT5B). Neste caso, foram desenhados iniciadores para amplificar especificamente os transcritos de STAT5A ou STAT5B.

Os dados da Figura 13 são apresentados como percentagem de expressão gênica diferencial de amostras de K562 após 72hs de tratamento com HU relativos à células desta linhagem sem tratamento (K562-0h). Os dados normalizados são apresentados na Tabela 7 com a diferença de expressão (*fold change*).

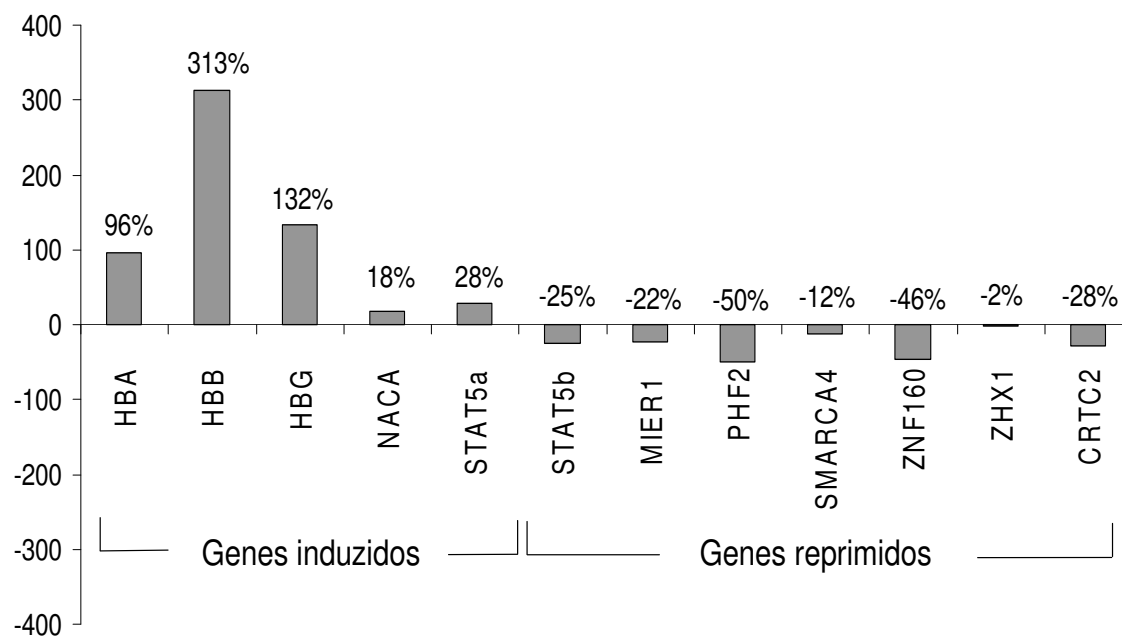


Figura 13. Expressão por qRT-PCR de genes selecionados em culturas de K562 tratadas e não tratadas com HU. Os valores apresentados representam as porcentagens de expressão gênica diferencial em amostras com HU após 72hs da administração (K562-HU72hs), relativas à células de K562 sem HU (K562-0h).

Tabela 7. Resultados de qRT-PCR para culturas de K562. Valores correspondem à média obtida de duas culturas independentes e normalizados utilizando GAPDH e B2M como controles internos.

Gene	Valor Normalizado (K562-0h)	Valor Normalizado (K562-HU72hs)	<i>Fold Change</i> (K562- HU72hs/ K562-0hs)
HBA	0,556	1,088	1.95
HBB	0,232	0,961	4.19
HBG	0,726	1,690	2.32
NACA	1,005	1,188	1.18
STAT5A	1,149	1,476	1.28
STAT5B	1,281	0,962	0.75
ZHX1	1,015	0,992	0.97
MIER1	0,750	0,581	0.77
CRCT2	1,174	0,843	0.71
SMARCA4	1,305	1,149	0.88
PHF2	1,005	0,499	0.50
ZNF160	1,083	0,583	0.53

HBA (α -globina); *HBB* (β -globina); *HBG* (γ -globina); *NACA* (nascent-polypeptide-associated complex alpha subunit); *STAT5* (Signal transducer and activator of transcription-5); *ZHX1* (zinc fingers and homeoboxes 1); *MIER1* (mesoderm induction early response 1); *CRCT2* (CREB regulated transcription coactivator 2); *SMARCA4* (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4); *PHF2* (PHD finger protein 2); *ZNF160* (zinc finger protein 160); *ZDHHC2* (zinc finger, DHHC-type containing 2); *PHC3* (polyhomeotico homologo 3); *B2M* (beta-2-microglobulin); *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

O padrão de expressão diferencial de todos os genes analisados por PCR em tempo real foi confirmado, embora alguns destes apresentaram diferenças sutis nos níveis de expressão de RNAm (Figura 13 e Tabela 7). STAT5A e STAT5B apresentaram um padrão diferente de expressão. Enquanto STAT5A tem expressão aumentada, os níveis de STAT5B aparecem diminuídos.

A expressão de NACA, STAT5A, STAT5B, SMARCA4, ZHX1, CRT2 e os dos genes de globinas também foi estudada em reticulócitos circulantes de pacientes com AF tratados e não tratados com HU. Como esperado, a expressão de γ -globina (HBG) foi significativamente maior no grupo de pacientes recebendo tratamento com HU ($p=0.014$), concordando com os dados hematológicos destes pacientes (Tabela 1, Figura 14). Os níveis de α -globina (HBA) foram pouco diminuídos e os de β -globina pouco aumentados no grupo de pacientes recebendo tratamento com HU, em relação ao grupo sem tratamento, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significantes (valor de p para HBA=0.29 e HBB=0.32).

NACA e STAT5B também estão aumentados com diferenças estatísticas significativas ($p<0.001$ e $p=0.01$, respectivamente). Similarmente, os níveis de STAT5A são maiores no grupo com HU, embora isto não pôde ser confirmado estatisticamente ($p=0.41$). Em dois indivíduos do grupo de pacientes sem tratamento com HU, STAT5A não pôde ser identificado pela amplificação por PCR em tempo real, o que pode refletir expressão gênica abaixo de níveis detectáveis. Para os outros genes estudados, as diferenças de expressão não foram estatisticamente significativas em nossos experimentos, com exceção de CRT2 que apresentou um padrão inverso do observado nos resultados com células de K562.

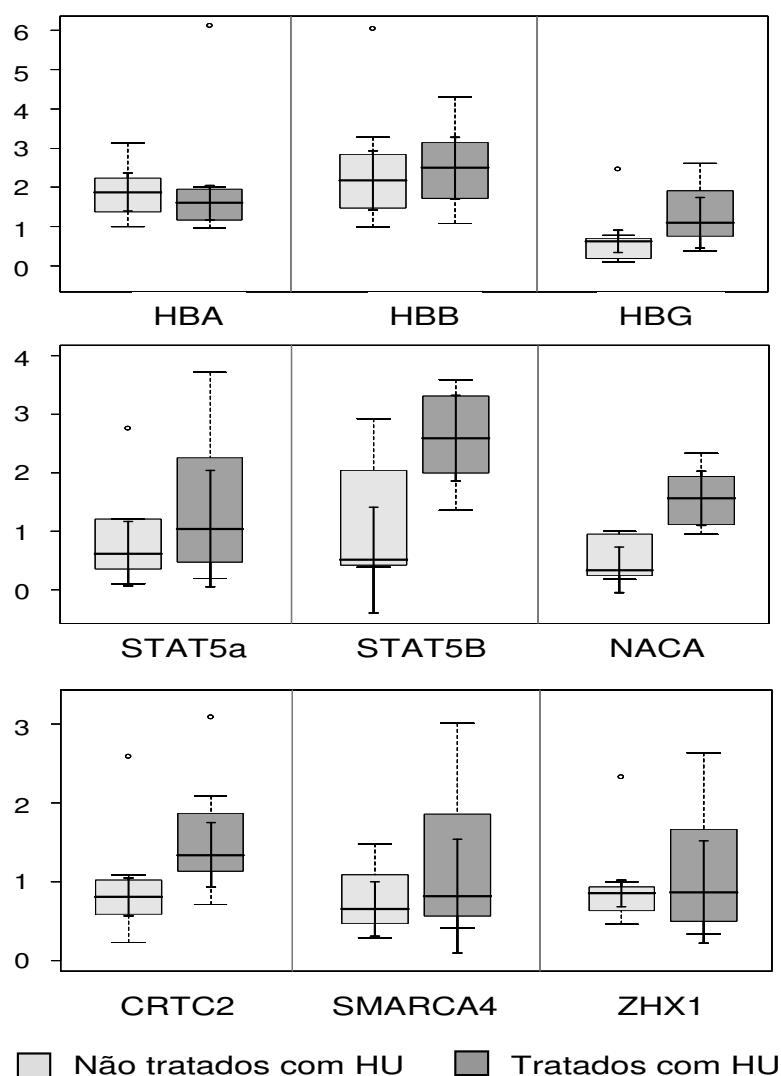


Figura 14. Experimentos de expressão gênica em reticulócitos de pacientes com AF tratados e não tratados com HU, de genes detectados nas bibliotecas de K562. Para cada grupo, o número de pacientes foi de 8 indivíduos, com exceção de STAT5A no grupo não tratado com HU (n=6). Os genes das globinas HBA, HBB e HBG também foram estudados nestes pacientes. Os valores de P foram significativos para HBG ($p=0.014$), STAT5B ($p=0.01$), NACA ($p<0.001$) e CRTC2 ($p=0.019$). HBA ($p=0.29$), HBB ($p=0.32$), STAT5A ($p=0.41$), SMARCA4 ($p=0.16$), ZHX1 ($p=0.52$).

ZDHHC2 (zinc finger, DHHC-type containing 2) e PHC3 (polyhomeotic homolog 3) foram selecionados das bibliotecas de reticulócito como genes aumentado e diminuído com HU, respectivamente, para quantificação da expressão gênica em reticulócitos. O padrão de expressão gênica diferencial de ZDHHC2 e PHC3 esteve de acordo com os resultados das bibliotecas subtrativas, embora as diferenças na expressão de PHC3 entre os grupos não possam ser confirmadas estatisticamente ($p=0.25$) (Figura 15). Os níveis de ZDHHC2 foram significativamente maiores no grupo de pacientes com AF tratado com HU ($p=0.005$).

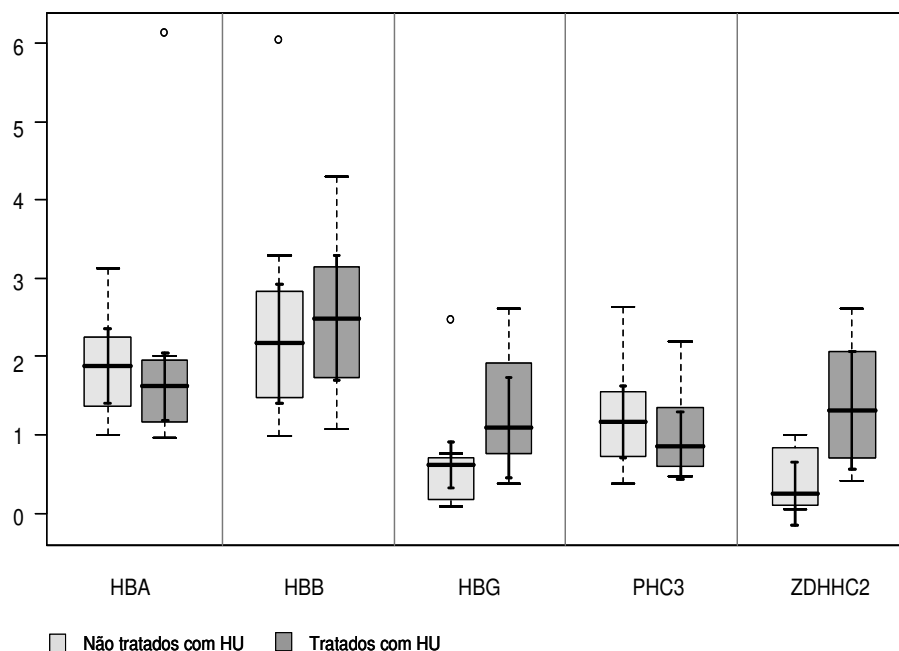


Figura 15. Experimentos de expressão gênica em reticulócitos de pacientes com AF tratados e não tratados com HU, de genes detectados nas bibliotecas de reticulócitos. Os dados para globinas também são apresentados como referência. Para cada grupo, o número de pacientes foi de 8 indivíduos. Os valores de P foram significativos para HBG ($p=0.014$) e ZDHHC2 ($p=0.005$). PHC3 ($p=0.25$), HBA ($p=0.29$), HBB ($p=0.32$).

5- Discussão

Neste trabalho são descritos genes diferencialmente expressos que foram encontrados em células da linhagem K562 e em reticulócitos de pacientes com AF quando submetidos a tratamento com HU. Os dados da literatura mostram que HU aumenta a síntese de HbF e melhora os sintomas clínicos associados à AF, embora os mecanismos moleculares subjacentes ainda não estejam completamente elucidados (XU & ZIMMER 1998; ZHANG *et al.* 2001).

Para identificação destes genes, foram obtidos quatro perfis de expressão gênica, correspondendo os genes com expressão aumentada e diminuída por HU tanto em K562 quanto em reticulócitos de pacientes com AF, utilizando o método de SSH (DIATCHENKO 1996). Este método permite a exclusão de genes com expressão comum à duas condições distintas de estudo e normalização das bibliotecas, favorecendo a detecção de transcritos com baixa expressão (DIATCHENKO 1996).

Para validação dos resultados obtidos, os níveis de RNAm de vários transcritos detectados nas bibliotecas foram também avaliados por PCR em tempo real (qRT-PCR), cuja sensibilidade permite uma quantificação mais precisa da expressão gênica. Esta análise foi realizada em culturas de K562 tratadas e não tratadas com HU, especificamente para genes detectados nas bibliotecas de K562, e em reticulócitos de pacientes com AF submetidos ou não ao tratamento com HU, para genes detectados nas quatro bibliotecas.

Reticulócitos são células anucleadas extremamente diferenciadas que dão origem às hemácias na diferenciação eritróide terminal e estão em baixa proporção na corrente sanguínea (cerca de 1-2%). Alguns estudos demonstraram que vários transcritos além das globinas são expressos nestas células, o que as torna um modelo adequado para estudos *in vivo* de expressão gênica nas fases finais da diferenciação eritróide (BONAFOUX *et al.* 2004; CRABLE *et al.* 2005; DE ANDRADE *et al.* 2006).

A linhagem celular K562, por sua vez, tem sido proposta como modelo *in vitro* útil para estudos sobre os mecanismos moleculares que regulam a expressão dos genes de globinas embrionários e fetais (RUTHERFORD *et al.*, 1979), bem como para a identificação de novos compostos que induzem a diferenciação eritróide e a expressão de HbF (BIANCHI *et al.*, 1999; BIANCHI *et al.* 2000; FIBACH *et al.*, 2003; MISCHIATI *et al.*, 2004). Esta linhagem celular, isolada e caracterizada por Lozzio & Lozzio, 1975, de

uma paciente com leucemia mielóide crônica, exibe uma baixa proporção de síntese de Hb sob condições padrões, mas pode sofrer diferenciação eritróide quando tratada com uma variedade de compostos, incluindo HU (SMITH *et al.* 2000; XU & ZIMMER 1998), hemina (RUTHERFORD *et al.*, 1979), ara-C (BIANCHI *et al.*, 1999), 5-azacytidine (GAMBARI *et al.*, 1984), dentre outros (BIANCHI *et al.*, 1999; BIANCHI *et al.*, 2000; BIANCHI *et al.*, 2001; CHIARABELLI *et al.*, 2003).

Estudos *in vitro* demonstram que indutores de diferenciação eritróide como a HU também são capazes de induzir a produção de HbF, e aumentar a expressão do RNAm de globinas em K562 e células eritróides normais (FIBACH *et al.*, 1993; SMITH *et al.* 2000; XU & ZIMMER 1998; JIANG *et al.* 1997), induzindo a hemoglobinizacão das células. Embora o mecanismo pelo qual a HU afeta a expressão dos genes de globina e induz a diferenciação eritróide ainda não seja conhecido, alguns dados mostram que o tratamento de células da linhagem K562 com HU alteraria o nível de fosforilação de ERK1 (extracelular signal-regulated kinase 1) e p38, que pertencem à família das MAPKs (RAS-mitogen-activated protein kinases) (PARK *et al.*, 2001). Estas proteino-quinases são ativadas em resposta a estresse através da fosforilação de resíduos de treonina e tirosina, e são conhecidamente envolvidas em vários processos celulares como proliferação, sobrevivência e diferenciação celular. Certamente as vias de sinalização celular tem papel crucial para que as modificações causadas por HU nas células sejam refletidas na expressão diferencial de globinas. Os últimos elementos destas vias, ou seja, os fatores de transcrição atuantes, ainda não são entretanto conhecidos.

Alguns estudos mostram que células de K562 produzem quantidades substanciais de RNAm de β - e γ -globina mesmo antes da adição de indutores como HU (NAGAI *et al.* 1997). Nossos resultados de expressão gênica com qRT-PCR confirmam a expressão dos genes de globina HBA, HBB e HBG em condições padrões de cultura, sem HU, como mostra a Tabela 7. Nesta situação, os níveis de HBG são maiores (valor de qRT-PCR normalizado = 0.72), comparados com os níveis de HBA (0.55) e HBB (0.23). Após a adição de HU, os níveis de RNAm destes três genes são elevados para 1.69 (HBG), 1.08 (HBA) e 0.96 (HBB), o que demonstra a hemoglobinizacão e diferenciação eritróide sofrida por estas células. A HBG continua tendo os maiores valores e HBB o menor nível de

expressão, entretanto, HBB tem o maior aumento proporcional (4.19 vezes), dentre as globinas.

Na biblioteca de K562 tratada com HU por 72hs (K562-HU72h), foram identificados os genes NACA e STAT5, dentre outros, indicando um possível aumento da expressão destes genes na presença de HU. A investigação por qRT-PCR utilizando reticulócitos derivados de pacientes com AF submetidos a tratamento com HU demonstrou que estes genes apresentaram o mesmo padrão encontrado em células de K562 (aumento da expressão após tratamento com HU), com a exceção de STAT5B. Além disto, estiveram entre os genes com a expressão diferencial mais significativa entre os dois grupos de pacientes estudados.

NACA, uma proteína co-ativadora da transcrição, foi inicialmente identificada como sendo codificada por um gene responsivo a citocinas na linhagem celular eritroleucêmica humana TF-1 (BAGHDOYAN *et al.* 2000). Dados da literatura sugerem que NACA participa de complexos proteicos, desenvolvendo um papel na proliferação, apoptose ou degradação dependendo do contexto celular ou estímulo. NACA é um co-ativador da transcrição mediada por c-JUN (MOREAU *et al.* 1998), que, por sua vez, é induzida por HU em diversos tipos celulares (YOGEV *et al.* 2006). Outro estudo demonstra seu envolvimento como um regulador positivo da diferenciação celular eritróide humana (LOPEZ *et al.* 2005). Estudos *in vitro* demonstram que a expressão de NACA é mantida durante a diferenciação eritróide de células hematopoéticas CD34 derivadas de cordão umbilical humano, de células TF-1 e células MEL (*mouse erythroleukemic cell line*), mas, em contraste, sua expressão é suprimida na diferenciação megacariocítica ou granulocítica (LOPEZ *et al.* 2005). A superexpressão de NACA em progenitores hematopoéticos normais resulta em uma aceleração da diferenciação eritróide, e em células TF-1, induz hemoglobinizacão independente de EPO. Além disto, experimentos com RNA de interferência (RNAi) em linhagem TF-1 demonstram que o silenciamento de NACA leva a uma diminuição da expressão de hemoglobina nestas células. A expressão aumentada de NACA em K562 tratadas com HU e reticulócitos de pacientes com AF submetidos a tratamento com HU, como demonstrado em nossos experimentos, reforça o possível envolvimento deste gene na diferenciação eritróide e no aumento da expressão dos genes de globinas nestas condições (LOPEZ *et al.* 2005).

STAT5 pertence a uma família de fatores de transcrição citoplasmáticos latentes que transduzem sinais de receptores de superfície celular ativados para o núcleo. As vias de sinalização celular envolvidas na ativação de STAT incluem a fosforilação mediada por JAK de resíduos de tirosina em domínios SH2, levando a uma dimerização de STAT, sua translocação para o núcleo e ligação com elementos responsivos em promotores de genes alvo (LEVY & DARNELL 2002; IHLE 2001). Neste estudo, nós investigamos a expressão de STAT5A e STAT5B em linhagem K562 e reticulócitos de pacientes com AF submetidos e não submetidos a tratamento com HU. Os genes STAT5A e STAT5B possuem uma organização muito similar e apresentam uma identidade de sequências de mais de 93% no nível de cDNA (AMBROSIO *et al.* 2002).

Um transcrito de STAT5 foi detectado na biblioteca K562-HU72hs, o que sugere um aumento da expressão deste gene após administração de HU. A sequência do transcrito de STAT5 presente na biblioteca não permite a identificação do gene. Assim, desenhamos iniciadores para reações de qRT-PCR para ambos os genes. Estes genes apresentaram um padrão de expressão diferente em K562 (STAT5A aumentado, STAT5B diminuído), sugerindo uma resposta diferencial a HU em células de K562 cultivadas. Por outro lado, um aumento da expressão de ambos foi observado em amostras de reticulócitos do grupo de pacientes que estavam sob tratamento com a droga. Embora a expressão diferencial de STAT5A não tenha sido estatisticamente significativa, ela mostrou uma tendência a favor do aumento da expressão no grupo de paciente com tratamento. O aumento da expressão de STAT5B no grupo tratado foi estatisticamente significativa.

STAT5 é ativada em resposta a várias citocinas hematopoéticas (GRIMLEY *et al.* 1999) e tem sido implicada na eritropoese em resposta à EPO e sobrevivência de eritroblastos iniciais pelo aumento de BCL-XL (SOCOLOVSKY *et al.* 1999; SOCOLOVSKY *et al.* 2001). Camundongos *knockout* para Stat5a/5b são caracterizados por uma anemia fetal e apoptose aumentada de progenitores eritróides de fígado fetal, embora a hematopoese adulta tenha sido relatada como normal (SOCOLOVSKY *et al.* 1999; SOCOLOVSKY *et al.* 2001). Stat5, desta forma, desempenha um papel importante na manutenção de altas taxas de eritropoese durante o desenvolvimento fetal e durante a resposta a estresse em camundongos adultos. Estes camundongos são também menos sensíveis a EPO (SOCOLOVSKY *et al.* 1999). De maneira consistente com estas

observações, STAT5 possui um efeito antiapoptótico em linhagens celulares eritróides. Ainda, a superexpressão de uma STAT5 dominante negativa resulta em uma apoptose aumentada e uma inibição do crescimento de progenitores eritróides de fígado fetal (SOCOLOVSKY *et al.* 1999; SOCOLOVSKY *et al.* 2001).

Em contraste, a superexpressão de uma STAT5 constitutivamente ativa em células tronco e progenitores hematopoéticos humanos resultou em um aumento da autorenovação destas células e favoreceu a diferenciação eritróide sobre a mielóide, fornecendo uma vantagem proliferativa de longo termo para progenitores eritróides (CHIDA *et al.* 1999). γ -globina esteve entre os genes detectados com os maiores níveis de expressão nestas células, segundo experimentos com microarranjos e RT-PCR semi quantitativo (CHIDA *et al.* 1999). Em outro estudo, a ativação constitutiva de STAT5 induziu uma diferenciação terminal independente de EPO de progenitores eritróides e a formação de colônias eritróides endógenas (EEC) (SCHURINGA *et al.* 2004). O bloqueio de STAT5 por RNAi em progenitores eritróides humanos inibiu a formação de unidades formadoras de colônia eritróide (CFU-E) na presença de EPO (SCHURINGA *et al.* 2004). Em adição, em um estudo prévio publicado por nosso grupo utilizando SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), transcritos de STAT5 foram encontrados em uma proporção maior em células da medula óssea de uma paciente com AF após o tratamento com HU (Costa *et al.* 2007). Além disto, STAT5, juntamente com JAK2, sabidamente estão envolvidos em várias desordens da produção de células eritróides, onde HU tem sido utilizada para tratamento (SCHAFER, 2006). Em conjunto, estes dados reforçam o possível envolvimento de STAT5 no mecanismo de ação de HU.

Diferentes vias de sinalização celular tem sido descritas em associação com HU e a regulação da transcrição de γ -globina (IKUTA *et al.* 2001; GARÇON *et al.* 2006; COSTA *et al.* 2007). De fato, além de STAT5, nós identificamos alguns transcritos funcionalmente relacionados com transdução de sinal nas duas bibliotecas de K562 (Tabelas 3, 4, 5 e 6). A expressão gênica de STAT5 e NACA poderia ser afetada em um passo abaixo da cascata de sinalização, por alterações no estado de fosforilação ou da expressão destas proteínas de sinalização.

Além destes, outros seis genes foram selecionados das bibliotecas de K562 para estudos com qRT-PCR. Seus padrões de expressão foram confirmados nestas células, mas

estes perfis não puderam ser confirmados em reticulócitos de pacientes. SMARCA4 (BGR1), que foi detectado na biblioteca K562-0h, e portanto potencialmente reprimido por HU, é um membro da família de proteínas SWI/SNF, e descrito como uma subunidade do complexo PYR (O'NEILL *et al*, 2000). O complexo remodelador de cromatina PYR se liga a uma sequência de DNA de 250 pb rica em pirimidinas (*polypyrimidine-rich*-PYR) a aproximadamente 1 Kb à montante do gene da δ -globina. Esta região pode compreender um elemento “demarcador” dos subdomínios fetal e adulto, e a ligação deste complexo pode influenciar na conformação de cromatina local, modificando a expressão dos genes de globinas.

A ligação de PYR ao DNA é dependente da proteína *zinc finger* Ikaros, expressa em tecido hematopoético adulto, e cuja ausência inviabiliza a formação do complexo (LOPEZ *et al*, 2002). Animais nulos para *Ikaros* possuem um atraso na troca dos genes das globinas, o que sugere que PYR pode ter participação neste processo (LOPEZ *et al*, 2002). PYR foi isolado de células MEL (*Murine Erythroleukaemia*), que possuem um ambiente protéico favorável à expressão de genes adultos (O'NEILL *et al*, 1991). Sua caracterização bioquímica revelou além de subunidades ativadoras de transcrição do complexo SWI/SNF, e subunidades repressoras do complexo NuRD (O'NEILL *et al*, 1999; O'NEILL *et al*, 2000). Estas características tornam o complexo PYR um potencial regulador da transcrição dos genes das globinas do tipo β ao longo do desenvolvimento (BANK, 2006).

Dados crescentes têm demonstrado uma participação importante de modificações de cromatina associadas ao padrão de expressão dos genes das globinas (HARJU *et al*, 2002; BANK *et al*, 2006). Estas alterações incluem fosforilação, acetilação e metilação de histonas, que tornam a cromatina acessível em maior ou menor grau. Vários fatores modeladores de cromatina, como proteínas do complexo SWI/SNF (*switch/sucrose non-fermenting*) e CBP (*cAMP response element-binding protei*)/p300 foram descritos em associação com fatores de transcrição eritróide específicos (ZHANG *et al*. 2001). O remodelamento de cromatina no locus da β -globina pode determinar qual gene será alvo para ativação da transcrição.

CRTC2, também identificado em K562-0h, é um membro de uma família de coativadores de proteínas do tipo CBP (*Creb Binding Proteins*). Foi demonstrado

recentemente que a via dependente de AMP cíclico induz de maneira eficiente a expressão de γ -globina em eritroblastos adultos e desempenha um papel na expressão deste gene em β -talassemia, onde os níveis de cAMP estão elevados. CBP é fosforilada em eritroblastos nucleados e os níveis de fosforilação estão correlacionados com os níveis de RNAm de HbG de pacientes com β -talassemia. O estudo mostra que citocinas plasmáticas induziram a expressão de HbG e a fosforilação de CBP (BAILEY *et al.* 2007).

Durante a diferenciação eritróide em cultura líquida de duas fases, os níveis de cAMP declinam, o que também acontece com a expressão de γ -globina. Por sua vez, neste sistema, HU aumenta os níveis de cAMP (COKIC *et al.* 2008). Similarmente, em células CD34 humanas cultivadas, retiradas de sangue periférico, a produção de cAMP parece ser importante para indução de HbF por HU (KEEFER *et al.* 2006). Nestas células, a inibição da adenilato ciclase reduz significativamente a indução da expressão gênica de γ -globina por HU (KEEFER *et al.* 2006).

Embora o padrão de expressão de CRTC2 em reticulócitos tenha sido diferente do encontrado em K562 em nossos estudos, o que deve ser decorrente da natureza distinta destas célula, a expressão diferencial encontrada entre os grupos de pacientes foi estatisticamente significativa, com um aumento da expressão no grupo tratado com HU. O aumento da proteína codificada por este gene em células de pacientes tratados com HU poderia contribuir para o aumento da expressão de γ -globina mediada por proteínas do tipo CBP, como sugerem os dados da literatura anteriormente mencionados.

Além disto, em contraste com os outros achados, foi demonstrado que, em K562, a via do cAMP desempenha um papel negativo na expressão de γ -globina (INOUE *et al.* 2004). Neste aspecto, a diminuição de CRTC2 observada em K562 também poderia contribuir para o aumento de HbF nesta linhagem celular. Os resultados encontrados com os estudos de expressão gênica realizados aqui poderiam, assim, ajudar a explicar os diferentes achados na literatura científica sobre a relação entre cAMP e os padrões diferentes da expressão de HbG encontrados em células eritróides de sujeitos normais ou pacientes talassêmicos e K562.

Por outro lado, outro estudo mostra que CBP1 tem aumento de fosforilação em K562, mediada por butirato e trichostatina (dois inibidores de deacetilases de histona), que induzem a expressão de HBG via p38 MAPK. Ocorre ainda um aumento da interação entre esta proteína e o promotor de γ -globina, após o tratamento com estas drogas, como demonstram estudos *in vitro* (SANGERMAN *et al.* 2006). Além disto, CBP fortemente estimula a atividade transcricional de FKL2 (Fetal Krüppel-like factor-2), aumentando a ligação deste fator de transcrição à região CACCC no promotor de γ -globina em K562 (SONG *et al.* 2002). Isto demonstra que ainda existem muitas lacunas na compreensão dos mecanismos de regulação da expressão de globinas, na diferenciação eritróide ou na sua indução por compostos químicos.

ZHX1 é um outro fator de transcrição repressor pertencente à família de proteínas *zinc fingers* e *homeobox* (YAMADA *et al.* 2002). Embora ZHX1 tenha apresentado uma diferença de expressão muito baixa nos experimentos de K562, eles confirmam o padrão de diminuição da expressão deste gene após indução com HU. Esta diferença não foi confirmada estatisticamente nos pacientes analisados. Curiosamente, um outro membro desta família, ZHX2, foi identificado em uma biblioteca subtrativa de reticulócitos, com expressão diminuída confirmada por qRT-PCR em células de sujeitos com PHHF-2 e $\delta\beta$ -talassemia Siciliana, com um padrão de expressão inversamente correlacionado com os níveis de γ -globina (De ANDRADE *et al.* 2006).

ZHX2 também foi categorizado como um repressor de transcrição (KAWATA *et al.* 2003) e está localizado em uma região genômica (8q24.13) onde fora reconhecido um QTL (*Quantitative Trait Loci*) associado a PHHF heterocelular, não ligada ao cromossomo 11 (GARNER *et al.* 2002; GARNER *et al.* 2004). Além disto, uma alteração de *zhx2*, seu homólogo em camundongo, que normalmente tem aumento de expressão após o nascimento, é responsável pelo quadro de Persistência Hereditária de Alfa-fetoproteína e H19 (PERINCHERI *et al.*, 2005), proteínas expressas em fígado fetal, interessante, sítio da eritropoese neste estágio de desenvolvimento. Uma diminuição dos níveis de ZHX1, caso esteja associado com a regulação negativa de γ -globina, poderia restaurar a expressão de HbF em células adultas.

SLC25A37 (solute carrier family 25, member 37) foi o transcrito mais frequente encontrado nas bibliotecas de reticulócitos sem HU (Ret-SSH), com 105 clones. Outros membros da família de carreadores de soluto mitochondrial foram identificados em trabalhos prévios como transcritos abundantes expressos em reticulócitos (BONAFOUX *et al.* 2004; De ANDRADE *et al.* 2006). É possível especular que a abundância destes transcritos detectada em estudos com reticulócitos em diferentes condições pode indicar a presença de subprodutos das técnicas empregadas (SSH e SAGE) e não propriamente decorrente das patologias ou condições de estudo.

Genes diferencialmente expressos identificados com expressão induzida por HU (RetHU-SSH) incluem SUDS3 (suppressor of defective silencing 3 homolog), uma subunidade do complexo co-repressor dependente de histona deacetilase SIN3A (*histone deacetylase-dependent SIN3A co repressor complex*), com propriedades de modificação de cromatina (FLEISCHER *et al.* 2003) e FZD5 (frizzled homolog 5), um membro da família de genes 'frizzled' que codificam proteínas com 7 domínios transmembrana, que são receptoras para proteínas Wnt de sinalização celular (HE *et al.* 1997). Mudanças na estrutura da cromatina e vias de sinalização celular são processos que podem sabidamente afetar a regulação da expressão de globinas (BANK 2006; SANGERMAN *et al.* 2006; PACE & ZEIN 2006)

HBA foi identificada na biblioteca Ret-SSH, indicando uma possível diminuição da expressão deste gene de globina induzida por HU. Os experimentos com qRT-PCR confirmaram este padrão, embora em níveis estatísticos não significativos. Curiosamente, reportamos previamente uma diminuição dos níveis do RNAm de HBA em reticulócitos de indivíduos com Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF), condição benigna que apresenta altos níveis de HbF no estágio adulto. Isto poderia indicar uma possível repressão transcricional ou pós-transcricional de α -globina em células eritróides contendo elevados níveis de transcritos de γ -globina (De ANDRADE *et al.* 2006).

ZDHHC2 apresentou um aumento significativo de expressão em reticulócitos de pacientes tratados com HU. A proteína codificada por este gene possui um domínio zf-DHHC (*DHHC zinc finger domain*), encontrado em muitas proteínas, de leveduras à

humanas. Muitas destas proteínas são preditas a partir de sequências genômicas e portanto não são totalmente caracterizadas (LI *et al.* 2002).

A função deste domínio não é conhecida, mas acredita-se que esteja envolvida com interações proteína-DNA ou proteína-proteína, além de atividade palmitoiltransferase. A adição lipídica de ácido palmítico (palmitoilação) ocorre em uma grande variedade de proteínas que são direcionadas e incorporadas à membrana plasmática como proteínas periféricas ou integrais. A palmitoilação também está envolvida com tráfego intracelular de proteínas e fusão de vesículas (MITCHELL *et al.* 2006; DAS *et al.* 1997). Muitas proteínas de sinalização celular sofrem palmitoilação, aparentemente regulada pelo status de ativação destas proteínas (FLAUMENHAFT & SIM 2005). O aumento nos níveis de palmitoilação em células eritróides tratadas com HU poderia estar relacionado, desta forma, com o aumento da atividade de vias de sinalização celular, ou ainda com a regeneração da membrana plasmática destas células, que normalmente encontra-se danificada na anemia falciforme.

PHC3, também identificado em Ret-SSH, é um membro da família de genes *Polycomb group* (PcG), requeridos para a manutenção de genes homeóticos em um estado silenciado durante o desenvolvimento em drosófila e mamíferos (LEVINE *et al.* 2002). Membros desta família proteica tem sido associados com a regulação da expressão de globinas através de modificações de cromatina (VAN DER VLAG *et al.* 2000; McMORROW *et al.* 2000). Embora a expressão diferencial de PHC3, avaliada por qRT-PCR, não tenha sido estatisticamente significativa em nossos experimentos, ela demonstrou uma tendência para uma diminuição no grupo tratado com HU. Se PHC3 participar do silenciamento de γ -globina durante o estágio adulto de desenvolvimento, uma diminuição da expressão deste gene, induzida por HU, poderia restaurar a expressão de γ -globina. Desta forma, se confirmada esta hipótese, PHC3 poderia também ser um alvo potencial para novas terapias em anemia falciforme ou outras desordens da expressão de globinas, como as talassemias.

Outros genes relacionados com o controle da proliferação, apoptose, diferenciação e outros processos que poderiam estar envolvidos com as vias controladas por HU e com a

fisiopatologia de AF também foram identificados neste estudo, e estão listados nas Tabelas 3, 4, 5 e 6.

Este é o primeiro estudo demonstrando uma associação entre o tratamento com HU e a expressão dos genes descritos em células eritróides. O mecanismo pelo qual HU modifica a expressão destes genes nestas células foge ao escopo deste trabalho. Entretanto, estas alterações podem ter um papel importante no aumento típico de HbF nas células de pacientes tratados com HU e na diferenciação eritróide. Estudos funcionais posteriores com os genes mencionados podem ajudar na elucidação de seu papel potencial na regulação de globinas e na diferenciação eritróide mediada por HU ou outros agentes quimioterápicos, bem como contribuir para a compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos em patologias das células eritróides, como AF e talassemias.

6- Conclusões

Neste trabalho, foram identificados genes com expressão diferencial induzida por HU em reticulócitos e células da linhagem K562, pela obtenção de quatro bibliotecas de cDNA subtrativas supressivas;

Os genes identificados participam de diversas funções celulares como o controle da proliferação, apoptose, diferenciação, sinalização celular, transcrição gênica e outros processos que poderiam estar envolvidos com as vias controladas por HU e com a fisiopatologia de AF;

Os estudos com qRT-PCR em K562 e reticulócitos de pacientes com AF tratados e não tratados com HU confirmam o padrão de expressão aumentado ou diminuído dos genes selecionados;

Os genes analisados que apresentaram diferenças de expressão estatisticamente significativas entre os grupos de pacientes com AF tratados e não tratados com HU foram HBG, STAT5B, NACA, CRTCL2 e ZDHHC2, todos com expressão aumentada no grupo em tratamento;

Como discutido neste trabalho, estes genes podem estar correlacionados com o aumento típico de HbF e a diferenciação eritróide induzidos por HU;

Este é o primeiro estudo demonstrando uma associação entre o tratamento com HU e a expressão dos genes descritos em células eritróides.

7- Referências Bibliográficas

- AMBROSIO, R.; FIMIANI, G.; MONFREGOLA, J.; SANZARI, E.; DE FELICE, N.;
SALERNO, M. C. The structure of human STAT5A and B genes reveals two regions
of nearly identical sequence and an alternative tissue specific STAT5B promoter.
Gene, 285: 311-8, 2002.
- ANDREWS N. C., ERDJUMENT-BROMAGE H., DAVIDSON M. B., TEMPST P.,
ORKIN, S. H. Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific
basic-leucine zipper protein. **Nature**, 362 (6422): 722-8, 1993.
- ASANO, H.; LI, X.S.; STAMATOYANNOPOULOS, G. FKLf-2: a novel Kruppel-like
transcriptional factor that activates globin and other erythroid lineage genes. **Blood**,
95 (11): 3578-84, 2000.
- BAGHDOYAN, S.; DUBREUIL, P.; EBERLE, F.; GOMEZ, S. Capture of cytokine-
responsive genes (NACA and RBM3) using a gene trap approach. **Blood**, 95: 3750-
7, 2000.
- BAILEY, L.; KUROYANAGI, Y.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; CONRAN, N.; COSTA,
F.F.; AUSENDA, S.; CAPPELLINI, M.D. & IKUTA, T. Expression of the gamma-
globin gene is sustained by the cAMP-dependent pathway in beta-thalassaemia. **Br.
J. Haematol.**, 138: 382-95, 2007.
- BALLAS, S. Sick Cell Anemia: progress in pathogenesis and treatment. **Drugs**, 62: 1143-
72, 2002.
- BANK, A. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities, **Blood**,
2006.
- BARON, M. H. Transcriptional control of globin gene switching during vertebrate
development. **Biochim. Biophys Acta**, 1351: 51-72, 1997.
- BETKE, K.; MARTI, H. R.; SCHLICHT, I. Estimation of small percentage of fetal
haemoglobin. **Nature**, 184: 1877-8, 1959.
- BEUZARD Y. A potential regulatory region for the expression of fetal hemoglobin in
sickle cell disease. **Blood**, 84: 331-8, 1994.
- BIANCHI, N.; ONGARO, F.; CHIARABELLI, C.; GUALANDI, L.; MISCHIATI, C.;
BERGAMINI, P. & GAMBARI, R. Induction of erythroid differentiation of human
K562 cells by cisplatin analogs. **Biochemical Pharmacology**, (107) 2: 535-43, 2006.

- BIANCHI, N.; OSTI, F.; RUTIGLIANO, C.; GINANNICORRADINI, F.; BORSETTI, E.; TOMASSETTI, M.; MISCHIATI, C.; FERIOTTO, G. & GAMBARI, R. The DNA-binding drugs mithramycin and chromomycin are powerful inducers of erythroid differentiation of human K562 cells. **Br. J. Haematol.**, 104: 258-263, 1999.
- BLAU, C. A.; STAMATOYANNOPOULOS, G. Hemoglobin switching and its clinical implications. **Curr. Opin. Hematol.**, 1: 136-42, 1994.
- BONAFOUX, B.; LEJEUNE, M.; PIQUEMAL, D.; QUÉRÉ, R.; BAUDET, A.; ASSAF, L. Analysis of remnant reticulocyte mRNA reveals new genes and antisense transcripts expressed in the human erythroid lineage. **Haematologica**, 89: 1434-8, 2004.
- BUNN, H. & FORGET, B. G. Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects. **Philadelphia, W. B. Saunders Company**, 1ª edição, 1986.
- BUNN, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **N. Engl. J. Med.**, 337: 762-9, 1997.
- CANALLI, A. A.; FRANCO-PENTEADO, C.; TRAINA, F.; SAAD, S. T. O.; COSTA, F. F.; CONRAN, N. Role for cAMP-protein kinase A signalling in augmented Neutrophil adhesion and chemotaxis in sickle cell disease. **Europ. J. Haematology**, 79: 330-37, 2007.
- CHARACHE, S.; TERRIN, M.; MOORE, R.; DOVER, G.; BARTON, F.; ECKERT, S. Effect of Hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. **N. Engl. J. Med.**; 332: 1317-22, 1995.
- CHARACHE, S. Mechanism of action of hydroxyurea in the management of sickle cell anemia in adults. **Semin. Hematol.**, 34: 15-21, 1997.
- CHIARABELLI, C.; BIANCHI, N.; BORGATTI, M.; PRUS, E.; FIBACH, E. & GAMBARI, R. Induction of gamma-globin gene expression by tallimustine analogs in human erythroid cells. **Haematologica**, 88: 826-27, 2003.
- CHIDA, D.; MIURA, O.; YOSHIMURA, A.; MIYAJIMA, A. Role of cytokine signaling molecules in erythroid differentiation of mouse fetal liver hematopoietic cells:

- functional analysis of signaling molecules by retrovirus-mediated expression. **Blood**, 93: 1567-78, 1999.
- COKIC, V. P.; ANDRIC, S. A.; STOJILKOVIC, S. S.; NOGUCHI, C. T.; SCHECHTER, A. N. Hydroxyurea nitrosylates and activates soluble guanylyl cyclase in human erythroid cells. **Blood**, 111: 1117-23, 2008.
- COKIC, V.; SMITH, R.; BELESLIN-COKIC, B.; NJOROGUE, J.; MILLER, J.; GLADWIN M. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **J. Clin. Invest.**, 111: 231-9, 2003.
- CONRAN, N.; ORESCO-SANTOS, C.; ACOSTA H. C.; FATTORI A.; SAAD, S. T.; COSTA, F. F. Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients. **Br. J. Haematol.**, 124: 547-54, 2004.
- COSTA, F. C.; DA CUNHA, A. F; FATTORI, A.; DE SOUSA PERES, T.; COSTA, G. G.; MACHADO, T. F.; DE ALBUQUERQUE, D. M.; GAMBERO, S.; LANARO, C.; SAAD, S. T.; COSTA, F. F. Gene expression profiles of erythroid precursors characterize several mechanisms of the action of hydroxycarbamide in sickle cell anaemia. **Br. J. Haematol.**, 136: 333-42, 2007.
- CRABLE, S.; HAMMOND, S.; PAPES, R.; RETTIG, R.; ZHOU, G.; GALLAGHER, P. Multiple isoforms of the KC1 cotransporter are expressed in sickle and normal erythroid cells. **Exp. Hematol.**, 33: 624-31, 2005.
- DAS, A. K.; DASGUPTA, B.; BHATTACHARYA, R. & BASU, J. Purification and Biochemical Characterization of a Protein-palmitoyl Acyltransferase from Human Erythrocytes. **J. Biol. Chem.**, 272: 11021-25, 1997.
- DACIE J. & LEWIS S. Practical Haematology. **Churchill Livingstone, Edinburgh**, 1984.
- DE ANDRADE, T. G.; PETERSON, K.; CUNHA, A.; MOREIRA, L. S.; FATTORI, A; SAAD, S.; COSTA, F. F. Identification of novel candidate genes for globin regulation in erythroid cells containing large deletions of the human beta-globin gene cluster. **Blood Cells Mol. Dis.**, 37: 82-90, 2006.
- DE FRANCESCHI, L.; CORROCHE, R. Established and experimental treatments for sickle cell disease. **Haematologica**, 89: 348-56, 2004.
- DIATCHENKO, L.; LAU, Y.; CAMPBELL, A.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B. Suppression subtractive hybridization: a method for generating

- differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 93: 6025-30, 1996.
- FIBACH, E.; BURKE, L. P.; SCHECHTER, N. A.; NOGUCHI, C. T.; RODGERS, G. P. Hydroxyurea increases fetal hemoglobin in cultured erythroid cells derived from normal individuals and patients with sickle cell anemia or beta-thalassemia. **Blood**, 81: 1630-5, 1993.
- FIBACH, E.; BIANCHI, N.; BORGATTI, M.; PRUS, E. & GAMBARI, R. Mithramycin induces fetal hemoglobin production in normal and thalassemic human erythroid precursor cells. **Blood**, 102: 1276-81, 2003.
- FLAUMENHAFT, R. & SIM, D. S. Protein palmitoylation in signal transduction of hematopoietic cells. **Hematology**, 10: 511-9, 2005.
- FLEISCHER, T.; YUN, U. & AYER, D. Identification and characterization of three new components of the mSin3A corepressor complex. **Mol. Cell Biol.**, 23: 3456-67, 2003.
- FORSBERG, E. C.; DOWNS, K. M. & BRESNICK, E. H. Direct interaction of NF-E2 with hypersensitive site 2 of the beta-globin locus control region in living cells. **Blood**, 1: 334-9, 2000.
- GAMBERO, S.; CANALLI, A. C.; TRAINA, F.; ALBUQUERQUE, D. M.; SAAD, S. T. O.; COSTA, F. F.; CONRAN, N. Therapy with hydroxyurea is associated with reduced adhesion molecule gene and protein expression in sickle cells with a concomitant reduction in adhesive properties. **Europ. J. Haematology**, 78: 144-51, 2006.
- GAMBARI, R.; DELSENNO, L.; BARBIERI, R.; VIOLA, L.; TRIPODI, M.; RASCHELLA, G. & FANTONI, A. Human leukemia K562 cells: induction of erythroid differentiation by 5-azacytidine. **Cell Differentiation**, 14: 87-97, 1984.
- GARÇON, L.; RIVAT, C.; JAMES, C.; LACOUT, C.; CAMARA-CLAYETTE, V.; UGO, V. Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. **Blood**, 108: 1551-4, 2006.
- GARNER, C.; SILVER, N.; BEST, S.; MENZEL, S.; MARTIN, C. SPECTOR, T. D.; THEIN, S. L. Quantitative trait locus on chromosome 8q influences the switch from fetal to adult hemoglobin. **Blood**, 104: 2184-6, 2004.

- GARNER, C.; TATU, T.; BEST, S.; CREARY, L.; THEIN, S. L. Evidence of genetic interaction between the beta-globin complex and chromosome 8q in the expression of fetal hemoglobin. **Am. J. Hum. Genet.**, 70: 793-9, 2002.
- GEE, B. E. & PLATT, O. S. Sick lereticulocytes adhere toVCAM-1. **Blood**, 85: 26874, 1995.
- GLADWIN, M. T.; SCHECHTER, A. N. Nitric oxide therapy in sickle cell disease. **Semin. Hematol.**, 38: 333-42, 2001.
- GONCALVES, M. S.; NECHTMAN, J. F.; FIGUEIREDO, M. S.; KERBAUY, J.; ARRUDA, V. R.; SONATTI, M. F.; SAAD, S. T. O. Sickle cell disease in a Brazilian population from Sao Paulo: a study of the beta s haplotypes. **Hum. Hered.**, 44: 322-7, 1994.
- GONG, Q. H.; MCDOWELL, J. C.; DEAN, A. Essential role of NF-E2 in remodeling of chromatin structure and transcriptional activation of the epsilon-globin gene in vivo by 5' hypersensitive site 2 of the beta-globin locus control region. **Mol. Cell. Biol.**, 11: 6055-64, 1996.
- GOOSSENS, M. & KAN, Y. DNA analysis of hemoglobin disorders. **Methods Enzymol.**, 76: 805, 1981.
- GRIMLEY, P.; DONG, F.; RUI, H. Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. **Cytokine Growth Factor Rev.**, 10: 131-57, 1999.
- HALSEY, C. & ROBERTS I. The role of hydroxyurea in sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, 120: 177-86, 2003.
- HARJU, S.; MCQUEEN, K. J.; PETERSON, K. R. Chromatin structure and control of beta-like globin gene switching. **Exp. Biol. Med.**, 9: 683-700, 2002.
- HARRIS, M.; CLARK, J.; IRELAND, A.; LOMAX, J.; ASHBURNER, M.; FOULGER, R. Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. **Nucleic Acids Res.**, 32: 258-61, 2004.
- HAYNES, J. J. R.; BALIGA, B. S.; OBIAKO, B.; OFORI-ACQUAH, S.; PACE, B. Zileuton induces hemoglobin F synthesis in erythroid progenitors: role of the L-arginine-nitric oxide signaling pathway. **Blood**, 103: 3945-50, 2004.

- HE, X.; SAINT-JEANNET, J.; WANG, Y.; NATHANS, J.; DAWID, I.; VARMUS, H. A member of the frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A. **Science**, 275: 1652-4, 1997.
- IHLE, J. The Stat family in cytokine signaling. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 13: 211-17, 2001.
- IKUTA, T.; AUSENDA, S. & CAPPELLINI, M. D. Mechanism for fetal globin gene expression: role of the soluble guanylate cyclase-cGMP-dependent protein kinase pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 98: 1847-52, 2001.
- INOUE, A.; KUROYANAGI, Y.; TERUI, K.; MOI, P.; IKUTA, T. Negative regulation of gamma-globin gene expression by cyclic AMP-dependent pathway in erythroid cells. **Exp. Hematol.**, 32: 244-53, 2004.
- JANE, S. M. Understanding fetal globin gene expression: a step towards effective Hb F reactivation in haemoglobinopathies. **Bri. J. Haematology**, 102: 415-22, 1998.
- KAUFMAN, R. E. Hydroxyurea: specific therapy for sickle cell anemia? **Blood**, 79: 2503-6, 1992.
- KAWATA, H.; YAMADA, K.; SHOU, Z.; MIZUTANI, T.; YAZAWA, T.; YOSHINO, M.; SEKIGUCHI, T.; KAJITANI, T.; MIYAMOTO, K. Zinc-fingers and homeoboxes (ZHX) 2, a novel member of the ZHX family, functions as a transcriptional repressor. **Biochem J.**, 373: 747-57, 2003.
- KEEFER, J. R.; SCHNEIDERREITH, T. A.; MAYS, A.; PURVIS, S. H.; DOVER, G. J.; SMITH, K. D. Role of cyclic nucleotides in fetal hemoglobin induction in cultured CD34+ cells. **Exp Hematol.**, 34: 1151-61, 2006.
- LABIE, D.; ELION, J. Molecular and cellular pathophysiology of sickle cell anemia **Pathol. Biol.**, 47: 7-12, 1999.
- LEE, C. H.; MURPHY, M. R.; LEE, J. S.; CHUNG, J. H. Targeting a SWI/SNF-related chromatin remodeling complex to the beta-globin promoter in erythroid cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 96: 12311-5, 1999.
- LEE, J. S.; LEE, C. H.; CHUNG, J. H. The beta-globin promoter is important for recruitment of erythroid Kruppel-like factor to the locus control region in erythroid cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 96: 10051-5, 1999.

- LEVINE, S.; WEISS, A.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; SHAO, Z.; TEMPST, P.; KINGSTON, R. The core of the polycomb repressive complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans. **Mol. Cell Biol.**, 22:6070-8, 2002.
- LEVY, D. & DARNELL, J. Stats: transcriptional control and biological impact. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, 3: 651-62, 2002.
- LI, J.; NOGUCHI, C. T.; MILLER, W.; HARDISON, R.; SCHECHTER, A. N. Multiple regulatory elements in the 5'-flanking sequence of the human epsilon-globin gene. **J. Biol. Chem.**, 273: 10202-9, 1998.
- LI, B.; CONG, F.; TAN, C. P.; WANG, S. X.; GOFF, S. P. Aph2, a Protein with a zf-DHHC Motif, Interacts with c-Abl and Has Pro-apoptotic Activity. **Biol. Chem.**, 277: 28870-6, 2002.
- LOPEZ, S.; STUHL, L.; FICHELSON, S.; DUBART-KUPPERSCHMITT, A.; ARNAUD, R.; GALINDO, J. NACA is a positive regulator of human erythroid-cell differentiation. **J. Cell Sci.**, 118: 1595-605, 2005.
- LOPEZ, B. L.; DAVIS-MOON, L.; BALLAS, S. K.; MA, X. L. Sequential nitric oxide measurements during the emergency department treatment of acute vasoocclusive sickle cell crisis. **Am. J. Hematol.**, 64: 15-9, 2000.
- LOPEZ, R. A.; SCHOETZ, S.; DEANGELIS, K.; O'NEILL, D.; BANK, A. Multiple hematopoietic defects and delayed globin switching in Ikaros null mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 99: 602-7, 2002.
- LOZZIO, C. B. & LOZZIO, B. B. Human chronic myelogenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosome. **Blood**, 45: 321-34, 1975.
- MCMORROW, T.; VAN DEN WIJNGAARD, A.; WOLLENSCHLAEGER, A.; VAN DE CORPUT, M.; MONKHORST, K.; TRIMBORN, T. Activation of the beta globin locus by transcription factors and chromatin modifiers. **EMBO J.** 19: 4986-96, 2000.
- MEIJERINK, J.; MANDIGERS, C.; VAN DE LOCHT, L.; TONNISSEN, E.; GOODSID, F.; RAEMAEEKERS, J. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. **J. Mol. Diagn.**, 3: 55-61, 2001.
- MERIKA, M. & ORKIN, S. H. DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. **Mol. Cell Biol.**, 13: 3999-4010, 1993.

- MILLER, I. J. & BIEKER, J. J. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins.
Mol. Cell Biol., 13: 2776-86, 1993.
- MISCHIATI, C.; SERENI, A.; LAMPRONTI, I.; BIANCHI, N.; BORGATTI, M.; PRUS, E.; FIBACH, E.; GAMBARI, R. Rapamycin-mediated induction of c-globin mRNA accumulation in human erythroid cells. **British Journal of Haematology**, 126: 612–21, 2004.
- MITCHELL, D. A.; VASUDEVAN, A.; LINDER, M. E.; DESCHENES, R. J. Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S-acyltransferases. **Journal of Lipid Research**, 47: 1118-27, 2006.
- MOREAU, A.; YOTOV, W. V.; GLORIEUX, F. H.; ST-ARNAUD, R. Bone-Specific Expression of the Alpha Chain of the Nascent Polypeptide-Associated Complex, a Coactivator Potentiating c-Jun-Mediated Transcription. **Mol. Cell Biol.**, 18:1312-21, 1998.
- NAGAI, T.; TARUMOTO, T.; MIYOSHI, T.; OHMINE, K.; MUROI, K.; KOMATSU, N. Oxidative stress is involved in hydroxyurea-induced erythroid differentiation. **Br. J. Haematol.**, 121: 657-61, 2003.
- NAGEL, R. L. & STEINBERG, MH. Role of epistatic (modifier) genes in the modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia. **Pediatr. Pathol. Mol. Med.**, 20: 123-36, 2001.
- NAHAVANDI, M.; TAVAKKOLI, F.; WYCHE, M. Q.; MILLIS, R. M. Nitric oxide and cyclic GMP levels in sickle cell patients receiving hydroxyurea. **Br. J. Haematol.**, 119: 855-7, 2002.
- O'NEILL, D. W.; SHOETZ, S. S.; LOPEZ, R. A.; CASTLE, M.; RABINOWITZ, L.; SHOR, E.; KRAWCHUK, D.; GOLL, M. G.; RENZ, M.; SEELIG, H.; HAN, S.; SEONG, R. H.; PARK, S. D.; AGALLOT, T.; MUNSHI, N.; THANOS, D.; ERDJUMENT, H.; TEMPST, P. & BANK, A. Na Ikaros-containing chromatin-remodeling complex in adult-type erythroid cells. **Mol. Cell. Biol.**, 20: 7572-82, 2000.

- O'NEILL, D.; BORNSCHLEGEL, K.; FLAMM, M.; CASTLE, M. A. DNA- binding factor in adult hematopoietic cells interacts with a pyrimidine-rich domain upstream from the human δ -globin gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 88: 8953-7, 1991.
- O'NEILL, D.; YANG, J.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; BORNSCHLEGEL, K.; TEMPST, P.; BANK, A. Tissue-specific and developmental stage-specific DNA binding by a mammalian SWI/SNF complex associated with human fetal-to-adult globin gene switching. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 96: 349-54, 1999.
- PACE, B. & ZEIN, S. Understanding mechanisms of gamma-globin gene regulation to develop strategies for pharmacological fetal hemoglobin induction. **Dev. Dyn.**, 235: 1727-37, 2006.
- PAPAYANNOPOULOU, T. & STAMATOYANNOPOULOS G. Cellular regulation of fetal hemoglobin production. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 344: 206-18, 1980.
- PARK, J. I.; CHOI, H. S.; JEONG, J. S.; HAN, J. Y.; KIN, I. H. Involvement of p38 kinase in hydroxyurea-induced differentiation of K562 cells. **Cell Growth Differ.**, 12: 481-6, 2001.
- PERINCHERI, S.; DINGLE, R. W. C.; PETERSON, M. L.; SPEAR, B. T. Hereditary persistence of alpha-fetoprotein and H19 expression in liver of BALB/cJ mice is due to a retrovirus insertion in the *Zhx2* gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 102: 396-401, 2005.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, 29: e45, 2001
- RAICH, N.; CLEGG, C. H.; GROFTI, J.; ROMEO, P. H.; STAMATOYANNOPOULOS, G. GATA1 and YY1 are developmental repressors of the human epsilon-globin gene. **EMBO J.**, 14: 801-9, 1995.
- REITER, C. D. & GLADWIN M. T. An emerging role for nitric oxide in sickle cell disease vascular homeostasis and therapy. **Curr. Opin. Hematol.**, 10: 99-107, 2003.
- RODGERS, G.; DOVER, G.; NOGUCHI, C.; SCHECHTER, A.; NIEN-HUIS, A. Hematologic responses of patients with sickle cell disease to treatment with hydroxyurea. **N. Engl. J. Med.**, 322: 1037-45, 1990.
- RODGERS G. Overview of pathophysiology and rationale for treatment of sickle cell anemia. **Semin. Hematol.**, 34: 2-7, 1997.

- RODRÍGUEZ, J. N.; MARTINO, M. L.; DIÉGUEZ, J. C.; PRADOS, D. rHuEpo for the treatment of anemia in myelofibrosis with myeloid metaplasia. Experience in 6 patients and meta-analytical approach. **Haematologica**, 83: 616-21, 1998.
- RUTHERFORD, T. R.; CLEGG, J. B.; WEATHERALL, D. J. K562 human leukaemic cells synthesise embryonic haemoglobin in response to haemin. **Nature**, 280: 164-5, 1979.
- SALEH, A.W.; DUTTS, A. J.; GERBERS, A.; DE VRIES, C.; HILLEN, H. F. Cytokines and soluble adhesion molecules in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy. **Acta Haematol.**, 100: 26-31, 1998.
- SANGERMAN, J.; LEE, M.; YAO, X.; OTENG, E.; HSIAO, C.; LI, W.; ZEIN, S.; OFORI-ACQUAH, S. F.; PACE, B. S. Mechanism for fetal hemoglobin induction by histone deacetylase inhibitors involves gamma-globin activation by CREB1 and ATF-2. **Blood**, 108: 3590-9, 2006.
- SCHAFER, A. I. Molecular basis of the diagnosis and treatment of polycythemia vera and essential thrombocythemia. **Blood**, 107: 4214-22, 2006.
- SCHECHTER, A. N. & RODGERS G. P. Sickle cell anemia therapy: progress since Pauling. **Science**, 287: 592-3, 2000.
- SCHURINGA, J.; CHUNG, K.; MORRONE, G.; MOORE M. Constitutive Activation of STAT5A Promotes Human Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Erythroid Differentiation. **J. Exp. Med.**, 200: 623-35, 2004.
- SMITH, R. D.; LI, J.; NOGUCHI, C. T.; SCHECHTER, A. N. Quantitative PCR analysis of HbF inducers in primary human adult erythroid cells. **Blood**, 95: 863-9, 2000.
- SOCOLOVSKY, M.; FALLON, A.; WANG, S.; BRUGNARA, C.; LODISH, H. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a/5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. **Cell**, 98: 181-9, 1999.
- SOCOLOVSKY, M.; NAM, H.; FLEMING, M.; HAASE, V.; BRUGNARA, C.; LODISH H. Ineffective erythropoiesis in Stat5a^(-/-)5b^(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. **Blood**, 98: 3261-73, 2001.
- SONG, CZ.; KELLER, K.; CHEN, Y.; MURATA, K.; STAMATOYANNOPOULOS, G. Transcription coactivator CBP has direct DNA binding activity and stimulates

- transcription factor DNA binding through small domains. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 296: 118-24, 2002.
- SONG, C. Z.; KELLER, K.; MURATA, K.; ASANO, H.; STAMATOYANNOPOULOS, G. Functional Interaction between Coactivators CBP/p300, PCAF, and Transcription Factor FKL2. **J. Biol. Chem.** 277: 7029-7036, 2002.
- STAMATOYANNOPOULOS, G.; MAJEAURS, P. W.; PERLMUTTER, R. M.; VARMUS, H.; NIENHUIS, A. W. Hemoglobin switching. **Molecular basis of blood diseases. 3ª edição Saunders, Philadelphia**, 107-56, 2001.
- STEINBERG, M. H.; BARTON, F.; CASTRO, O.; PEGELOW, C. H.; BALLAS, S. K.; KUTLAR, A. et al. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. **Jama**, 13: 1645-51, 2003.
- STEINBERG, M. H.; FORGET, B. G.; HIGGS, D. R.; NAGEL, R. L. Disorders of Hemoglobin. **Cambridge University Press**, 2001.
- STEINBERG, M. H.; LU, Z. H.; BARTON, F. B.; TERRIN, M. L. CHARACHE, S.; DOVER, G. J. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: determinants of response to hydroxyurea. Multicenter Study of Hydroxyurea. **Blood**, 89: 1078-88, 1997.
- STEINBERG, M. H. & RODGERS, G. P. Pharmacologic modulation of fetal hemoglobin. **Medicine**, 80: 328-44, 2001.
- SWERLICK, R. A.; ECKMAN, J. R.; KUMAR, A.; JEITLER, M.; WICK, T. M. Alpha 4 beta 1-integrin expression on sickle cell reticulocytes: vascular cell adhesion molecule-1-dependent binding to endothelium. **Blood**, 82 :891-899, 1993.
- TANG, D.; ZHU, J.; LIU, W.; CHIN, K.; SUN, J.; CHEN, L. The hydroxyurea-induced small GTP-binding protein SAR modulates gamma-globin gene expression in human erythroid cells. **Blood**, 106: 3256-63, 2005.
- JIANG, C.; DAÍ, C. H.; XIE, H. Y.; CHEN, Y. D.; WU, W.; JUN, Z. P.; QIAN, R. L. The effects of hydroxyurea on cell-cycle distribution and the expression of human beta-globin gene in K562 cells. **Shi Yan Sheng Wu Xue Bao**, 30: 109-14, 1997.
- JONECKIS, C. C.; ACKLEY, R. L.; ORRINGER, E. P.; WAYNER, E. A.; PARISE, L.V. Integrin alpha 4 beta 1 and glycoprotein IV (CD36) are expressed on circulating reticulocytes in sickle cell anemia. **Blood**, 82: 3548-55, 1993.

- TSANG, A. P.; FUJIWARA, Y.; HOM, D. B.; ORKIN, S. H. Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. **Genes Dev.**, 12: 1176-88, 1998.
- TSANG, A. P.; VISVADER, J. E.; TURNER, C. A.; FUJIWARA, Y.; YU, C.; WEISS, M. J.; CROSSLEY, M.; ORKIN, S. H. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. **Cell**, 90: 109-19, 1997.
- VAN DER VLAG, J.; DEN BLAAUWEN, J.; SEWALT, R.; VAN DRIEL, R.; OTTE, A. Transcriptional repression mediated by polycomb group proteins and other chromatin-associated repressors is selectively blocked by insulators. **J. Biol. Chem.** 275: 697-704, 2000.
- VANDESOMPELE, J.; De PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; ROY, N. V.; De PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.**, 3:RESEARCH0034, 2002.
- WANG, M.; TANG, D.; LIU, W.; CHIN, K.; ZHU, J.; FIBACH, E. Hydroxyurea exerts bimodal dose-dependent effects on erythropoiesis in human cultured erythroid cells via distinct pathways. **Br. J. Haematol.**, 119: 1098-105, 2002.
- WEATHERALL, D. J. Phenotype—genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. **Nature Reviews Genetics**, 2: 245-255, 2001.
- XU, J. & ZIMMER, D. Differential regulation of Agamma and Ggamma fetal hemoglobin mRNA levels by hydroxyurea and butyrate. **Exp. Hematol.**, 26: 265-72, 1998.
- YAMADA, K.; KAWATA, H.; MATSUURA, K.; SHOU, Z.; HIRANO, S.; MIZUTANI, T.; YAZAWA, T.; YOSHINO, M.; SEKIGUCHI, T.; KAJITANI, T.; MIYAMOTO, K. Functional analysis and the molecular dissection of zinc-fingers and homeoboxes 1 (ZHX1). **Biochem. Biophys. Res Commun.**, 297: 368-74, 2002.
- YANG, Y. M.; PACE, B.; KITCHENS, D.; BALLAS, S. K.; SHAH, A.; BALIGA, B. S. BFU-E colony growth in response to hydroxyurea: correlation between in vitro and in vivo fetal hemoglobin induction. **Am. J. Hematol.**, 56: 252-8, 1997.

- YOGEV, O.; ANZI, S.; INOUE, K.; SHAULIAN, E. Induction of Transcriptionally Active Jun Proteins Regulates Drug-induced Senescence. **J. Biol. Chem.** 281: 34475-83, 2006.
- ZAGO, M. A.; COSTA, F. F.; ISMAEL, S. J.; BOTTURA, C. Sickle-cell disease in a brazilian population. **Sangre**, 28: 191-8, 1983.
- ZHANG, S.; HE, Q.; ZHAO, H.; GUI, C.; JIANG, C.; QIAN, R. Function of GATA transcription factors in hydroxyurea induced HEL cells. **Cell Research**; 11: 301-10, 2001.
- ZHANG, W.; KADAM, S.; EMERSON, B. M.; BIEKER, J. J. Site-specific acetylation by p300 or CREB binding protein regulates erythroid Krüppel-like factor transcriptional activity via its interaction with the SWI-SNF complex. **Mol. Cell Biol.** 21: 2413-22, 2001.
- ZHU, Y. Y.; MACHLEDER, E. M.; CHENCHIK, A.; LI, R.; SIEBERT, P.D. Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. **Biotechniques**, 30: 892-7, 2001.

SCREENING AND ANALYSIS OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES IN HYDROXYUREA TREATED ERYTHROID CELLS.

Luciana Sarmiento Moreira^{1*}, Tiago Gomes de Andrade², Dulcinéia Martins de Albuquerque¹, Anderson Ferreira da Cunha¹, André Fattori¹, Sara Teresinha Olalla Saad¹, Fernando Ferreira Costa¹

1. Hemocenter-UNICAMP, Campinas, SP, Brazil
2. Universidade Federal de Alagoas/UFAL-Campus Arapiraca, Arapiraca, AL, Brazil.

*Corresponding author: Luciana Sarmiento Moreira, PhD. Address: Hemocentro (Unicamp). R. Carlos Chagas, 480. Cid. Universitária Zeferino Vaz. CEP: 13083-970. Campinas, SP, Brasil; Phone: +55-19-3521-8745; Fax +55-19-3289-1089; email: lsarmentomoreira@gmail.com.

Running title: Gene expression in HU treated erythroid cells.

Keywords: hydroxyurea, globin, STAT5, NACA, CRT2, SSH

Number of Figures: 1

Number of Tables: 3

Number of Supplementary Tables: 2

ABSTRACT

Hydroxyurea (HU) is the prototypic agent used for the treatment of patients with sickle cell anemia (SCA). HU increases the synthesis of fetal hemoglobin (HbF), which inhibits the polymerization of HbS, promotes proliferation of erythroid precursors, and an accelerated erythroid differentiation. The molecular mechanisms of HU-mediated induction of erythroid differentiation and γ -globin transcription, however, are not completely understood. This study was designed to identify differentially expressed genes participating in these molecular pathways by establishing two suppression subtractive hybridization (SSH) libraries from K562 erythroleukemia cell line without and under HU administration. Gene expression of some identified genes was subsequently evaluated by real-time PCR in K562 and circulating reticulocytes from SCA patients. NACA (nascent-polypeptide-associated complex alpha subunit), STAT5 (Signal transducer and activator of transcription-5) and CRTCL2 (CREB regulated transcription coactivator 2) were among the identified transcripts with differential expression in K562 and between two groups of SCA patients not on/on HU treatment. Differentially expressed genes associated to the control of proliferation, apoptosis, differentiation and cell signaling, among other processes were also identified in our profiles. This is the first description demonstrating an association between HU treatment and the expression of the genes identified in erythroid cells. As discussed herein, these genes may play an important role in the mechanism of action of HU in the increment of fetal hemoglobin.

Hydroxyurea (HU) or hydroxycarbamide is the prototypic agent used for the treatment of patients with sickle cell anemia (SCA) (Halsey and Roberts, 2003). The major effect associated to HU in the treatment of SCA is the increase of fetal hemoglobin (HbF) synthesis, by inhibiting the HbS polymerization (Rodgers, 1997; Rodgers et al, 1990; Carache et al, 1997). Multicenter studies showed that HU administration to SCA patients significantly increases HbF production and improves clinical symptoms by reducing the frequency of pain and vaso-occlusive crisis, acute chest syndrome, transfusion requirement and hospitalizations (Carache, 1997; Steinberg et al, 2003).

HU has been shown to induce the expression of the γ -globin genes, possibly by induction of guanylate cyclase protein kinase G pathways (Ikuta et al, 2001; Cokic et al, 2003), or by enhancement of transcription factors expression like early growth response 1 (EGR1), GATA-1 and other genes with important roles in erythropoiesis (Wang et al, 2002). HU also promotes proliferation of erythroid precursors and an accelerated erythroid differentiation, triggering an increase of the HbF production and induction of F-cell formation (Tang et al, 2005). However, the molecular mechanisms of HU-mediated induction of erythroid differentiation and γ -globin transcription are not completely understood.

The aim of this work was to screen for differentially expressed genes in K562 erythroleukemia cell line without and under HU administration, using suppression subtractive hybridization (SSH) libraries (Diatchenko et al, 1996). We identified NACA (nascent-polypeptide-associated complex alpha subunit), STAT5 (Signal transducer and activator of transcription-5) and CRTC2 (CREB regulated transcription coactivator 2), among others, as differentially expressed transcripts in HU treated K562 cells. These genes also presented significant differences in their expression between two groups of SCA patients not on/on HU treatment. As discussed herein, the genes identified in this work may play an important role in the mechanism of action of HU.

MATERIALS AND METHODS

Patients and hematological data:

Peripheral blood samples from sixteen patients with SCA were collected (eight of these patients were receiving HU therapy, 20-30mg/kg/d for at least 3 months). All patients presented a homozygous HbS genotype and were followed at the Hematology and Hemotherapy Centre (UNICAMP, Brazil). Blood samples were obtained only under informed consent signature approved by the Institutional Ethics Committee. Hematological data and red blood cell (RBC) levels were determined electronically (Coulter Counter S. Sr.). The quantitation of HbA and HbF levels was performed using the Variant II Hemoglobin Testing System (Bio-Rad, CA-USA). Hemoglobin electrophoresis was performed on cellulose acetate with Tris boric acid EDTA Buffer (TBE) at pH8.9 (Dacie and Lewis, 1984). Hematological parameters from subjects included in this study are described in Table 1.

Isolation of reticulocytes:

Reticulocytes were isolated as previously reported (Goosens and Kan, 1981; De Andrade et al, 2006). Briefly, peripheral blood cells were centrifuged to remove the plasma. Erythrocytes were then lysed with red blood cell lysis solution (0.144M NH_4Cl , 0.01M NH_4HCO_3) and the samples centrifuged. The remaining pellet containing leukocytes was discarded and the supernatant homogenized with a 1 volume dilution of a sucrose/KCl solution (1.5 M $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, 0.15 M KCl). After centrifugation, supernatant containing reticulocytes was treated with 800 μL of 10% acetic acid and centrifuged again to obtain the pellet for RNA extraction. All centrifugations were performed in a Sorvall Centrifuge (rotor SLA 600TC), 5000 $\times g$, at 4°C.

K562 cell culture:

Human K562 erythroleukaemia cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC; catalogue number CCL-243) and maintained in RPMI 1640 medium

(GibcoBRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (GibcoBRL), 100units/ml penicillin (GibcoBRL), and 100mg/ml streptomycin (Gibco BRL) in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Cells were seeded at 5 X 10⁵ cells per 75cm² flask (Nunc, Naperville, IL, USA) prior to the addition of 100 µM HU (Sigma, St Louis, MO, USA). Cells were collected for RNA extraction before (0h) and 72hs after HU from two independent cultures.

RNA extraction and reverse transcription:

Total RNA from K562 was extracted using Trizol® (Invitrogen, USA) reagent, according to the manufacturer's protocol for cell cultures. Pellet from patient's reticulocytes was resuspended in 1ml of Trizol® for each 5-10mL of initial blood and RNA resuspended in small amounts (5-15µL) of DEPC-treated water. RNA integrity was confirmed by electrophoresis in 1.2% denaturing agarose gel and its concentration was quantified using a GeneQuant UV spectrophotometer (Amersham Pharmacia, Bucks, UK). Five micrograms of each RNA sample was incubated with 1U DNaseI (Invitrogen, USA) and then reverse transcribed using Superscript reverse transcriptase (Invitrogen, USA), as suggested by manufacturer. cDNA samples were quantified using GeneQuant UV spectrophotometer (Amersham Pharmacia, UK).

Construction of suppression subtractive hybridization (SSH) libraries:

cDNA obtained from K562 cultures was amplified using the BD SMART PCR cDNA Synthesis kit (BD Biosciences). Synthesis of the second strand was performed with Platinum High Fidelity Polymerase (Invitrogen, USA) and 5' PCR Primer IIA (BD Biosciences, USA). Double-stranded cDNA was digested with Rsa I and used for the construction of SSH libraries (Diatchenko et al, 1996). The libraries were prepared in both forward and reverse directions using cDNA from HU untreated (K562 0hs) and treated (K562-HU72hs) cultures, following the manufacturer's recommendations for the PCR-Select cDNA Subtraction kit (Clontech, CA, USA). Basically, the digested Tester cDNA samples (K562-0hs or K562-HU72hs) were separated into two aliquots and ligated to adaptors 1 or 2R (Clontech, CA,USA) before denaturation and the first hybridization at 68°C with an excess of digested and denatured Driver cDNA sample (K562-HU72hs or

K562-0hs). In the second hybridization step, the two tester cDNA aliquots were mixed with a new aliquot of excess denatured Driver cDNA and the resulting cDNAs were subjected to PCR amplification with PCR primer 1 (5'-CTAATACGACT-CACTATAGGGC-3' Clontech, CA, USA), which is complementary to the adaptors. Nested PCR reactions were performed with Nested PCR Primer 1 (5'-TCGAGCGGCCGCCCCGGG-CAGGT-3' Clontech, CA, USA) and Nested PCR Primer 2R (5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3' Clontech, CA, USA). Efficiency tests were performed as suggested by Clontech, using primers for GAPDH transcripts and demonstrated subtractions in both forward and reverse libraries (data available upon request). Nested PCR products were ligated into the pGEMT Vector (Promega, USA) and transformed into *E. coli* DH5 α competent cells. Individual clones were transferred to 96 well plates containing selective LB medium and incubated overnight. Two microliters was subjected to PCR using M13 primers; the products of amplification were sequenced using Mega BACE (Amersham Biosciences, UK). The sequences were analyzed with BLASTn software (available at www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) against human genome and ESTs libraries. Alignments showing similarity with an expected value $\leq 1 \cdot 10^{-4}$ were considered significant. The GO software (<http://www.geneontology.org>) was used to produce a control vocabulary of the annotations (Harris et al, 2004).

Real-time PCR:

Analysis of the gene expression by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to evaluate the gene expression pattern in K562 cells and reticulocytes of a group of HU-untreated and treated patients. Synthetic oligonucleotide primers for all selected genes were designed and synthesized by Invitrogen (see Table 2 for sequences). Quantification of GAPDH expression was used as internal control to determine the amount and quality of cDNA. Reactions were assayed in a 25 μ L volume containing 5ng cDNA, 12.5 μ L SYBR Green Master Mix PCR (Applied Biosystems). The concentration of each primer was 300nmol/L for SMARCA4, ZHX1, ZNF160, STAT5A, HBB and GAPDH and 150nmol/L for CRT2, NACA, PHF2, STAT5B, MIER1, HBA, HBG and B2M primers. Assays were performed in a MicroAmp Optical 96-well reaction plate (Applied Biosystems) using the 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). To confirm accuracy and

reproducibility of real-time PCR, the intra-assay precision was calculated according to the equation $E=10^{[1-1/\text{slope}]}$ where the PCR efficiency was calculated. The transcripts assayed demonstrated high real-time PCR efficiency rates of over 99% for all primers utilized (Pearson correlation coefficient $r > 0.95$). The Gnorm program (Vandensonpele et al, 2002) was used to quantify gene expression. Threshold cycle (Ct) was defined as the point at which the fluorescence rises appreciably above the background fluorescence. The dissociation protocol was performed at the end of each run to check for non-specific amplification. Two replicas were run on the plate for each sample and each sample was run twice, independently. The expression of the studied genes was normalized using GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) and B2M (beta-2-microglobulin) as constitutive, internal control genes. For K562, analyses were made from the average of the normalized values from two independent cultures. In these experiments, K562-0h samples were used as references. Results are expressed as the fold change in gene expression or as normalized values.

RESULTS

Identification of differentially expressed genes by SSH

We utilized suppression subtractive hybridization (SSH) to generate two expression profiles for genes preferentially expressed in K562 cells without HU (K562-0h) and those found with higher frequency in K562 cells after 72hs of 100 μ M HU treatment (K562-HU72h). This method allows the subtraction or exclusion of commonly expressed genes and normalization of the libraries, favoring the detection of rare transcripts (Diatchenko et al, 1996). Efficiency tests were performed using primers for GAPDH mRNA and presented proper subtraction of commonly expressed transcripts (data not shown).

A total of 139 sequences were generated for the K562-0h subtractive library and 167 sequences for the K562-HU72h library with high homology scores in BLAST alignments. Of these, 103 represented unique sequences in K562-0h and 87 unique sequences in K562-HU72h. Fifty five genes were found to be differentially expressed in K562-0h, which may represent transcripts downregulated in HU treated K562 cells. K562-

HU72h presented 58 genes potentially upregulated after HU administration. The identified genes correspond to several distinct functions, but those participating in transcription processes and cell signaling pathways, potentially involved in globin gene regulation and erythroid differentiation, are highlighted in supplementary Table 4 for K562-0h and supplementary Table 5 for K562-HU72h, with number of clones detected and molecular functions according to Gene Ontology (Harris et al, 2004).

Quantitative real-time PCR of selected genes in K562 cells

Gene expression of globin genes (HBA, HBB and HBG), NACA, STAT5A and STAT5B, as potentially up-regulated genes, and MIER1 (mesoderm induction early response 1), PHF2 (PHD finger protein 2), SMARCA4 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4), ZNF160 (zinc finger protein 160), ZHX1 (zinc fingers and homeoboxes 1) and CRTC2 (CREB regulated transcription coactivator 2), as potentially down-regulated genes, was evaluated by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) in K562 cells. The EST (Expressed Sequence Tag) matching for STAT5 could not distinguish between the two closely related genes. In this case, RT-PCR primers were designed to amplify specifically STAT5A or STAT5B.

Normalized values and fold change obtained by qRT-PCR are presented in Table 3. The pattern of differential expression from all the genes analyzed by qRT-PCR was confirmed, although some of them presented slightly differences in mRNA expression levels (Table 3). STAT5A and STAT5B presented a different pattern of expression. While STAT5A is increased after HU, STAT5B is downregulated.

Quantitative real-time PCR of selected genes in reticulocytes

NACA, STAT5A, STAT5B, SMARCA4, ZHX1, CRTC2 and globin genes were also studied in circulating reticulocytes from SCA patients. Hematological data from these patients are presented in Table 1. As expected, expression of γ -globin gene was significantly increased in the group of patients receiving HU in accordance with the HbF levels presented in the hematological data of these patients (Figure 1; Table 1). NACA and STAT5B are also increased with statistically significant differences. Similarly, STAT5A level is higher in HU group, although this could not be confirmed statistically. In two

individuals in the HU-untreated group, STAT5A could not be detected by qRT-PCR amplification, which may reflect gene expression below detectable levels. CRTC2 was up-regulated in HU-treated group, an inversed pattern from that observed with K562 cells results. For the other studied genes, differences in their expression were not statistically significant in our experiments.

DISCUSSION

Herein, we identified differentially expressed genes isolated from HU induced and non-induced K562 cells. It was shown previously that HU increases globin mRNA and induces erythroid differentiation in the human erythroleukaemia K562 cell line, although the mechanism of HU-mediated induction has not been completely elucidated (Xu and Zimmer, 1998; Zhang et al, 2001). Some of the transcripts detected in our study had their mRNA expression evaluated also in reticulocytes from a group of SCA patients receiving HU as well as from a group without HU treatment. Some studies demonstrated that several transcripts other than globins are expressed in reticulocytes, which makes these cells suitable for in vivo gene expression analysis during erythroid differentiation (De Andrade et al, 2006; Bonafoux et al, 2004; Crable et al, 2005).

We identified NACA and STAT5 genes in the K562-HU72h SSH as up-regulated upon HU treatment. Real-Time PCR experiments using reticulocytes derived from SCA patients under HU treatment demonstrated that they presented the same expression pattern to that found in K562 cells (increased expression after HU), with the exception of STAT5B (down-regulated in K562), and were among the studied genes with the most significant differential expression between the two groups of patients. NACA, a transcriptional co-activator, was initially identified as being encoded by a cytokine-responsive gene in the human TF-1 erythroleukemic cell line 9 (Baghdoyan et al, 2000). Previous data suggests that it participates in protein complexes playing a role in proliferation, apoptosis or differentiation, depending on the cellular context and stimuli (Baghdoyan et al, 2000). NACA is a co-activator of c-JUN-mediated transcription (Moreau et al, 1998), which in turns is induced by HU in several cell types (Yogev et al, 2006). Another study demonstrated its involvement as a positive regulator of human erythroid-cell differentiation (Lopez et al, 2005).

In vitro studies showed that the expression of NACA is maintained during erythroid differentiation from human-cord-blood-derived CD34 hematopoietic cells, human TF-1 leukemic cells and MEL cells (mouse erythroleukemic cell line), but in contrast, it is suppressed during megakaryocytic or granulocytic differentiation (Lopez et al, 2005). Overexpression of NACA in normal hematopoietic progenitors results in an acceleration of

erythroid-cell differentiation and in TF-1 cells induces EPO-independent hemoglobinization. Moreover, RNA interference (RNAi) experiments in the TF-1 cell line demonstrate that the silencing of NACA leads to a decreased hemoglobin expression in these cells. The increased expression of NACA in HU induced K562 cells and reticulocytes from SCA patients under HU treatment, as shown here, may indicate a possible involvement of this gene in erythroid differentiation and in the up-regulation of globin genes in these conditions (Lopez et al, 2005).

STAT5 belongs to a family of latent cytoplasmic transcription factors that transduce signals from activated cell surface receptors to the nucleus. Signal transduction pathways associated to STAT activation involve JAK-mediated phosphorylation of tyrosine residues in the SH2 domain, enabling STAT dimerization, nuclear translocation, and binding to response elements in promoters of target genes (Levy and Darnell, 2002; Ihle, 2001). In this study we investigated the expression of both STAT5 (STAT5A and STAT5B) (Ambrosio et al, 2002) in K562 cell line and reticulocytes from SCA patients under and without HU treatment. STAT5A and STAT5B genes have very similar organizations and present a sequence identity of more than 93% at levels of cDNA (Ambrosio et al, 2002). A STAT5 transcript was detected in the K562-HU72hs library, which indicates an up-regulation of this gene after HU administration. These genes showed a different pattern of expression in K562 cells (STAT5A increased, STAT5B decreased), indicating a differential response to HU in K562 cultured cells. On the other hand, an increased expression of both STAT5A/STAT5B after HU was observed by using qRT-PCR in reticulocytes samples of the group of patients receiving the treatment. Although STAT5A differential expression was not statistically significant, it showed a tendency toward an augmentation in the HU treated group (Figure 2).

STAT5 is activated in response to various hematopoietic cytokines (Grimley et al, 1999) and has been implicated in erythropoiesis in response to erythropoietin (EPO) and early erythroblast survival by up-regulating BCL-XL (Socolovsky et al, 1999, 2001). Stat5a/5b knockout mice are characterized by fetal anemia and increased apoptosis of fetal liver erythroid progenitors, although adult steady-state hematopoiesis was reported to be normal (Socolovsky et al, 1999, 2001). Stat5, therefore, plays an important role in maintaining a high erythropoietic rate during fetal development and during stress responses

in adult mice. These mice are also less sensitive to EPO (Socolovsky et al, 1999). Consistent with these observations, STAT5 has an antiapoptotic effect in erythroid cell lines and an overexpression of a dominant negative STAT5 results in increased apoptosis and growth inhibition of cultured fetal liver erythroid progenitors (Socolovsky et al, 1999).

By contrast, overexpression of a constitutively active STAT5 in human hematopoietic stem and progenitor cells results in their enhanced self-renewal and favor erythroid over myeloid differentiation, providing a long-term proliferative advantage for erythroid progenitors (Chida et al, 1999). γ -globin was among the detected genes with the highest expression in these cells, as evaluated by microarray and RT-PCR analysis (Chida et al, 1999). In another study, constitutive activation of STAT5 induced an erythropoietin-independent terminal differentiation of erythroid progenitors and endogenous erythroid colonies formation (Schuringa et al, 2004). RNAi knock-down of STAT5 in human erythroid progenitors inhibited colony-forming unit-erythroid formation in the presence of EPO (Schuringa et al, 2004). In a previous study published by our group, STAT5 transcripts was found to be present at a higher proportion in a bone marrow cells library from a SCA patient after HU treatment, derived by SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) methodology (Garçon et al, 2006). Moreover, It is known that the STAT5 gene together with JAK2 is involved in several disorders of red cell production, in which HU has been used therapeutically (Schafer, 2006).

CRTC2, with a down-regulation in K562 and an overexpression in reticulocytes upon HU treatment, is a member of the family of co-activators of CBP (CREB-binding proteins), which are activated by cAMP (Ravnskjaer et al, 2007; Screaton et al, 2004). It was shown that cAMP dependent pathway efficiently induces the expression of gamma globin in adult erythroblasts and phosphorylation of CBP is related to HBG mRNA levels in beta-thalassemia patients. (Bailey et al, 2007).

Adenylate cyclase inhibition markedly reduces HU gamma-globin mRNA induction in human CD34(+) cultures. In these cells, cAMP production is required for full induction of HbF by HU (Keefer et al, 2006). On the other hand, in K562 cells, cAMP pathway exerts a negative effect on gamma globin expression, as demonstrated by Inoue et al, 2004. In addition, CBP strongly stimulates FKLF2 (Fetal Krüppel-like factor-2) transcriptional activity by enhancing its DNA binding to the gamma globin CACCC box

(Song et al, 2002). Our findings may reinforce the involvement of cAMP in HU mediated globin regulation *in vitro* and *in vivo* and present CRTC2 as a possible molecular component of this pathway.

A number of signaling pathways have been described in association to HU and the regulation of γ -globin transcription (Ikuta et al, 2001; Garçon et al, 2006; Costa et al, 2007, Park et al, 2001). In fact, we identified other transcripts functionally related to signal transduction in both SSH libraries (supplementary Tables 4 and 5). Gene expression of STAT5, NACA and CRTC2 might be affected in a downstream step of signaling cascades by alterations in the phosphorylation state or the expression of the signaling proteins. Genes related to the control of proliferation, apoptosis, differentiation and other processes that may be involved in HU controlled pathways and the patho-physiology of SCA were also identified in this study (supplementary tables 5 and 6).

This is the first description demonstrating an association between HU treatment and the expression of the identified genes in erythroid cells. Further functional studies may help elucidate their role in globin regulation and erythroid differentiation mediated by HU or other chemotherapeutic agents.

Aknowledgments: We thank Dr. Flavia Costa for revising the manuscript, Dr. Fabiola Traina for helping with STAT experiments, Roberto Zulli for statistical analysis and Marcelo Carazzolle and Genomic and Gene Expression Lab (Unicamp) for bioinformatics.

Figure 1. qRT-PCR expression of analyzed genes in circulating reticulocytes from SCA patients. For each group number of patients were 8, with the exception of STAT5A in the HU untreated group (n=6). P values were significant for HBG (p=0.014), STAT5B (p=0.01), NACA (p<0.001) and CRTC2 (p=0.019).

IDENTIFICATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES INDUCED BY HYDROXYUREA IN RETICULOCYTES FROM SICKLE CELL ANAEMIA PATIENTS

LS Moreira,* TG de Andrade,[†] DM Albuquerque,* AF Cunha,* A Fattori,* STO Saad* and FF Costa*

*Hemocentre, State University of Campinas, Campinas, São Paulo and [†]Federal University of Alagoas,
Campus Arapiraca, Arapiraca, Alagoas, Brazil

SUMMARY

1. The major effect associated with hydroxyurea (HU) treatment of sickle cell anaemia (SCA) patients is an increase in fetal haemoglobin (HbF) synthesis, which inhibits the polymerization of haemoglobin S.

2. Hydroxyurea improves clinical symptoms by reducing the frequency of pain and vaso-occlusive crises, acute chest syndrome, transfusion requirements and hospitalization.

3. The molecular mechanisms responsible for HU-mediated induction of fetal globin transcription are not completely understood. Therefore, the aim of the present study was to identify differentially expressed genes participating in these mechanisms.

4. We established two suppression subtractive hybridization (SSH) libraries from reticulocytes obtained from SCA patients either not on or on HU treatment. The gene expression of some of the genes identified was subsequently evaluated by real-time polymerase chain reaction (PCR).

5. Genes identified with altered expression included *SUDS3*, *FZD5* and *PHC3*, which may be associated with the regulation of globin expression.

6. This is the first demonstration of an association between HU treatment and the expression of genes identified in erythroid cells.

Key words: gene expression, globin, hydroxyurea, reticulocytes, sickle cell, suppression subtractive hybridization.

INTRODUCTION

Sickle cell anaemia (SCA) is an inherited disorder of haemoglobin caused by a single nucleotide substitution of thymidine for adenine (GAG → GTG) in the β -chain that results in the presence of the amino acid valine instead of glutamic acid and the formation of an

abnormal haemoglobin (Hb) called haemoglobin S (HbS). Haemoglobin S is responsible for changes in the properties of the Hb tetramer, which has a tendency to polymerize in the deoxygenated state.¹ The degree of HbS polymerization in the circulation determines how likely the individual is to experience a vaso-occlusive crisis or other adverse event.

High levels of fetal haemoglobin (HbF) during adult life ameliorate the clinical symptoms of SCA owing to the ability of HbF to inhibit the polymerization of HbS.² Consequently, the decades-long search for therapeutic modulators of HbF has continued to motivate basic and clinical investigators alike. As a result, several pharmacological agents have been shown to increase HbF production.³

A drug that has been used successfully for therapy in SCA is hydroxyurea (HU). Multicentre studies have shown that HU administration to SCA patients significantly increases HbF production and improves clinical symptoms by reducing the frequency of pain and vaso-occlusive crises, acute chest syndrome, transfusion requirements and hospitalization.^{4,5} This drug is thought to benefit SCA individuals through several mechanisms, including increasing HbF levels. However, the complete pathway by which HU acts remains unclear. Hydroxyurea induces the expression of γ -globin genes, possibly by the induction of guanylate cyclase–protein kinase G pathways^{6,7} or by the enhancement of the expression of transcription factors, such as early growth response 1 (*EGRI*), GATA binding protein-1 (globin transcription factor 1; *GATA-1*) and other genes with important roles in erythropoiesis.⁸ In a recent study, Costa *et al.* evaluated the global gene expression pattern of human bone marrow cells from an SCA patient before and after the administration of HU using serial analysis of gene expression (SAGE).⁹ These authors identified a set of genes involved in various pathways, such as transcription factors, signal transduction and channel or pore class transporter activity, that may represent new targets for SCA therapy.⁹

In the present study, we investigated the possible involvement of genes in the HU-mediated induction of fetal globin transcription using the suppression subtractive hybridization (SSH) method as an initial screen to identify differentially expressed transcripts in reticulocytes obtained from SCA patients who were or were not being treated with HU. We identified *SUDS3* (suppressor of defective silencing 3 homologue), *PHC3* (polyhomeotic homologue 3) and *FZD5* (frizzled homologue 5), among others, as differentially expressed genes that may potentially be associated with the regulation of globin expression. As discussed herein, these genes may play a role in the mechanism of action of HU.

Correspondence: Fernando Ferreira Costa, R Carlos Chagas 480, Cidade Universitária Zeferino Vaz–Unicamp, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Email: ferreira@unicamp.br

Received 27 August 2007; revision 5 November 2007; accepted 8 November 2007.

© 2008 The Authors

Journal compilation © 2008 Blackwell Publishing Asia Pty Ltd

Table 1 Clinical and haematological data of patients included in the present study

	SS (<i>n</i> = 8)	SSHU (<i>n</i> = 8)
No. men/women	5/3	5/3
Age (years)	34 (37, 20, 44)	32 (31, 25, 45)
Red blood cells ($\times 10^6$ μ L)	2.72 (2.39, 1.92, 4.33)	2.7 (2.64, 2.46, 3.11)
Haematocrit (%)	23.58 (22.1, 19, 32.5)	28.27 (27.5, 23.4, 35.1)
Haemoglobin (g/dL)	7.9 (7.6, 6.5, 10.3)	9.63 (9.75, 8, 11.8)
Mean corpuscular volume (frequency/L)	89 (88, 75, 103)	106 (102, 92, 123)
Mean corpuscular haemoglobin (μ L)	29.9 (30.5, 23.8, 35)	35.66 (36.9, 30.2, 40.6)
HbF (%)	4.35 (2.4, 0.7, 11.9)	12.58 (11.9, 3.7, 22)
Reticulocytes ($\times 10^9$ /L)	309 (300, 185, 437)	309 (270, 123, 719)

Where appropriate, data are presented as the mean, with the median, minimum and maximum values given in parentheses.

SS, steady state sickle cell anaemia (SCA) patients not taking hydroxyurea; SSHU, steady state SCA patients on hydroxyurea therapy (20–30 mg/kg per day for at least 3 months); HbF, fetal haemoglobin.

Table 2 Primers used in real-time polymerase chain reaction experiments

Gene	Primers	Concentration (nmol/L)
<i>HBA</i>	Forward: 5'-TGCTCCCCACAGACTCAGAGA-3' Reverse: 5'-CGGCCTTGACGTTGGTCTT-3'	150
<i>HBB</i>	Forward: 5'-AGGCACCGAGCACITTCITG-3' Reverse: 5'-ATCTGTCCACTCCTGATCCAGTT-3'	300
<i>HBG</i>	Forward: 5'-CATGGCAAGAAGGTGCTGACT-3' Reverse: 5'-GCAAAGGTGCCCTTGAGATC-3'	150
<i>ZDHHC2</i>	Forward: 5'-CTGATTCTCAGTCTTGACGG-3' Reverse: 5'-CATGGTTAATGCAGGATTGCT-3'	300
<i>PHC3</i>	Forward: 5'-GCGAGAGAACATATCCTTAGG-3' Reverse: 5'-AGTTGTCTATGACAGATGGCACA-3'	150
<i>B2M</i>	Forward: 5'-TGACTTTGTACAGCCCAAGATA-3' Reverse: 5'-GGCATCTTCAAACCTCCATGA-3'	150
<i>GAPDH</i>	Forward: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' Reverse: 5'-CCACTTGATTTTGGAGGGATCT-3'	300

METHODS

Patients and haematological data

Peripheral blood samples from 16 patients with SCA were collected (eight of these patients were receiving HU therapy, 20–30 mg/kg per day for at least 3 months). All patients presented a homozygous HbS genotype and were treated at the Hematology and Hemotherapy Centre (UNICAMP, Brazil). Blood samples were obtained after informed consent had been obtained. This project was approved by the Institutional Ethics Committee. Haematological parameters from subjects included in the present study were determined as described previously⁸ and are given in Table 1.

Isolation of reticulocytes, RNA extraction and reverse transcription

Reticulocytes were isolated as described previously.¹⁰ Pellets from patients' reticulocytes were resuspended in 1 mL Trizol for every 5–10 mL initial blood and RNA was resuspended in small amounts (5–15 μ L) of diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water. The integrity of the RNA was confirmed by electrophoresis on a 1.2% denaturing agarose gel and the RNA concentration was quantified using a GeneQuant UV spectrophotometer (Amersham Pharmacia, Bucks, UK). A 5 μ g sample for each RNA sample was incubated with 1 U DNaseI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and then reverse transcribed using Superscript reverse transcriptase (Invitrogen), as suggested by the manufacturer. The cDNA samples were quantified using a GeneQuant UV spectrophotometer (Amersham Pharmacia).

Construction of SSH libraries

The cDNA obtained from reticulocytes was amplified using the BD SMART PCR cDNA Synthesis kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Synthesis of the second strand was performed with Platinum High Fidelity Polymerase (Invitrogen) and 5' PCR Primer IIA (BD Biosciences). The libraries were prepared in both forward and reverse directions using a pool of RNA from three patients in each group, according to the manufacturer's recommendations for the PCR-Select cDNA Subtraction kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA).¹⁰ Nested polymerase chain reaction (PCR) products were ligated into the pGEMT Vector (Promega, Madison, WI, USA) and transformed into *Escherichia coli* DH5 α competent cells. Products of PCR amplification with M13 primers were sequenced using Mega BACE (Amersham Biosciences). The sequences were trimmed for the pGEMT vector and analysed for quality using *Phred/Phrap* software (UW TechTransfer, Seattle, WA, USA). The BLASTn software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) against the human genome and expressed sequence tag (EST) libraries was used to find similarities between the sequences and other genes described. Alignments showing similarity with an expected value $\leq 1 \times 10^{-4}$ were considered significant. The functional classification was performed according to the Gene Ontology Consortium (<http://www.geneontology.org>).

Real-time PCR

Synthetic oligonucleotide primers for selected genes are presented in Table 2 with sequences and concentrations. The PCR primers were designed using Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Table 3 Transcripts found in the RetHU-SSH library, corresponding to genes upregulated in sickle cell anaemia patients after hydroxyurea treatment

Gene name	Gene symbol	Molecular function (Gene Ontology)	No. clones
Solute carrier family 25, member 37	<i>SLC25A37</i>	Binding, iron ion binding, iron ion transporter activity	105
<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ13267 fis, clone OVARC1000964		Unknown	16
DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 1 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	<i>DCUN1D1</i>	Unknown	15
Chromosome 6 open reading frame 62	<i>C6orf62</i>	Unknown	5
Zinc finger, DHHC-type containing 2	<i>ZDHHC2</i>	Metal ion binding, palmitoyltransferase activity, transferase activity, zinc ion binding	4
Chromosome 22 open reading frame 13	<i>C22orf13</i>	Unknown	3
Family with sequence similarity 46, member C	<i>FAM46C</i>	Unknown	3
Poly(A) binding protein, cytoplasmic 1	<i>PABPC1</i>	RNA binding, nucleotide binding, poly (A) binding, protein binding, translation activator activity	3
Cell division cycle 34 homologue (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>CDC34</i>	Ligase activity, ubiquitin-protein ligase activity.	2
Family with sequence similarity 104, member A	<i>FAM104A</i>	Unknown	2
Transmembrane protein 111	<i>TMEM111</i>	Unknown	2
6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2	<i>PFKFB2</i>	6-phosphofructo-2-kinase activity, fructose-2,6-bisphosphate 2-phosphatase activity, hydrolase activity, kinase activity, nucleotide binding, transferase activity	1
Autocrine motility factor receptor	<i>AMFR</i>	Ligase activity, metal ion binding, protein binding, receptor activity, ubiquitin-protein ligase activity, zinc ion binding	1
fem-1 homologue a (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	<i>FEM1A</i>	Receptor activity.	1
Frizzled homologue 5 (<i>Drosophila</i>)	<i>FZD5</i>	G-protein-coupled receptor activity, non-G-protein-coupled seven-transmembrane receptor activity, protein binding, receptor activity	1
Hephaestin	<i>HEPH</i>	Copper ion binding, copper ion transporter activity, iron ion binding, metal ion binding, oxidoreductase activity	1
Hypothetical LOC388969		Unknown	1
Ribosomal protein S11	<i>RPS11</i>	rRNA binding, structural constituent of ribosome	1
Ribosomal protein S25	<i>RPS25</i>	RNA binding, structural constituent of ribosome	1
RIO kinase 3 (yeast)	<i>RIOK3</i>	ATP binding, kinase activity, nucleotide binding, protein serine/threonine kinase activity, transferase activity	1
Striatin, calmodulin binding protein 3	<i>STRN3</i>	Calmodulin binding	1
Suppressor of defective silencing 3 homologue (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>SUDS3</i>	Histone deacetylase binding, protein binding	1
Ubiquitin-conjugating enzyme E2B	<i>UBE2B</i>	Ligase activity, protein binding, ubiquitin-protein ligase activity	1

to specifically amplify mRNA from the gene of interest. Quantification of GAPDH expression was used as an internal control to determine the amount and quality of the cDNA. Reactions were assayed in a volume of 25 μ L containing 5 ng cDNA and 12.5 μ L SYBR Green Master Mix PCR (Applied Biosystems) and water to make up the 25 μ L. Assays were performed in a MicroAmp Optical 96-well reaction plate (Applied Biosystems) using the 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). To confirm the accuracy and reproducibility of real-time PCR, the intra-assay precision was calculated according to the equation $E = 10^{(1-1/\text{slope})}$. The transcripts assayed demonstrated high real-time PCR efficiency rates of over 99% for all primers used (Pearson correlation coefficient $r > 0.95$). The Gnorm program¹¹ was used to quantify gene expression. Two replicates were run on the plate for each sample and each sample was run twice, independently. The expression of the genes studied was normalized against *GAPDH* and *B2M* (β 2-microglobulin) as constitutive, internal control genes. Results are expressed as normalized values for the groups of patients. Data were compared between groups using the Mann-Whitney non-parametric test and statistical significance was defined as $P < 0.05$.

RESULTS

In order to identify genes expressed differentially during HU treatment, we constructed two libraries using the SSH method in

reticulocytes obtained from SCA patients either being treated or not with HU (RetHU-SSH and Ret-SSH, respectively). After trimming and selection by quality (Phred > 20), the sequences were submitted to BLAST alignments for identification. One hundred and thirty-two sequences for the Ret-SSH library and 184 sequences for the RetHU-SSH library were generated with high homology scores. We found 11 known genes to be differentially expressed in Ret-SSH, which may represent transcripts downregulated by HU. The RetHU-SSH library presented 19 known genes, two open reading frames (ORF), one hypothetical protein and one EST.

The most expressed gene in the RetHU-SSH library was the Solute carrier family 25, member 37 (*SLC25A37*). In the samples without HU treatment, the most observed gene was the Polyhomeotic homologue 3 (*Drosophila*) gene (*PHC3*). Tables 3 and 4 give the complete list of transcripts, represented in both libraries and corresponding to the annotated genes and hypothetical proteins identified with high homology scores in BLAST alignments. Tables 3 and 4 also give the number of clones detected and molecular function according to Gene Ontology.¹²

To validate the results found in the SSH libraries, we selected globin genes (*HBA*, *HBB* and *HBG*) and *ZDHHC2* (zinc finger, DHHC-type

Table 4 Transcripts found in the Ret-SSH library, corresponding to genes downregulated after HU treatment

Gene name	Gene symbol	Molecular function (Gene Ontology)	No. clones
Polyhomeotic homologue 3 (<i>Drosophila</i>)	<i>PHC3</i>	DNA binding, metal ion binding, zinc ion binding	9
Ribosomal protein S29	<i>RPS29</i>	RNA binding, metal ion binding, structural constituent of ribosome, zinc ion binding	5
Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group)	<i>SLC4A1</i>	Anion transporter activity, inorganic anion exchanger activity, protein binding	5
Haemoglobin, α	<i>HBA</i>	Heme binding, iron ion binding, metal ion binding, oxygen binding, oxygen transporter activity, protein binding	3
Basigin (Ok blood group)	<i>BSG</i>	Manose binding, signal transducer activity, sugar binding	2
<i>Homo sapiens</i> migration-inducing protein 6 (MIG6) mRNA, complete cds	<i>MIG6</i>	Unknown	2
Phosphatase, orphan 1	<i>PHOSPHO1</i>	Hydrolase activity, magnesium ion binding, phosphoric monoester hydrolase activity	2
Heparan sulphate proteoglycan 2	<i>HSPG2</i>	Cell adhesion, protein localization	1
Moesin	<i>MSN</i>	Cytoskeletal protein binding, receptor binding, structural constituent of cytoskeleton	1
Nucleobindin 1	<i>NUCB1</i>	DNA binding, calcium ion binding	1
Tax1 (human T-cell leukaemia virus type I) binding protein 1	<i>TAX1BP1</i>	Nucleic acid binding, protein binding	1

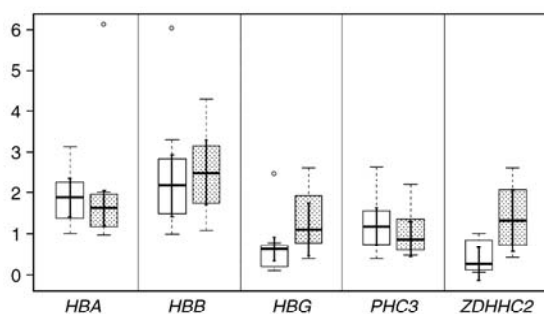


Fig. 1 Normalized values for quantitative real-time polymerase chain reaction expression of analysed genes in circulating reticulocytes from sickle cell anaemia patients either being treated (■) or not (□) with hydroxyurea. Data are the median $\pm$ SEM of eight patients in each group. *P* values were significant for *HBG* ($P = 0.014$) and *ZDHHC2* ($P = 0.005$), but not for *PHC3* ($P = 0.25$), *HBA* ($P = 0.29$) and *HBB* ($P = 0.32$).

containing 2) as upregulated genes and *PHC3* as a downregulated gene for quantitative real-time PCR experiments. As expected, the expression of the γ -globin gene was significantly increased in the group of patients receiving HU ($P = 0.014$), in accordance with the literature and the haematological data of these patients (Fig. 1; Table 1). The mRNA levels of α -globin were modestly decreased in the HU-treated group and β -globin was modestly increased, although the differences were not significant ($P = 0.29$ and 0.32 for *HBA* and *HBB*, respectively). The pattern of differential expression of *ZDHHC2* and *PHC3* was in accordance with the SSH libraries, although the differences in *PHC3* expression between groups could not be confirmed statistically ($P = 0.25$; Fig. 1). The expression of *ZDHHC2* was increased significantly in the HU-treated group ($P = 0.005$).

DISCUSSION

In the present study, we used the SSH method to generate two expression profiles for genes that are preferentially expressed in

reticulocytes from SCA patients without HU treatment (Ret-SSH) and those found with a higher frequency in reticulocytes from SCA patients on HU therapy (RetHU-SSH). This method allows the subtraction or exclusion of commonly expressed genes and normalization of the libraries, favouring the detection of rare transcripts.¹³

It has been shown previously that HU increases HbF synthesis and ameliorates clinical symptoms associated with SCA, although the mechanism of HU-mediated induction of fetal globin transcription has not been completely elucidated. In addition, some studies have demonstrated that several transcripts other than globins are expressed in reticulocytes, which makes these cells suitable for *in vivo* gene expression analysis of erythroid cells.^{10,14,15} The mRNA expression of some of the transcripts detected in the present study were evaluated by quantitative real-time PCR.

The most frequent transcript found in Ret-SSH libraries (105 clones) was *SLC25A37* (solute carrier family 25, member 37). Other members of the mitochondrial solute carrier family were identified in previous studies as abundant transcripts expressed in reticulocytes.^{10,14}

The differentially expressed genes identified with expression induced by HU (RetHU-SSH) include *SUDS3*, a subunit of the histone deacetylase-dependent SIN3A corepressor complex, with chromatin modification properties,¹⁶ and *FZD5*, a member of the 'frizzled' gene family encoding seven-transmembrane domain proteins that are receptors for Wnt signalling proteins.¹⁷ Changes in chromatin structure and signalling pathways are well-documented processes that may affect globin regulation.^{18–20}

The *HBA* gene was identified in the Ret-SSH library, indicating a probable downregulation of this globin gene. Quantitative real-time PCR experiments confirmed this pattern of expression, although the differences were not statistically significant. Interestingly, we have reported previously decreased *HBA* mRNA levels in hereditary persistence of fetal haemoglobin (HPFH) reticulocytes, which may indicate a possible transcriptional or post-transcriptional down-regulation of α -globin in erythroid cells containing elevated γ -globin transcripts.¹⁰

PHC3, also identified in the Ret-SSH library, is a member of the Polycomb group (PcG) genes, required to maintain homeotic genes in a silenced state during development in *Drosophila* and mammals.²¹ Members of this protein family have been associated with the regulation of globin expression through chromatin modifications.^{22,23} Although the differential expression *PHC3*, evaluated by quantitative real-time PCR, was not statistically significant in our experiments, there was a tendency towards downregulation in the HU-treated group. If *PHC3* participates in γ -globin silencing during the adult stage of development, a decreased expression of this gene, induced by HU, could restore γ -globin mRNA expression. Thus, *PHC3* may also be a potential target for novel therapies in sickle cell disease and other globin disorders.

To our knowledge, this is the first demonstration of an association between HU treatment and the expression of these genes in erythroid cells. The mechanism by which HU modifies gene expression in these cells cannot be determined as yet; however, these changes may have an important role in the typical augmentation of HbF in HU-treated patients. Further functional studies with the genes mentioned may help elucidate their role in globin regulation and erythroid differentiation mediated by HU or other chemotherapeutic agents, as well as aid in the understanding of genetic mechanisms involved in erythrocyte pathologies, such as sickle cell disease and thalassemias.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Roberto Zulli (Hemocenter, UNICAMP) for statistical analysis, Marcelo Carazzolle (Instituto de Biologia, UNICAMP) and Genomic and Gene Expression Laboratory (UNICAMP) for bioinformatics, Mateus Andrade (Universidade Federal de Santa Catarina) for helping with the figure and Dr Nicola Conran (Hemocenter, UNICAMP) for revising the manuscript. This research was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Hemocentre (UNICAMP).

REFERENCES

1. Ballas S. Sickle cell anemia: Progress in pathogenesis and treatment. *Drugs* 2002; **62**: 1143–72.
2. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N. Engl. J. Med.* 1997; **337**: 762–9.
3. Halsey C, Roberts I. The role of hydroxyurea in sickle cell disease. *Br. J. Haematol.* 2003; **120**: 177–86.
4. Charache S. Mechanism of action of hydroxyurea in the management of sickle cell anemia in adults. *Semin. Hematol.* 1997; **34**: 15–21.
5. Steinberg M, Barton F, Castro O *et al.* Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: Risks and benefits up to 9 years of treatment. *JAMA* 2003; **289**: 1645–51.
6. Ikuta T, Ausenda S, Cappellini MD. Mechanism for fetal globin gene expression: Role of the soluble guanylate cyclase-cGMP-dependent protein kinase pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2001; **98**: 1847–52.
7. Cokic V, Smith R, Beleslin-Cokic B *et al.* Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *J. Clin. Invest.* 2003; **111**: 231–9.
8. Wang M, Tang D, Liu W *et al.* Hydroxyurea exerts bi-modal dose-dependent effects on erythropoiesis in human cultured erythroid cells via distinct pathways. *Br. J. Haematol.* 2002; **119**: 1098–105.
9. Costa F, da Cunha A, Fattori A *et al.* Gene expression profiles of erythroid precursors characterise several mechanisms of the action of hydroxycarbamide in sickle cell anaemia. *Br. J. Haematol.* 2007; **136**: 333–42.
10. De Andrade T, Peterson K, Cunha A *et al.* Identification of novel candidate genes for globin regulation in erythroid cells containing large deletions of the human beta-globin gene cluster. *Blood Cells Mol. Dis.* 2006; **37**: 82–90.
11. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; **18**: 34.
12. Harris M, Clark J, Ireland A *et al.* Gene ontology consortium. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res.* 2004; **32**: 258–61.
13. Diatchenko L, Lau Y, Campbell A *et al.* Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1996; **93**: 6025–30.
14. Bonafoux B, Lejeune M, Piquemal D *et al.* Analysis of remnant reticulocyte mRNA reveals new genes and antisense transcripts expressed in the human erythroid lineage. *Haematologica* 2004; **89**: 1434–8.
15. Crable S, Hammond S, Papes R *et al.* Multiple isoforms of the KC1 cotransporter are expressed in sickle and normal erythroid cells. *Exp. Hematol.* 2005; **33**: 624–31.
16. Fleischer T, Yun U, Ayer D. Identification and characterization of three new components of the mSin3A corepressor complex. *Mol. Cell. Biol.* 2003; **23**: 3456–67.
17. He X, Saint-Jeannet J, Wang Y, Nathans J, Dawid I, Varmus H. A member of the frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A. *Science* 1997; **275**: 1652–4.
18. Bank A. Regulation of human fetal hemoglobin: New players, new complexities. *Blood* 2006; **107**: 435–43.
19. Sangerman J, Lee M, Yao X *et al.* Mechanism for fetal hemoglobin induction by histone deacetylase inhibitors involves gamma-globin activation by CREB1 and ATF-2. *Blood* 2006; **108**: 3590–9.
20. Pace B, Zein S. Understanding mechanisms of gamma-globin gene regulation to develop strategies for pharmacological fetal hemoglobin induction. *Dev. Dyn.* 2006; **235**: 1727–37.
21. Levine S, Weiss A, Erdjument-Bromage H, Shao Z, Tempst P, Kingston R. The core of the polycomb repressive complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans. *Mol. Cell. Biol.* 2002; **22**: 6070–8.
22. van der Vliet J, den Blaauwen J, Sewalt R, van Driel R, Otte A. Transcriptional repression mediated by polycomb group proteins and other chromatin-associated repressors is selectively blocked by insulators. *J. Biol. Chem.* 2000; **275**: 697–704.
23. McMorris T, van den Wijngaard A, Wollenschlaeger A *et al.* Activation of the beta globin locus by transcription factors and chromatin modifiers. *EMBO J.* 2000; **19**: 4986–96.