

ADRIANA DA SILVA SANTOS DUARTE

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL
DE *ANKHD1* NA HEMATOPOESE NORMAL E
NEOPLÁSICA**

CAMPINAS

2009

ADRIANA DA SILVA SANTOS DUARTE

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL
DE *ANKHD1* NA HEMATOPOESE NORMAL E
NEOPLÁSICA**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para Obtenção do título de Doutor
em Fisiopatologia Médica, Área de Concentração
Medicina Experimental.*

Orientadora: Sara Teresinha Olalla Saad

CAMPINAS

Unicamp

2009

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

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

Duarte, Adriana da Silva Santos
D85c Caracterização molecular e funcional de *ANKHD1* na hematopoese normal e neoplásica / Adriana da Silva Santos Duarte. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Sara Terezinha Olalla Saad

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

1. Proteínas citoesqueleto. 2. Hematopoese. 3. Neoplasias. 4. Expressão gênica. I. Saad, Sara Terezinha Olalla. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Molecular and functional characterization of ANKD1 in normal and neoplastic hematopoiesis

Keywords: • Cytoskeletal proteins
• Hematopoiesis
• Neoplasms
• Gene expression

Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica

Área de concentração: Medicina Experimental

Banca examinadora:

Prof. Dr. Sara Terezinha Olalla Saad

Profa. Dra. Maria de Lourdes Chauffaille

Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego

Profa. Dra. Irene Lorand-Metze

Profa. Dra. Ângela Cristina Malheiros Luzo

Data da defesa: 20-02-2009

Banca examinadora da tese de Doutorado

Adriana da Silva Santos Duarte

Orientador: Prof. Dr. Sara Teresinha Olalla Saad

Membros:

-
1. Prof. Dr. Maria de Lourdes Chauffaille
 2. Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego
 3. Prof. Dr. Irene Gyongyver Heidemarie Lorand Metze
 4. Prof. Dr. Angela Cristina Malheiros Luzo
 5. Prof. Dr. Sara Teresinha Olalla Saad
-

The image shows five handwritten signatures in blue ink, each corresponding to one of the members listed in the table. The signatures are written over the horizontal lines of the table. From top to bottom, they correspond to: Prof. Dr. Maria de Lourdes Chauffaille, Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego, Prof. Dr. Irene Gyongyver Heidemarie Lorand Metze, Prof. Dr. Angela Cristina Malheiros Luzo, and Prof. Dr. Sara Teresinha Olalla Saad.

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

Data: 20/02/2009

Dedicatória

Aos meus pais Marinilha e Francisco, por tudo já alcançado nesta vida;

Ao meu querido esposo Fernando, pelo incentivo, paciência e carinho;

À minha irmã e amiga Aislan, pelo encorajamento e positivismo constante;

Ao meu anjo Bubu, pelas muitas alegrias.

Agradecimentos

A Deus por esta vida repleta de sonhos que aos poucos vão se concretizando através de força, coragem e determinação.

À Professora Dra Sara Saad, orientadora deste estudo, pelos ensinamentos, paciência, confiança e a oportunidade de tornar esse sonho em realidade.

À Dra Fabíola pela ajuda imprescindível e pela amizade.

Aos pacientes e aos indivíduos controles que participaram deste estudo, sem os quais esta pesquisa não teria significado.

A todos os amigos do Hemocentro pela ajuda, paciência e apoio.

Aos meus amigos que nem a distância separa e aos amigos que estão próximos.

Às agências financiadoras FAPESP, CNPq e CAPES.

A todos vocês, meus mais sinceros agradecimentos!!!

***“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos
inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.***

(Fernando Pessoa)

A identificação e caracterização estrutural e funcional de genes diferencialmente expressos entre tecidos tumorais e normais constituem etapas fundamentais para permitir a compreensão do processo neoplásico e o desenvolvimento de novas estratégias anti-tumorais. *Ankyrin Repeat Single KH Domain containing 1 (ANKHD1)* foi inicialmente identificada em células de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP), no ano de 2003. Entretanto, seu padrão de expressão e sua função ainda não haviam sido caracterizados. A ANKHD1 é uma proteína ortóloga à *Multiple Ankyrin repeat and single KH domain (Mask)* da *Drosophila melanogaster*. Mask foi identificada através de um rastreamento genético utilizado para detectar novas proteínas associadas à proteína tirosina fosfatase *Corkscrew (CSW)*, homóloga à *Src Homology-2 domain-containing protein tyrosine Phosphatase-2 (SHP2)* humana. SHP2 é uma fosfatase de tirosina citoplasmática codificada pelo gene *PTPN11* e exerce papel fundamental no desenvolvimento da hematopoese normal e leucêmica. Os objetivos gerais do presente estudo foram caracterizar o padrão de expressão gênica de *ANKHD1* em células hematopoéticas normais e leucêmicas e verificar sua função nos processos celulares. Neste estudo foi demonstrado que o gene *ANKHD1* localiza-se no cromossomo 5, possui vários transcritos variantes possivelmente gerados por mecanismos de clivagem alternativa e codifica proteínas com domínios de repetições de anquirina. A região promotora desse gene possui vários elementos regulatórios importantes como sítios de ligação ao fator de transcrição *GATA-1* e sequências ricas em dinucleotídeos CG, as ilhas CpG. A expressão do gene *ANKHD1* e de algumas de suas variantes em tecidos normais e em linhagens de células neoplásicas foi detectada em intensidades variáveis. Em modelos de diferenciação e proliferação celular foi demonstrado o aumento da expressão desse gene ao longo desses processos. No entanto durante o processo de apoptose observou-se diminuição na expressão de *ANKHD1* e transcritos variantes. Em células de pacientes diagnosticados com Síndrome Mielodisplásica (SMD) foi constatada baixa expressão de *ANKHD1*. Durante a diferenciação eritróide de células CD34⁺ obtidas de medula óssea desses pacientes não foi observado o aumento da expressão do gene *ANKHD1* e do fator de transcrição *GATA-1* como era esperado. As células mononucleares

de pacientes com SMD tratadas com decitabina, um agente desmetilante, apresentaram aumento na expressão do gene *ANKHD1* em comparação às células não tratadas. O mesmo foi observado em células CD34⁺ tratadas durante a diferenciação eritróide. No entanto em células de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e com Mieloma Múltiplo (MM), caracterizadas pela proliferação e resistência aos mecanismos de apoptose, foi demonstrada a alta expressão do gene *ANKHD1* e de seus transcritos variantes. A associação da ANKHD1 com SHP2 foi identificada através de *Western Blotting*, em células da linhagem de MM denominada RPMI 8226. Foi observada a diminuição da expressão do gene *ANKHD1* nessas células quando induzidas ao processo de apoptose por dexametasona. Em conclusão o presente estudo identificou *ANKHD1* e alguns de seus transcritos variantes como um novo gene com perfis de expressão variados em células hematopoéticas normais e neoplásicas, demonstrou seu envolvimento em processos celulares básicos à manutenção da homeostase e a sua associação com SHP2 em Mieloma Múltiplo. ANKHD1 pode estar envolvida com o fenótipo anormal da célula neoplásica através de uma possível função na via da apoptose. Os achados aqui descritos sugerem que ANKHD1 pode ser uma molécula alvo para a terapia de neoplasias, e permitirão direcionar novos estudos com o objetivo de melhor elucidar as funções específicas de ANKHD1 em diferentes células hematopoéticas normais e neoplásicas.

Abstract

The identification and the structural and functional characterization of genes differentially expressed between tumors and normal tissues are fundamental steps towards the understanding of the neoplastic process and the development of new anti-cancer strategies. The Ankyrin Repeat Single KH Domain containing 1 (*ANKHDI*) was first described in humans in a prostate carcinoma cell line LNCaP, in 2003; however, the expression pattern and function of ANKHD1 have not yet been described. ANKHD1 is an orthologous protein of the *Drosophila melanogaster*, MASK (Multiple Ankyrin repeat and single KH domain), where it was first identified using a genetic screen designed to discover proteins that interact with the protein tyrosine phosphatase Corkscrew (CSW), which is a homolog to the SH2-containing protein tyrosine phosphatase (SHP2) in humans. SHP2 is a cytoplasmic protein-tyrosine phosphatase, coded by the *PTPN11* gene and plays an important role in the development of normal hematopoiesis and leukemogenesis. The aim of the present study was to characterize the gene expression pattern of *ANKHDI* in normal and leukemic hematopoietic cells and to determine their function in cellular process. This study has demonstrated that the *ANKHDI* gene is located on chromosome 5, this gene has several possible variant transcripts generated by splicing alternative mechanisms and encodes proteins with domains of ankyrin repeats. The promoter region of this gene has several regulatory elements such as the transcription factor *GATA-1* binding sites and rich sequences in dinucleotide CG, CpG islands. The expression of the *ANKHDI* gene and some of the gene's variants in normal tissues and neoplastic cell lines was detected in different intensities. The increase in the expression of this gene was demonstrated using cellular differentiation and proliferation models. However, during the process of apoptosis, a decrease in the expression of *ANKHDI* transcripts variants was observed. In the cells of patients with myelodysplastic syndrome (MDS), a low expression of *ANKHDI* was observed. During erythroid differentiation of CD34⁺ cells obtained from the bone marrow of these patients, no increase in the expression of *ANKHDI* gene and transcription factor *GATA-1* was observed, as expected. The mononuclear cells of MDS patients were treated with decitabine, a demethylation agent, and showed an increase in the *ANKHDI* gene

expression compared to untreated cells. The same was observed in CD34⁺ cells treated during erythroid differentiation. However in cells of acute myeloid leukemia (AML) or Multiple Myeloma (MM) patients, characterized by proliferation and resistance mechanisms of apoptosis, the high expression of gene transcripts *ANKHD1* and its variants was demonstrated. The association of SHP2 with ANKHD1 was identified by Western Blot in RPMI 8226 MM cell line. A decrease in the *ANKHD1* gene expression in these cells when the process of apoptosis was induced by dexamethasone was observed. In conclusion, this study identified *ANKHD1* and some of gene's transcripts variants as a new gene with a variable expression profile in normal and neoplastic hematopoietic cells. The study has also demonstrated the involvement of the *ANKHD1* in basic cellular processes, which maintain homeostasis and the association of ANKHD1 with SHP2 in multiple myeloma. ANKHD1 may be involved with the abnormal phenotype of tumor cells through a possible role in the apoptosis pathway. The findings herein described suggest that ANKHD1 could be a molecular target for neoplastic disease therapy and could guide further studies towards a better elucidation of the specific functions of ANKHD1 in normal and neoplastic hematopoietic cells.

Lista de Abreviaturas

4E-BP3	<i>4E-binding protein 3</i>
4E-BPs	<i>eIF4E-binding proteins</i>
ANKHD1	<i>Ankyrin Repeat Single KH Domain containing 1</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CSW	<i>Corkscrew</i>
DNA	<i>Desoxiribonucleic Acid</i>
DO	<i>Densidade Óptica</i>
EIF4EBP3	<i>Eukaryotic Initiation Factor 4E-Binding-Protein 3</i>
EST	<i>Expression Sequence Tags</i>
FAB	<i>French-American-British</i>
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
HA	<i>Hemaglutinin</i>
hMASK	<i>Human MASK</i>
hMASK-BP3^{ARF}	<i>Human MASK-4E-Binding Protein 3 Alternative Reading Frame</i>
KH	<i>K homology domain</i>
LLA	<i>Leucemia Linfóide Aguda</i>
LMA	<i>Leucemia Mielóide Aguda</i>
LMMC	<i>Leucemia Mielomonocítica Crônica</i>
LMC	<i>Leucemia Mielóide Crônica</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ORESTES	<i>Open Reading frame ESTs</i>
PE	<i>Phycocitrine</i>
PerCP	<i>Peridinin-chlorophyll-protein Complex</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNAi	<i>RNA interference</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i>
SHP2	<i>Src homology-2 domain-containing protein tyrosine phosphatase</i>
SP	<i>Sangue Periférico</i>
SMD	<i>Síndrome Mielodisplásica</i>
MM	<i>Mieloma Múltiplo</i>
EPO	<i>Eritropoietina</i>
PHA	<i>Fitohemaglutinina</i>
BSA	<i>Albumina Sérica Bovina</i>
ACD	<i>Adenosina Citrato Dextrose</i>
MO	<i>Medula Óssea</i>

Lista de Tabelas

Tabela 1	Pacientes com Diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica	58
Tabela 2	Pacientes com Diagnóstico de Leucemias Agudas	59
Tabela 3	Pacientes com Diagnóstico de Mieloma Múltiplo	60
Tabela 4	Seqüências dos <i>primers</i> utilizados na confirmação do novo transcrito obtido a partir da extensão da <i>EST RC3</i>	63
Tabela 5	Seqüências dos primers utilizados na amplificação dos genes estudados pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	68

Lista de Figuras

Figura 1	Northern Blotting de tecidos normais	37
Figura 2	Patogênese na Síndrome Mielosiplásica.....	40
Figura 3	Apoptose e Diferenciação Eritróide.....	42
Figura 4	Vias de Sinalização em Leucemias Agudas.....	45
Figura 5	Interação das Células de Mieloma Múltiplo com a Medula Óssea	47
Figura 6	Vias de Sinalização em Mieloma Múltiplo	49
Figura 7	Gel Desnaturante de RNA	65
Figura 8	Localização dos primers na seqüência dos transcritos de <i>ANKHD1</i>	68
Figura 9	Eficiência da reação de PCR quantitativo em tempo real	69
Figura 10	Curva de dissociação da reação de PCR quantitativo em tempo real.....	70
Figura 11	Sistema de cultura líquida em duas fases para diferenciação eritróide	73
Figura 12	Separação de células CD138 ⁺ normais e análise morfológica	76
Figura 13	Esquema de cultura de células CD34 ⁺ (Fase I).....	80
Figura 14	Representação da predição da imunogenicidade da seqüência de aminoácidos 2423 a 2437 de ANKHD1	82
Figura 15	Esquema do vetor de RNAi pSilencer 2.1-U6	85
Figura 16	Validação das seqüências preditas por análise computacional a partir do cDNA da <i>EST RC3</i>	92
Figura 17	Representação esquemática do DNA genômico do cromossomo 5 e dos transcritos resultantes de clivagem alternativa.....	94
Figura 18	Representação esquemática da estrutura protéica primária de ANKHD1 e suas isoformas.....	95

Figura 19	Localização de possíveis sítios de clivagem alternativa	97
Figura 20	Esquema da região promotora de <i>ANKHDI</i>	98
Figura 21	Esquema da localização das ilhas CpG na região promotora de <i>ANKHDI</i>	99
Figura 22	Northern Blotting de tecidos neoplásicos	100
Figura 23	Expressão de <i>ANKHDI</i> transcritos variantes em tecidos normais	101
Figura 24	Expressão de <i>ANKHDI</i> transcritos variantes durante a diferenciação mielóide	103
Figura 25A	Expressão de <i>ANKHDI</i> transcritos variantes durante a diferenciação eritróide	105
Figura 25B	Expressão de <i>ANKHDI</i> transcritos variantes durante a diferenciação eritróide	106
Figura 26	Expressão de <i>ANKHDI</i> transcritos variantes durante a proliferação celular	108
Figura 27	Expressão de <i>ANKHDI</i> transcritos variantes durante apoptose	109
Figura 28	Expressão de <i>ANKHDI</i> transcritos variantes 2 e 3 em pacientes com SMD	110
Figura 29	Diferenciação eritróide de células CD34 ⁺ de pacientes com SMD	112
Figura 30	Expressão de <i>ANKHDI</i> transcritos variantes 2 e 3 durante a diferenciação eritróide de células CD34 ⁺ de pacientes com SMD e análise da apoptose	113
Figura 31	Expressão de <i>GATA-1</i> durante a diferenciação eritróide de células CD34 ⁺ de pacientes com SMD	114
Figura 32	Expressão de <i>ANKHDI</i> transcritos variantes 2 e 3 em células de pacientes com SMD tratadas com Decitabina	116
Figura 33	Expressão de <i>ANKHDI</i> transcritos variantes 2 e 3 em pacientes com Leucemias Agudas	117
Figura 34	Expressão de <i>ANKHDI</i> transcritos variantes 2 e 3 em linhagens de células de Mieloma Múltiplo	118

Figura 35	Expressão de <i>ANKHD1</i> transcritos variantes em pacientes com Mieloma Múltiplo	119
Figura 36	Expressão de <i>ANKHD1</i> transcritos variantes 2 e 3 na indução de apoptose em células da linhagem RPMI 8226	120
Figura 37	Interação de ANKHD1 e SHP2 em Mieloma Múltiplo	121
Figura 38	Inibição da expressão de <i>ANKHD1</i> transcritos variantes 2 e 3 por RNAi	122
Figura 39	Análise da apoptose celular em células submetidas a inibição por RNAi	123
Figura 40	Representação esquemática da suposta função anti apoptótica de ANKHD1	135

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
Lista de Abreviaturas	xvii
Lista de Tabelas	xix
Lista de Figuras	xxi
INTRODUÇÃO	31
Considerações Gerais	33
Citoesqueleto e família das anquirinas	34
Novos genes que codificam proteínas com repetições de anquirina	36
Síndromes Mielodisplásicas	39
Leucemias Agudas	43
Mieloma Múltiplo.....	45
OBJETIVOS	51
Objetivos Gerais.....	53
Objetivos Específicos.....	53
MATERIAIS E MÉTODOS	55
Casuística e linhagens celulares	57
Tecidos humanos normais.....	57
Células hematopoéticas de pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica	57

Células hematopoéticas de pacientes com diagnóstico de Leucemia Aguda	58
Células hematopoéticas de pacientes com diagnóstico de Mieloma Múltiplo	60
Linhagens celulares	61
Métodos	61
Análise Computacional	61
Reação em cadeia da polimerase e seqüenciamento	62
Amplificação da região 3' do cDNA (<i>Rapid Amplification of cDNA Ends/RACE</i>)	63
<i>Northern Blotting</i>	64
Extração de RNA total	64
Tratamento do RNA total com DNase I	65
Transcrição em cDNA	66
PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	66
Indução da diferenciação mielóide	71
Indução da diferenciação dos progenitores eritróides humanos em cultura líquida de duas fases	71
Citometria de Fluxo (diferenciação eritróide e mielóide)	73
Indução da proliferação celular	74
Indução da apoptose celular	75
Cultura de linfócitos B para obtenção de plasmócitos normais	75
Obtenção de plasmócitos normais de tonsilas	77
Separação magnética de plasmócitos (CD138 ⁺) de medula óssea de pacientes com Mieloma Múltiplo	77

Separação magnética de células CD34 ⁺ de medula óssea de pacientes com Mielodisplasia.....	78
A) Separação de células mononucleares.....	78
B) Isolamento de células CD34 ⁺	78
C) Cultivo de células CD34 ⁺	79
D) Tratamento das células mononucleares e células CD 34 ⁺ com decitabina (DAC)	79
Produção do Anticorpo anti-ANKHD1.....	81
Western Blotting	82
RNA de interferência	84
Estudo da apoptose celular.....	86
Análise Estatística	87
RESULTADOS.....	89
1. Identificação e caracterização do gene <i>ANKHD1</i> e de seus transcritos variantes <i>in silico</i>	91
2. Análise da expressão gênica de <i>ANKHD1</i> e de seus transcritos variantes por meio das técnicas de <i>Northern Blotting</i> e qRT-PCR em células normais e neoplásicas.....	100
3. Análise da expressão gênica de <i>ANKHD1</i> e de seus transcritos variantes durante o processo de diferenciação celular	102
A) Diferenciação Celular Mielóide	102
B) Diferenciação Celular Eritróide.....	104
4. Análise da expressão gênica de <i>ANKHD1</i> e de seus transcritos variantes durante o processo de proliferação celular	107
5. Indução da apoptose celular em linhagem de células leucêmica e análise da expressão gênica de <i>ANKHD1</i> e de seus transcritos variantes	109

6. Perfil da expressão gênica de <i>ANKHD1</i> e de seus transcritos variantes em neoplasias hematológicas	110
A) <i>ANKHD1</i> transcritos variantes 2 e 3 estão subexpresso em Síndrome Mielodisplásica (SMD)	110
B) Expressão de <i>ANKHD1</i> transcritos variantes 2 e 3 em células CD34 ⁺ de pacientes com SMD durante a diferenciação eritróide.....	111
C) Modulação da expressão do fator de transcrição <i>GATA-1</i> em células CD34 ⁺ de pacientes com SMD durante a diferenciação eritróide.....	114
D) Análise do efeito da Decitabina (DAC), um inibidor da metilação, sobre a expressão do gene <i>ANKHD1</i> transcritos variantes 2 e 3 durante a diferenciação eritróide de células CD34 ⁺ e em células mononucleares de pacientes com SMD	115
E) <i>ANKHD1</i> transcritos variantes 2 e 3 estão hiperexpressos em Leucemias Agudas.....	117
F) <i>ANKHD1</i> transcritos variantes 2 e 3 estão hiperexpressos em linhagens de células de Mieloma Múltiplo (MM).....	118
G) Análise da expressão do gene <i>ANKHD1</i> e transcritos variantes em células CD138 ⁺ (plasmócitos) de Mieloma Múltiplo	119
H) Indução da apoptose celular na linhagem de células RPMI 8226	120
I) Associação entre ANKHD1 e SHP2 em Mieloma Múltiplo	121
J) Silenciamento de <i>ANKHD1</i> transcritos variantes 2 e 3 por RNA de interferência (RNAi).....	122
DISCUSSÃO	125
CONCLUSÃO	137
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141

ANEXOS	157
Anexo I.....	159
Anexo II	162
Anexo III.....	164
APÊNDICES.....	167
Apêndice I.....	169
Apêndice II.....	181
Apêndice III	191
Apêndice IV	192
Apêndice V	193

INTRODUÇÃO

Considerações Gerais

O processo de neoplasia é caracterizado por um acúmulo sucessivo de mutações gênicas em determinada linhagem celular ou por fenômenos epigenéticos, ocasionando desregulação das vias de sinalização celular e conseqüentemente mudanças nas funções exercidas pelas proteínas celulares, conferindo à célula um funcionamento anômalo, escapando dos mecanismos fisiológicos de controle do crescimento e proliferação celular (Lerario et al., 2005). Cada célula expressa diferentes conjuntos de genes, em níveis diferentes, como resultado da diferenciação, do desenvolvimento, influências ambientais, enfermidades ou tratamentos. Cada situação fisiológica pode, então, ser identificada por um perfil específico de transcrição (transcriptoma) ou de produtos protéicos (proteoma). Importante passo para a compreensão dos processos fisiopatológicos das neoplasias é a identificação de genes ativamente expressos e das funções biológicas de cada proteína codificada por estes genes.

Vários tipos de abordagens têm sido usados para a identificação de novos genes humanos. Algumas destas técnicas se baseiam na comparação das diferenças na abundância de transcritos de RNA entre duas populações celulares, uma normal e outra neoplásica, como a biblioteca subtrativa, distribuição diferencial (differential display), análise seriada de expressão gênica (SAGE) (Dahia, 2002). As análises *in silico* aliadas à técnica de seqüenciamento das seqüências expressas, tanto *ESTs* (“expressed sequence tags”) como cDNAs completos (“full length”) também têm colaborado para a identificação de novos genes. Além disso, este tipo de abordagem tem a capacidade de identificar transcritos alternativos de um gene bem como contribuir para a definição do padrão de sua expressão no tecido e durante o desenvolvimento (Camargo et al., 2002).

O Projeto Genoma Humano do Câncer, uma parceria da FAPESP com o Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer, foi responsável pelo seqüenciamento de um milhão de seqüências gênicas expressas (*ESTs*), provenientes de diferentes tecidos humanos neoplásicos por meio de uma estratégia denominada de *Open Reading Frame ESTs* (ORESTES). Grande parte destas seqüências foram depositadas no *GeneBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov), banco de dados de acesso público mantido pelo NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Espera-se que as informações geradas por esse

projeto sejam traduzidas em conhecimento sobre novos genes humanos e uma maior compreensão sobre o intrincado mecanismo de interação entre genes e proteínas no controle do desenvolvimento e regulação dos diferentes sistemas biológicos e como consequência o desenvolvimento de novas drogas, diagnóstico mais precoce, tratamento das doenças com menos efeitos colaterais e um trabalho mais efetivo de prevenção.

O interesse demonstrado pelo grupo de pesquisa do Hemocentro da Unicamp na identificação e caracterização de novas proteínas homólogas às proteínas citoesqueléticas, relacionadas a neoplasias, levou ao uso do banco de dados gerado pelo Projeto Genoma Humano do Câncer e seleção de várias *ESTs*, dentre as quais uma foi de especial interesse, a *EST* RC3-CT0255-2001000-024-c05 (número de acesso AW854359). Esta *EST*, obtida a partir de cDNA de neoplasia de cólon, apresenta semelhança com a anquirina II humana, importante proteína do citoesqueleto.

Citoesqueleto e família das anquirinas

O citoesqueleto é uma importante estrutura celular composta por um extenso complexo protéico oligomérico (Beck et al., 1997), presente na superfície citoplasmática das membranas celulares. A composição de proteínas do citoesqueleto difere nos diversos compartimentos e nos diversos tipos celulares, refletindo a diversidade de funções das diferentes membranas. Existem diferentes classes de proteínas capazes de se associarem para formar uma rede oligomérica bidimensional (Bennett et al., 1993, Pascual et al., 1997, Beck et al., 1998). Dentre as mais conhecidas encontramos as proteínas da família das anquirinas. A anquirina funciona como um adaptador molecular, mediando as interações entre diferentes proteínas integrais da membrana (transportadores, receptores e proteínas adesivas) e componentes do citoesqueleto (Bennett & Healy, 2007; Peters & Lux 1993).

A família da anquirinas é composta por três genes altamente relacionados. A anquirina R (ANKR), assim denominada por ter sido primeiramente descrita nos eritrócitos ("Red cells") (Lambert et al., 1990) e por apresentar uma distribuição restrita, é codificada pelo gene *ANK1* e é encontrada principalmente nos eritrócitos, no músculo esquelético e em populações de células específicas do cérebro e do rim (Gascard & Mohandas 2000). A anquirina B (ANKB) é codificada pelo gene *ANK2*, é a principal forma encontrada no

cérebro ("Brain") e apresenta uma distribuição ampla ("Broad") (Kunimoto et al., 1991; Otto et al., 1991). Finalmente, a anquirina G (ANKG) é codificada pelo gene *ANK3* e foi assim denominada pelo fato da primeira isoforma caracterizada ser cerca de duas vezes maior que a maioria das outras anquirinas conhecidas ("Giant") e por seu padrão de expressão generalizado em múltiplos tecidos (Kordeli et al., 1995). A ANKG é a forma mais amplamente expressa da anquirina, constituindo a principal forma encontrada no rim e em outros tecidos epiteliais (Gascard & Mohandas 2000).

As anquirinas são proteínas globulares e possuem características estruturais altamente conservadas tais como repetições sucessivas de 33 aminoácidos e cuja função é realizar a ligação com domínios de várias proteínas (Peters et al., 1993; Bork, 1993). Estas repetições, denominadas repetições de anquirina, encontram-se presentes em um grande número de proteínas funcionalmente diferentes, bem como em diversos organismos, desde vírus a humanos (Sedgwick et al., 1999; Rubtsov et al., 2000).

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

Uma proteína com um domínio protéico semelhante ao domínio de repetição da anquirina e com atividade oncogênica foi descrita no fígado e, quando altamente expressa, reduz a estabilidade da proteína RB1 (Higashitsuji et al., 2000). Esta proteína foi denominada ganquirina e parece ser crucial para regulação do ciclo celular nos hepatócitos, sugerindo que este domínio específico da anquirina pode ser importante no controle do ciclo celular e levar à transformação oncogênica.

Outra proteína que contém repetições de anquirina e pode estar envolvida com o controle do ciclo celular é a proteína 53BP2, que se liga à proteína supressora de tumores

p53 (Gorina & Pavletich, 1996). Muitas outras proteínas incluem estas repetições (Peters & Lux 1993). O sucesso evolutivo destas repetições se deve, provavelmente, ao fato de constituírem um módulo versátil de geração de interfaces de dimerização altamente específicas, que têm sido moldadas pela evolução para interagir com diferentes proteínas e até mesmo com o DNA (Peters & Lux 1993).

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

Novos genes que codificam proteínas com repetições de anquirina

Em relação à *EST* RC3 por nós selecionada neste estudo em razão da sua alta homologia com a anquirina II humana, resultados preliminares obtidos por análise de *Northern Blotting* Multitecidual, utilizando como sonda a sequência de cDNA da *EST* RC3, revelaram a presença de um RNAm de aproximadamente 8Kb e um RNAm de aproximadamente 2,2Kb. Ambos os transcritos são expressos na maioria dos tecidos analisados, sendo mais abundantes na musculatura esquelética e na placenta (Figura 1). A proteína representada pela *EST* RC3-CT0255-200100-024-c05, parece desempenhar uma função importante, já que o RNAm parece ser expresso em todos os tecidos humanos analisados, embora com diferentes níveis de expressão.

Esta *EST* foi alinhada com sequências do Genoma Humano por meio de análise *in silico*, utilizando-se o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) disponibilizado no endereço www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST do NCBI. Foram encontradas 3 sequências parciais de cDNA com alta homologia a sequência obtida a partir da *EST* RC3: uma sequência do GenBank (BC009420) e duas sequências referência (RefSeq) do NCBI que codificam para a proteína hipotética denominada FLJ20288, as sequências XM_015814 e NM_024668.

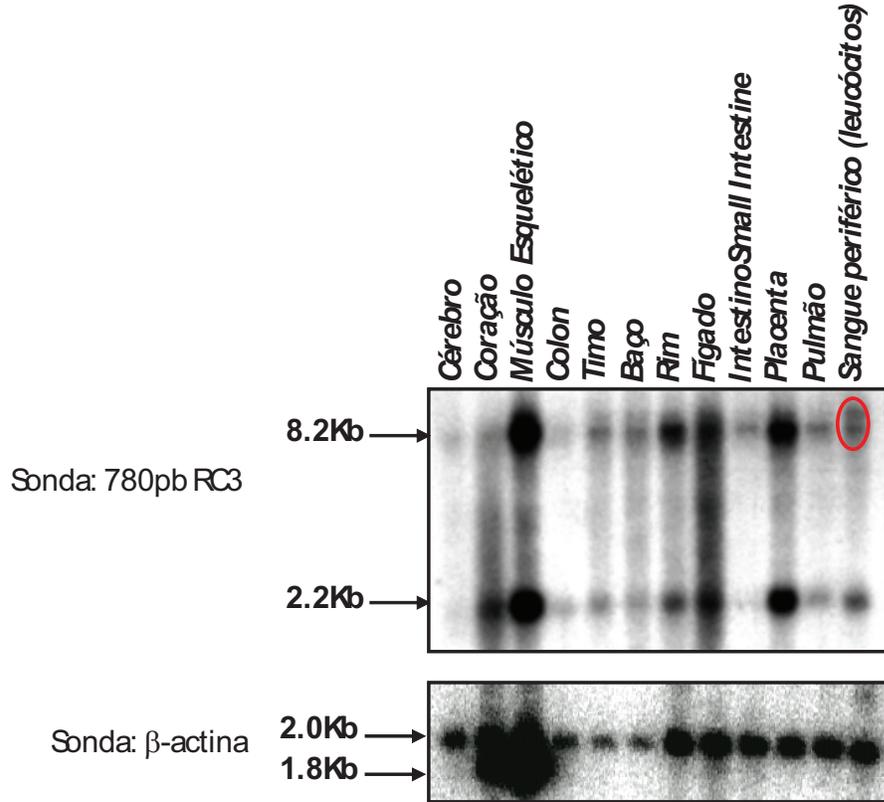


Figura 1: Análise da expressão da *EST* RC3-CT0255-200100-024-c05 através de *Northern Blotting* de tecidos normais.

Posteriormente encontramos as sequências gênicas denominadas *Human Multiple Ankyrin repeats, Single KH domain* (*hMASK* - AF521882) e *Human Multiple Ankyrin repeats, Single KH domain Binding Protein 3 Alternative Reading Frame* (*hMASK-BP3* ^(ARF) - AF521883) descritas por Poulin e colaboradores (Poulin et al., 2003). Através da revisão de nomenclatura realizada pelo *HUGO Gene Nomenclature Committee* (*HGNC*), a denominação *hMASK* foi substituída por *ANKHD1* (*Ankyrin Repeat Single KH*

Domain containing 1). Todas essas seqüências codificam proteínas com repetições de anquirina mas a função específica desempenhada pelas mesmas permanece desconhecida.

No estudo de expressão gênica realizado por Poulin e colaboradores, os dois genes identificados apresentavam alta homologia com o gene *Mask* da *Drosophila melanogaster*.

A proteína MASK foi inicialmente descrita em *Drosophila* através do estudo gênico com o objetivo de identificar genes que se associavam com a proteína tirosina fosfatase Corkscrew (Csw), cuja ortóloga em humanos é a proteína Src Homology-2 domain-containing protein tyrosine Phosphatase (SHP2), também uma tirosina fosfatase. Os estudos em *Drosophila* evidenciaram a participação da MASK nas vias de sinalização tirosina quinase através de sua associação com a Csw e seu papel essencial na proliferação, sobrevivência e diferenciação dos fotorreceptores dos olhos da *Drosophila* (Smith et al., 2002). Estudos prévios realizados em nosso laboratório mostraram que há interação de ANKHD1 com a fosfatase SHP2 em células leucêmicas (Traina et al., 2006). SHP2 é uma fosfatase de tirosina, codificada pelo gene *PTPN11*, e em condições normais é um componente positivo nas diversas cascatas de sinalização induzidas por vários estímulos, incluindo fatores de crescimento, citocinas, hormônios, antígenos, matriz extracelular, desempenhando um papel regulatório no crescimento celular, transformação, diferenciação, adesão e migração (Bentires-Alj et al., 2004). SHP2 tem sido considerada uma importante proteína efetora na sinalização em vários outros tipos de neoplasias e em diferentes contextos (Chan et al., 2008).

Diante da diversidade de processos biológicos nos quais proteínas contendo repetições de anquirina podem estar envolvidas (Bork, 1993, Peters & Lux, 1993) e a importância das proteínas adaptadoras em processos de sinalização celular, tivemos o interesse em estudar o gene *ANKHD1* e seus transcritos variantes em tecidos humanos normais e neoplásicos, assim como observar sua modulação em alguns processos biológicos, analisar o perfil de expressão em neoplasias hematológicas tais como Síndrome Mielodisplásica, Leucemia Aguda e Mieloma Múltiplo.

Síndromes Mielodisplásicas

As síndromes mielodisplásicas (SMD) compreendem um grupo de distúrbios hematológicos caracterizado por citopenias, hemopoese defeituosa e medula óssea geralmente hipercelular. Anemia grave, causada principalmente pelas altas taxas de apoptose nos progenitores eritróides, é um dos sintomas predominantes nos pacientes com SMD levando à dependência de transfusão sanguínea. A displasia de pelo menos uma linhagem celular: mielóide, eritróide ou plaquetária e a evolução de 30 a 40% dos casos para leucemia mielóide aguda (LMA) são aspectos marcantes desta síndrome (Sloand et al., 2007; Tehrani et al., 2005; Magalhães & Lorand-Metze, 2004). A patogênese é complexa e envolve mecanismos genéticos (perda ou multiplicação de material genético e alterações estruturais), epigenéticos (hipermetilação do DNA) e imunológicos (Jadersten & Hellstrom-Lindberg, 2008; Nolte & Hofmann, 2008; Hopfer et al., 2007).

As mielodisplasias foram classificadas em 1982 pelo grupo cooperativo franco-americano-inglês (FAB), nas seguintes categorias: anemia refratária (AR), anemia refratária com sideroblastos em forma de anel (ARSA), anemia refratária com excesso de blastos (AREB), anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREBt), e leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), apresentando dentre estas classes um aumento progressivo no número de precursores imaturos na medula (Mallo et al., 2008).

A excessiva apoptose intramedular é um dos mecanismos implicados na hematopoese ineficaz observada nesse grupo de doenças. De acordo com estudos prévios, o aumento nas taxas de morte celular é mais pronunciado nos estágios iniciais da doença do que nos estágios mais avançados, e a progressão para leucemia mielóide aguda é acompanhada por redução na apoptose e bloqueio na diferenciação mielóide (Figura 2). As vias de sinalização celular que desencadeiam a apoptose nas SMD, entretanto, permanecem apenas parcialmente elucidadas (Braun et al., 2005; Yamamoto et al., 2004; Claessens et al., 2002).

Síndrome Mielodisplásica

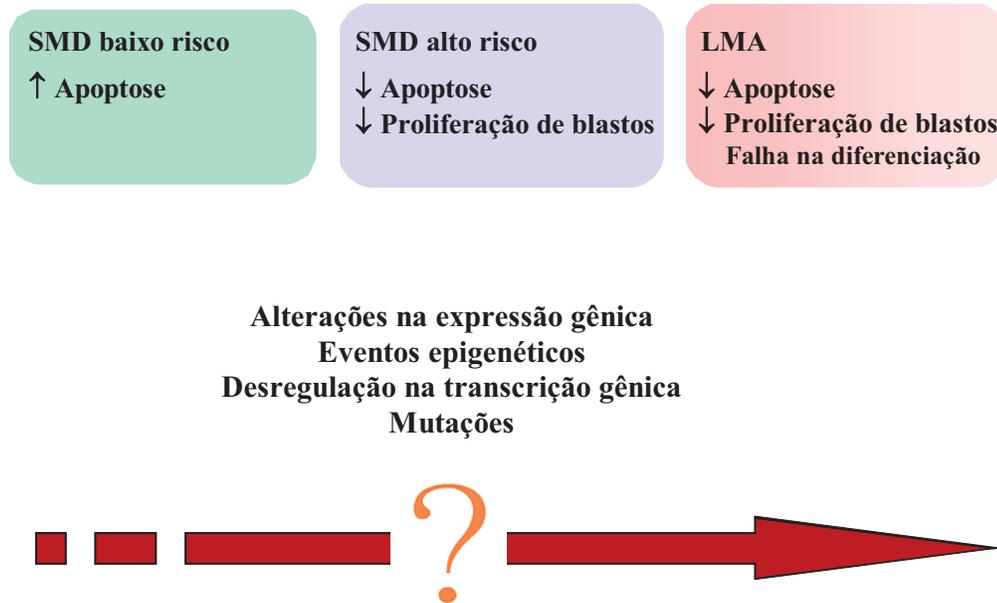


Figura 2: Múltiplos passos que caracterizam a patogênese na Síndrome Mielodisplásica (SMD). Inicialmente, alterações genéticas nas células tronco hematopoéticas podem ser causadas por agentes químicos, radiação, drogas citotóxicas ou mutações endógenas. O acúmulo de várias alterações nestas células afetam o controle do ciclo celular, da transcrição de supressores tumorais resultando na expansão de um clone de células anômalas causando aumento nos níveis de apoptose nos estágios iniciais da SMD. Alterações adicionais em genes supressores tumorais, oncogenes e a hipermetilação de genes críticos levam a transformação em leucemia que é caracterizada pela diminuição nos níveis de apoptose e diferenciação e aumento da proliferação celular.

Dados na literatura têm demonstrado o envolvimento de ambas as vias da apoptose na mielodisplasia, as vias extrínseca (citoplasmática) e intrínseca (mitocondrial) mas com maior predomínio desta última (Jadersten & Hellstrom-Lindberg, 2008). A indução da apoptose ocorre pela ativação seqüencial das caspases iniciadoras (procaspase 8, 9 e 10) e das caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7) através de sinais desencadeados por

fatores como danos ao DNA, deprivação de nutrientes ou de fatores de crescimento, níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio entre outros (Grivicich, et al., 2007).

As caspases são proteases que quando ativadas clivam alvos celulares como a polimerase Poly(ADP-ribose), proteínas quinase dependente de ligação ao DNA, proteína quinase delta C (PKC) entre outros substratos levando a inibição de proteínas anti-apoptóticas como NF- κ B, BCL2 e de proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) (Nolte & Hofmann, 2008; Timmer & Salvesen, 2007; Chauhan & Anderson, 2003) e conseqüentemente à morte celular. No entanto, a ativação limitada destas mesmas enzimas está associada à diferenciação das células eritróides e de macrófagos. Assim, distúrbios nas vias de sinalização celular como RAS/MAPK, PI3K, fortemente relacionadas aos processos de diferenciação e proliferação eritróide, estão implicados na fisiopatologia da mielodisplasia, principalmente as de baixo risco, por ocasionar ativação excessiva das caspases e conseqüente apoptose de precursores eritróides (Droin et al., 2008; Fontenay & Gyan, 2008).

Células eritróides em fase de diferenciação e maturação são protegidas da morte celular pelo hormônio eritropoetina (EPO). Surpreendentemente, a ativação de caspases específicas são necessárias à diferenciação eritróide. A diferenciação de eritroblastos basofílicos em policromatofílicos e ortocromáticos está associada à clivagem de algumas proteínas implicadas no processo de apoptose como PARP1, Lamin B e Acinus. Porém ainda não está claro se a clivagem dessas proteínas mediada pelas caspases 3, 9, 7 e 2 prepara a célula para a enucleação ou se contribuem para a modulação de genes essenciais à diferenciação terminal (Figura 3). Outro fato ainda não esclarecido é como ocorre a ativação das caspases nas células eritróides que estão sofrendo diferenciação. No entanto, foi descrito um mecanismo de *feedback* negativo no qual o ligante de Fas, expresso na superfície de eritroblastos maduros poderiam ativar as caspases e estas causariam a clivagem do fator de transcrição GATA-1 (Droin et al., 2008; Fontenay & Gyan, 2008). Este fator de transcrição é essencial a diferenciação terminal eritróide pois medeia a regulação da proteína anti-apoptótica Bcl-XL induzida pela EPO e a expressão de outros genes eritróides. Em estudos anteriores foi demonstrado que a clivagem de GATA-1 interrompe a maturação da célula eritróide no estágio de eritroblasto basofílico da diferenciação ocasionando a morte dos eritroblastos imaturos por apoptose (Droin et al.,

2008; Fontenay & Gyan, 2008). Desta forma, fica evidente que a compreensão dos mecanismos e das alterações nos componentes das vias apoptóticas e sua correlação com as síndromes mielodisplásicas são importantes para a descoberta de novos alvos terapêuticos, desenvolvimento de novas terapias e métodos de diagnósticos mais sensíveis dessa doença.

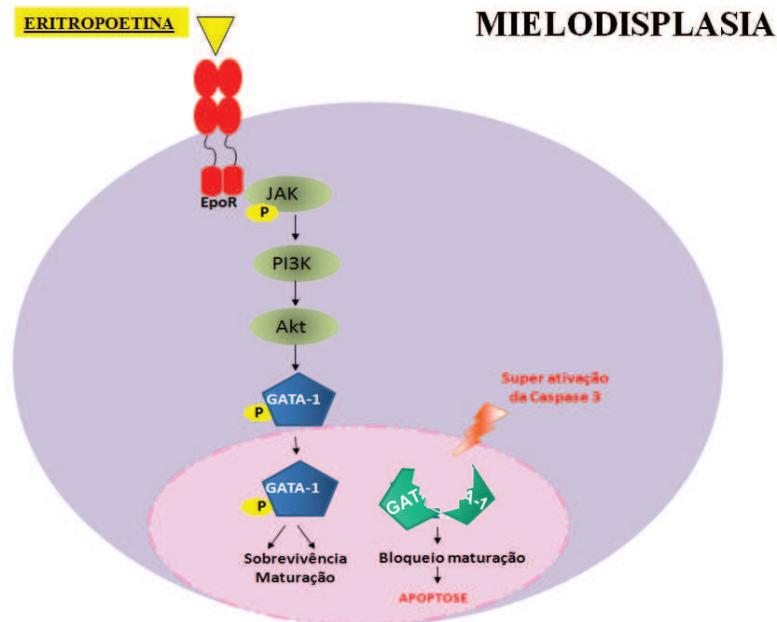


Figura 3: Apoptose e diferenciação eritróide: Células eritróides em fase de diferenciação e maturação são protegidas da morte celular pelo hormônio eritropoetina (EPO) através da fosforilação e ativação da tirosina quinase JAK2, a qual leva a ativação de várias vias de transdução de sinais. O fator de transcrição GATA-1 é fosforilado e ativado pela EPO via PI3K/AKT resultando na proliferação e diferenciação terminal das células precursoras eritróides e proteção desses precursores contra apoptose. GATA-1 é essencial a diferenciação eritróide pois medeia a regulação da proteína anti-apoptótica Bcl-XL e outros genes eritróides. Distúrbios nas vias de sinalização celular como RAS/MAPK, PI3K/AKT estão implicados na fisiopatologia da mielodisplasia, principalmente as de baixo risco, por ocasionar ativação excessiva das caspases levando a clivagem do fator de transcrição GATA-1 e conseqüente apoptose dos precursores eritróides por interrupção da maturação. (Adaptação de Droin et al., 2008).

Leucemias Agudas

As leucemias agudas constituem um grupo heterogêneo de doenças malignas caracterizadas principalmente pela falha das células progenitoras hematopoéticas em se diferenciar normalmente, resultando na expansão e acúmulo de clones celulares em fase imatura da diferenciação mielóide (Testa & Riccioni, 2007; Milella et al., 2001). Os principais sintomas são anemia, neutropenia, trombocitopenia e infiltração de órgãos como fígado, baço, linfonodos entre outros. Subdividem-se em leucemia mielóide aguda (LMA) e leucemia linfoblástica aguda (LLA), conforme os blastos sejam mieloblastos ou linfoblastos. A LMA representa cerca de 15 a 20% das leucemias agudas da infância e 80% das leucemias agudas de adultos (Martins & Falcão, 2000). A heterogeneidade da LMA, assim como uma possível diferença de comportamento biológico de diferentes subtipos motivou o estabelecimento de uma classificação. Em 1976, foi proposta uma classificação em oito diferentes subtipos, pelo grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) baseada em parâmetros morfológicos e citoquímicos (Miller & Daoust, 2005).

Alterações genéticas e epigenéticas que afetam a função de fatores de transcrição relacionados aos mecanismos normais de crescimento, proliferação, morte e diferenciação celular (Testa & Riccioni, 2007) e a ativação aberrante de quinases envolvidas em importantes vias sinalização, que normalmente traduzem estímulos extracelulares em respostas homeostáticas apropriadas, fortemente contribuem para a leucemogênese, uma vez que as células leucêmicas tornam-se incapazes de responder a estímulos externos e passam a proliferar autonomamente e escapam dos mecanismos de apoptose (Ozpolat et al., 2008; Testa & Riccioni, 2007; Steffen et al., 2005; Milella et al., 2001).

A ativação simultânea de múltiplas vias de sinalização como JAK/STAT, RAS/Raf/MEK/ERK e PI3K/AKT (Figura 4) está associada a um pior prognóstico nas Leucemias Agudas (Kornblau et al., 2006; Steelman et al., 2004). O receptor tirosina quinase Flt3 é superexpresso na maioria das leucemias agudas e mutações são encontradas em cerca de 35% dos casos resultando na ativação constitutiva de Flt3. As moléculas mutadas de Flt3 ativam as vias de sinalização MAPK, AKT e Stat 5 levando a hiperexpressão da proteína anti-apoptótica Bcl-XL (Siendones et al., 2007; Testa &

Riccioni, 2007). Do mesmo modo, mutações no receptor tirosina quinase c-kit ocorrem em cerca de 20 a 30% dos pacientes com leucemia aguda e estas ocasionam forte ativação de MAPK e PI3K e conseqüentemente o aumento da expressão de Bcl-XL e do fator de transcrição c-myc (Advani et al., 2008; Steffen et al., 2005). Adicionalmente, genes da família *RAS* são freqüentemente afetados por mutações em leucemia aguda (10%-15% dos casos) e tais mutações levam ao aumento de atividade na via de sinalização RAS. (Doepfner et al., 2007; Bacher et al., 2005). Os eventos relacionados às mutações em todos esses casos resultam na proteção contra à apoptose e aumento da proliferação celular, sendo considerados efeitos adversos a sobrevida dos pacientes com leucemia.

Interessantemente, estudos em humanos e modelos animais implicaram a hiperatividade de Ras na patogênese da leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) juvenil. Tal hiperatividade poderia ser explicada pela aberrante amplificação de sinais emitidos por receptores de fatores de crescimento associadas a outras moléculas como a fosfatase tirosina SHP2 codificada pelo gene *PTPN11* (Case et al., 2008; Illmer et al., 2005; Loh et al., 2004). Recentes estudos de diferentes autores indicam que mutações somáticas no gene *PTPN11* ocorrem em 35% dos casos de LMMC juvenil, e também em leucemia mielóide aguda (LMA) da infância (4%), síndromes mielodisplásicas (10%) e leucemia linfóide aguda (LLA) (7%) (Bentires-Alj et al., 2004; Loh et al., 2004; Tartaglia et al., 2004a; Tartaglia et al., 2003; Tartaglia et al., 2004b). Recentemente Xu e colaboradores demonstraram que SHP2 está altamente expressa e constitutivamente fosforilada em células leucêmicas de indivíduos adultos com LMA, comparado às células mononucleares de indivíduos normais (Xu et al., 2005). Estes achados indicam que a alta expressão e a ativação constitucional de SHP2 é um fenótipo comum a várias leucemias e está associada à proliferação das células leucêmicas.

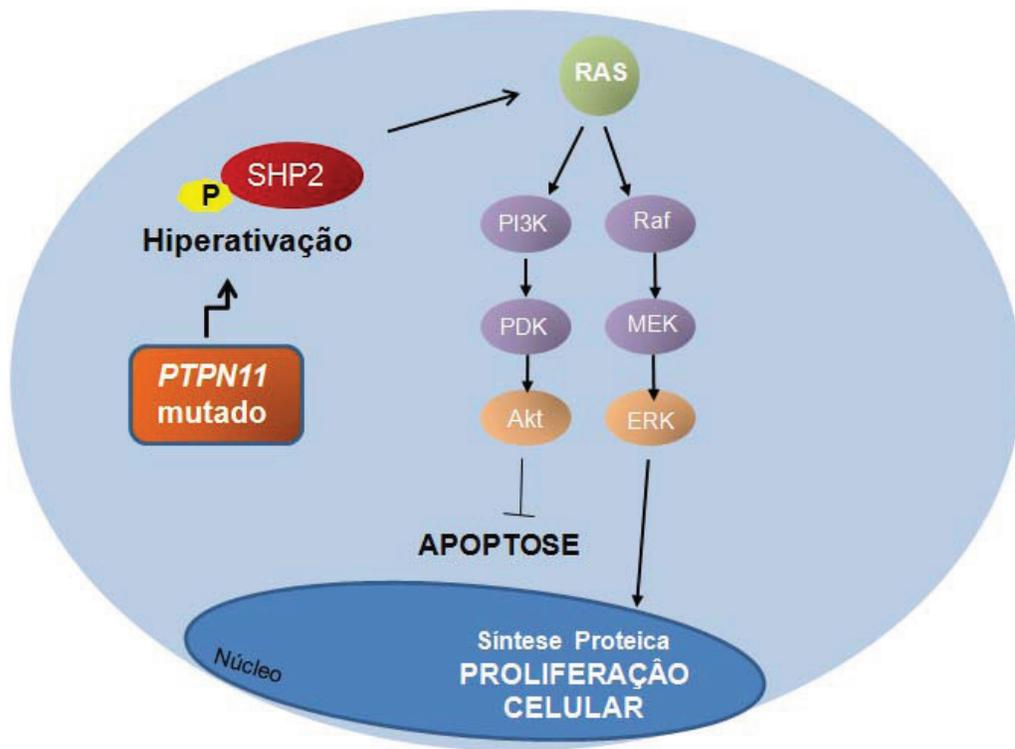


Figura 4: Representação esquemática de algumas vias de sinalização intracelulares relevantes a patogênese das Leucemias Agudas. Mutações no gene *PTPN11* ocasionam aumento da expressão e fosforilação da fosfatase tirosina SHP2 levando a uma superativação de RAS. Esta superativação de RAS resulta na ativação das vias PI3K/AKT e Raf/MEK/ERK ocasionando aumento na síntese protéica e proliferação celular e diminuição nos níveis de apoptose. (Adaptação Benjamin S. Braun and Kevin Shannon, *Clin Cancer Res* 2008).

Mieloma Múltiplo

Mieloma Múltiplo (MM) é uma neoplasia progressiva e ainda incurável de células B, caracterizada pela proliferação clonal de plasmócitos na medula óssea (MO)

(Claudio et al., 2002). Os plasmócitos neoplásicos (células CD138⁺) produzem e secretam imunoglobulina monoclonal ou fragmento desta, chamada proteína M, que progressivamente levam à anemia, insuficiência renal, destruição óssea e supressão imunológica (Aggarwal et al., 2006; Smith et al., 2005). Fraturas patológicas, dores ósseas, hipercalcemia, fraqueza, aumento da susceptibilidade a infecções bacterianas são outros sintomas presentes nesta neoplasia (Colleoni, 2007; Heider et al., 2006).

O diagnóstico do MM considera a porcentagem de plasmócitos na MO ou o plasmocitoma em biópsia tecidual, as concentrações sérica e urinária da imunoglobulina monoclonal e a presença de lesões líticas (Smith et al., 2005). O sistema de estadiamento clínico proposto por Durie & Salmon (1975), amplamente utilizado desde então, possibilita a identificação de seis grupos de pacientes (IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB), com perspectivas de sobrevida distintas: a sobrevida média de pacientes com estadio IA é de 49 meses, enquanto em pacientes com estadio IIIB é de 14,7 meses (Medeiros, 2001).

Os plasmócitos neoplásicos abrigam um grande número de alterações cromossômicas freqüentemente associadas a instabilidade genética e que têm sido implicadas na patogênese do MM. (Hose et al., 2009; Verdelli et al., 2005). Além disso, crescentes evidências sugerem que a interação dos plasmócitos neoplásicos com as proteínas da matriz extracelular e células da MO somada a liberação de quimiocinas e citocinas neste microambiente contribui significativamente para sobrevivência e proliferação destas células (Azab et al., 2009; Piazza e tal, 2006; Verdelli et al., 2005; Chatterjee et al., 2002). Particularmente, a interleucina 6 (IL-6) parece desempenhar papel relevante nesta interação pois estudos recentes têm demonstrado que esta citocina está envolvida na ativação de importantes vias de sinalização proliferativas e anti-apoptóticas no MM (Figura 5) (Wang et al., 2007; Donk et al., 2005). Altos níveis séricos de IL-6 foram observados em pacientes com MM. Além da produção parácrina realizada pelas células do microambiente medular, IL-6 também é produzido de maneira autócrina pelas células do MM (Chauhan & Anderson, 2001). Vários estudos demonstraram que IL-6 protege as células do MM da apoptose induzida por diferentes estímulos como dexametasona, anticorpo anti-fas (CD95), radiações γ entre outros (Xu et al., 1998; Chauhan et al., 1997).

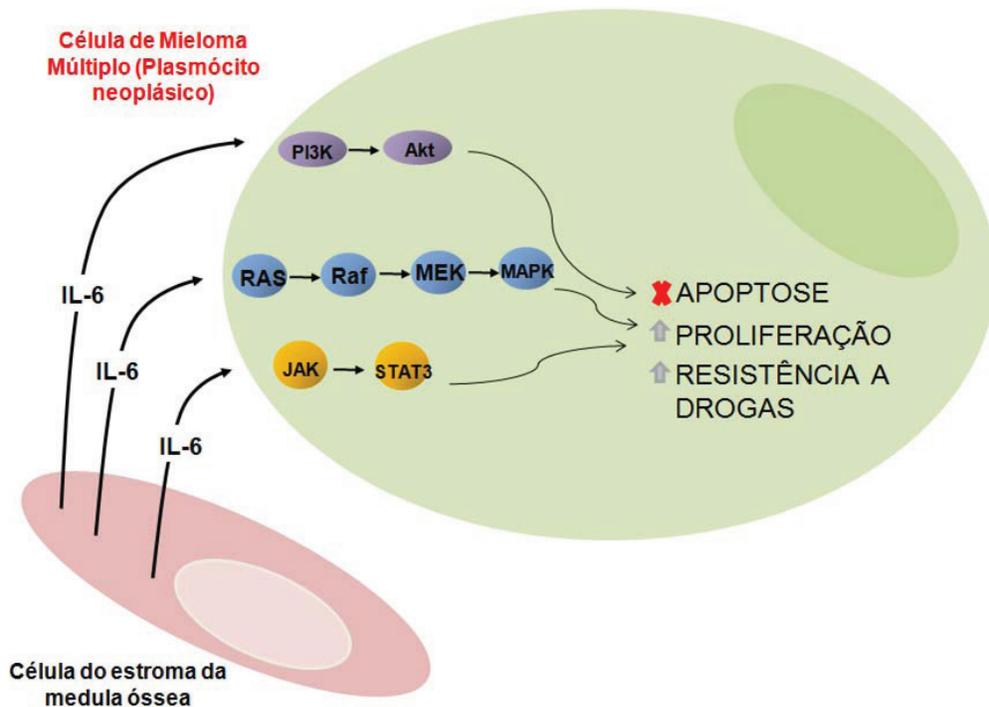


Figura 5: Esquema representativo da interação das células do Mieloma Múltiplo (MM) com o microambiente da medula óssea. A adesão das células do MM ao estroma medular ocasiona a liberação de IL-6, uma das citocinas que medeiam o crescimento dos plasmócitos neoplásicos, a sobrevivência, resistência a drogas e migração celular através da ativação das vias de sinalização JAK/STAT, RAS/Raf/MEK/ERK e PI3K/AKT (adaptado de *NWCJ van de Donk et al. Leukemia (2005) 19, 2177–2185*).

Os mecanismos pelos quais agentes terapêuticos como dexametasona induzem a apoptose em células do MM não estão bem esclarecidos mas há evidências de que vários eventos em conjunto estão envolvidos neste processo. A ligação desse glicocorticóide ao seu receptor cognato na membrana das células produz a ativação de vias de sinalização que levam à inibição do fator de transcrição NF- κ B e conseqüentemente diminuição da expressão de genes antiapoptóticos alvos deste fator de transcrição por outro lado induzem

a produção de Bim, uma proteína pro-apoptótica (Sharma & Lichtenstein, 2008). No mecanismo proposto por Chauhan e colaboradores, dexametasona induz a fosforilação e ativação da tirosina quinase de adesão focal relacionada (RAFTK) também conhecida como Pik2. No entanto, em células da linhagem MM1R, resistentes a apoptose induzida por dexametasona, este mecanismo não foi observado (Chauhan et al., 1999).

Estudos anteriores demonstraram que IL-6 confere proteção contra os efeitos apoptóticos induzidos por dexametsona através da ativação da proteína tirosina fosfatase SHP2 mas os mecanismos envolvidos nesta proteção ainda não foram bem elucidados. IL-6 se liga ao seu receptor (IL-6R/gp80) o qual interage com o domínio de transdução de sinal gp130. Esse domínio citoplasmático contém “motifs” fosfotirosina para recrutamento da proteína tirosina fosfatase SHP2. Esta tirosina quando ativada por IL-6 se liga a proteína RAFTK induzindo sua desfosforilação e inativação (Figura 6) (Chauhan & Anderson, 2001; Chauhan et al., 2000). Hideshima e colaboradores demonstraram que a apoptose induzida por dexametasona é mediada pela ativação da caspase 9 resultando na clivagem da caspase 3 e que IL-6 estimula SHP2 via gp130, a qual ativa PI3K. A ativação de PI3K, por sua vez induz a fosforilação de Akt causando a inativação de moléculas pro-apoptóticas tais como BAD, a quinase glicogênio sintetase 3 (GKS3), fatores de transcrição da família de genes proapoptóticos Forkhead e caspase 9 e conseqüentemente inibição da apoptose (Greenstein et al., 2002; Hideshima et al., 2001). IL-6 também participa da proliferação das células do MM através da ativação da via de sinalização MAPK, a qual inclui a ativação de SHP2 (Chauhan et al., 2000).

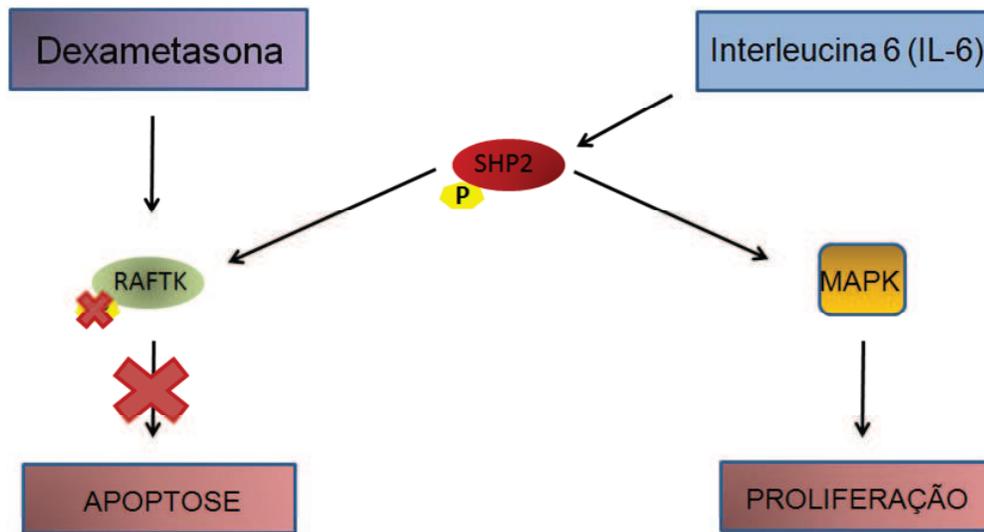


Figura 6: Esquema representativo da interação entre a via de sinalização apoptótica induzida por dexametasona e a sinalização de proliferação e resistência a apoptose induzida por IL-6 no MM (adaptação de Chauhan et al., 2000).

A desregulação de múltiplas vias de sinalização celular nas neoplasias dificulta o desenvolvimento de drogas eficazes no tratamento. A identificação e o aumento da compreensão dos mecanismos que regulam a sobrevivência, resistência a drogas e proliferação irão contribuir para o desenvolvimento de novas e específicas estratégias terapêuticas para modular a apoptose, proliferação e resistência a medicamentos nestas neoplasias.

Frente ao exposto foram definidos os objetivos deste estudo.

OBJETIVOS

Objetivos gerais

Caracterizar o padrão de expressão gênica de *ANKHD1* e transcritos variantes em células hematopoiéticas normais e neoplásicas e verificar sua função nos processos celulares

Objetivos específicos

1. Caracterizar a estrutura molecular de *ANKHD1* e transcritos variantes.
2. Investigar a expressão de *ANKHD1* e transcritos variantes em células normais e neoplásicas.
3. Verificar a participação de *ANKHD1* e transcritos variantes durante os processos de diferenciação, proliferação e apoptose.
4. Investigar a expressão de *ANKHD1* e transcritos variantes em neoplasias hematológicas.
5. Estudar a participação de ANKHD1 em vias de sinalização celular.
6. Avaliar o envolvimento de *ANKHD1* na apoptose, após a sua inibição por RNAi.

MATERIAIS E MÉTODOS

Casuística e Linhagens Celulares

Tecidos humanos normais

Os tecidos humanos normais de mama, baço, intestino delgado, fígado e linfonodo foram obtidos de autópsias no Hospital das Clínicas da UNICAMP, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

Células hematopoéticas normais

As células hematopoéticas normais foram obtidas de sangue periférico (n=4), de medula óssea (n=8) de doadores normais do Hemocentro da Unicamp e de tonsilas (n=4) de crianças submetidas a adenoamigdalectomia no Hospital Estadual de Sumaré com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e consentimento informado. As células mononucleares de medula óssea foram obtidas através de um gradiente de separação Ficoll-Hypaque e as células CD34⁺ foram obtidas por marcação com esferas magnéticas CD34 e separação em coluna magnética. As células hematopoéticas totais de sangue periférico foram obtidas através da lise de hemáceas com tampão contendo cloreto de amônio. Os plasmócitos normais (células CD138⁺) das tonsilas foram obtidos após tratamento com colagenase A, marcação com esferas magnéticas CD138 e separação em coluna magnética. A seguir, as células foram submetidas a extração de RNA.

Células hematopoéticas de pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica (SMD)

Amostras de medula óssea foram obtidas de pacientes com SMD atendidos no ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e consentimento informado. As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas no período de março de 2005 a junho de 2006 e apresentavam RNA de boa qualidade no momento da realização das análises. Foram incluídos 33 pacientes com diagnóstico de SMD e idade média de 68 anos (variando de 38 a 91 anos). Dados dos pacientes e sua distribuição de acordo com as classificações da doença estão descritos na

Tabela 1. As células de medula óssea foram coletadas em EDTA e submetidas à lise de hemácias com tampão contendo cloreto de amônio e extração de RNA.

Tabela 1: Pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica

		Número de pacientes
Pacientes estudados		33
Sexo	Masculino/Feminino	18/15
Idade (anos)	mediana (variação)	68 (38-91)
FAB	AR/ARSA	14/6
	AREB/AREBt	9/4

Abreviações. FAB: French-American-British; AR: Anemia Refratária; ARSA: Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel; AREB: Anemia Refratária com Excesso de Blastos; AREBt: Refratária com Excesso de Blastos em Transformação

Células hematopoéticas de pacientes com diagnóstico de Leucemia Aguda

As células leucêmicas foram obtidas de amostras de medula óssea de pacientes atendidos no ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e consentimento informado. O diagnóstico foi realizado conforme rotina do serviço. As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas no período de fevereiro de 2001 a dezembro de 2005 e apresentavam RNA de boa qualidade no momento da realização das análises. Foi incluído um total de 28 pacientes com diagnóstico de Leucemia Aguda (mediana de idade de 48 anos, variando de (18–83 anos). Dados dos

pacientes e sua distribuição de acordo com as classificações da doença estão descritos na Tabela 2. As células de medula óssea foram coletadas em EDTA e submetidas à lise de hemácias com tampão contendo cloreto de amônio e extração de RNA.

Tabela 2: Pacientes com diagnóstico de Leucemia Aguda

		Número de pacientes
Pacientes estudados		28
Sexo	Masculino/ Feminino	19/9
Idade (anos)	mediana (variação)	48 (18-83)
FAB		
	M0	1
	M1	5
	M2	5
LMA	M3	2
(n=23)	M4	7
	M5	1
	M6	1
	M7	1
LLA	LLA T	4
(n=4)	LLA pré-B	0
LA Bifenotípica		1

Abreviações. LMA: Leucemia Mielóide Aguda; LLA: Leucemia Linfóide Aguda

Células hematopoéticas de pacientes com diagnóstico de Mieloma Múltiplo (MM)

Amostras de células hematopoéticas foram obtidas da medula óssea de pacientes com MM atendidos no ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e consentimento informado. O diagnóstico foi realizado conforme rotina do serviço. Foram incluídos 36 pacientes com diagnóstico de MM e idade média de 55 anos (variando de 36 a 83 anos). Dados dos pacientes e sua distribuição de acordo com as classificações da doença estão descritos na Tabela 3. As células da medula óssea foram coletadas em heparina, marcadas com esferas magnéticas CD138 e os plasmócitos foram separados em coluna magnética. A seguir, as células foram submetidas à extração de RNA.

As amostras de RNA dos pacientes com MM utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pela aluna de doutorado Manoela Marques Ortega e sua orientadora Prof. Dra. Carmen Silvia Passos Lima, do Departamento de Hematologia do Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Tabela 3: Pacientes com diagnóstico de Mieloma Múltiplo

		Número de pacientes
Pacientes estudados		36
Sexo	Masculino/ Feminino	20/16
Idade (anos)	Mediana (variação) Durie & Salmon	55 (36-83)
	IA	1
	IB	0
	IIA	3
	IIB	1
	IIIA	21
	IIIB	6
	LP	2
	NA	2

Abreviações. LP: Plasmocitoma; NA: não avaliado

Linhagens celulares

Linhagens celulares de leucemias agudas humanas, mieloma múltiplo e tumores sólidos foram adquiradas no ATCC, Philadelphia, USA: KG-1, HEL (eritroleucemias), K562 (leucemia mielóide crônica em fase blástica, t(9;21), HL-60 (leucemia promielocítica aguda), Jurkat (LLA T), U937 (leucemia monocítica), ECV (carcinoma de bexiga), T98G (glioblastoma), 293 (rim embrionário), JAR (carcinoma de placenta), PC3 (adenocarcinoma de próstata grau IV) e LNCaP (adenocarcinoma de próstata).

As linhagens celulares de MM, RPMI 8226 (MM secretora de IgG/Kappa), U266 (MM secretora de IgE/lambda), OPM2 (MM secretora de IgG/lambda), K620 (MM secretora de IgG/Kappa), MM1S (MM IgA/Kappa/Dex sensível), MM1R (MM IgA/Kappa/Dex resistente) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr Lionel J. Coignet, do Department of Cancer Genetics, do Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, Nova York, dos Estados Unidos da América.

Métodos

Análise Computacional

A *EST* RC3-CT0255-200100-024-c05 (número de acesso AW854359) foi selecionada a partir das seqüências do banco de dados *ORESTES* (estas seqüências estão disponíveis no *NCBI*) por apresentar semelhança com a anquirina II humana, importante proteína do citoesqueleto. Para obter a seqüência completa do cDNAs desta *EST* e realizar análises relacionadas aos domínios conservados de proteínas, localização cromossômica entre outras foi utilizado o pacote de algoritmos de busca *BLAST* (disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Através da comparação entre as seqüências de RNAm e DNA genômico utilizando o programa *BLAT Search Genome* (<http://genome.ucsc.edu>) foi possível estabelecer a estrutura intron-exon do gene *ANKHD1* e transcritos variantes. O servidor *NetGene2 Server* foi utilizado (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>) para predição de sítios de clivagem alternativa. Para avaliação da seqüência protéica foram realizadas buscas no banco de dados *Prosite* no

endereço <http://expasy.cbr.nrc.ca/tools>, usando a ferramenta de busca *InterPro Scan*. A ferramenta *Protscale* (disponível no endereço eletrônico www.expasy.org) foi utilizada para o estudo da imunogenicidade de seqüências de peptídeos para produção de anticorpos específicos para a proteína ANKHD1. O Programa CpG Plot (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot>) foi utilizado para identificar as ilhas CpG na região promotora do gene *ANKHD1* e a busca de sítios de ligação a fatores de transcrição foi realizada através do programa *Transcription Factor Search program* (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Sequenciamento

A inclusão *in silico* de novas seqüências a *EST RC3* foi confirmada, através de PCR de cDNA de cérebro e de células da linhagem K562. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) empregados nas reações foram desenhados, usando-se o software GeneRunner (disponível no endereço eletrônico <http://www.generunner.com>). As reações de PCR foram realizadas em termociclador automático (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) e padronizadas em 50,0 µL contendo 0,6 µL de cada oligonucleotídeo (10 pMol), 1,0 µL de dNTPs (1,25 mM), 5,0 µL de Tampão 10X, 2,0 µL de MgCl₂ (50µM), 1,0 µL de cDNA, 0,3 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) e H₂O suficiente para 50 µL. Os ciclos utilizados foram os seguintes: 96°C por 2 minutos; seguidos de 35 ciclos de 96°C por 30 segundos; 52 a 60°C por 30 segundos (temperatura de acordo com o conjunto de oligos); 72°C por 1 minutos; com uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram purificados, clonados e seqüenciados com o reagente Big Dye (Applied Biosystems) em um sequenciador automático ABIprism 310 ou 377 (Applied Biosystems). Os cromatogramas obtidos foram montados por meio do Chromas versão 2.31 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). A seqüências dos “primers” utilizados para confirmação do novo transcrito estão listadas na tabela 4.

Amplificação da região 3' do cDNA (Rapid Amplification of cDNA Ends/RACE)

Esta técnica foi aplicada com o intuito de se amplificar sequências desconhecidas na extremidade 3' do RNAm. As reações de RACE 3' foram realizadas de acordo com o protocolo do 3' RACE System (Invitrogen Life Technologies). Neste procedimento a transcrição reversa do RNAm foi realizada com um iniciador adaptador (fornecido pelo kit) e iniciadores específicos para o gene foram utilizados no RACE-PCR e no nested-PCR. Os produtos amplificados foram purificados, clonados e seqüenciados com o reagente Big Dye (Applied Biosystems) em um sequenciador automático ABIprism 310 ou 377 (Applied Biosystems). Os cromatogramas obtidos foram montados por meio do Chromas versão 2.31 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).

Tabela 4: Sequências dos primers utilizados na confirmação do novo transcrito obtido a partir da extensão da *EST RC3*

Gene	Direção	Seqüência Primer
A	Sense	5'- TCTGGCAGTGACGAGGACGAAG – 3'
B	Antisense	5'- ATCTCAGTCTCCCGAGTACCTCAGG – 3'
C	Sense	5'- GACCAAGAAGATCTGGATAACCC – 3'
D	Antisense	5'- GTATGTTCAATTACACTTCTGCCTTC – 3'
E	Sense	5'- TGAAGCTGGTGCCAGATCAAG – 3'
F	Antisense	5'- ATTAACATGTCCTCCACAGG – 3'
H	Antisense	5'- CCAATTCCAGGTGTCCCTC – 3'
I	Antisense	5'- TTAAGGCAGTGTGCATCTC – 3'
J	Sense	5'- CAACTGCTGATGGTAAAGG – 3'
L	Antisense	5'- TTCCTTTGTCACCCAGCAG – 3'
M	Sense	5'- CTTGCTGCTCTTCTCGTTCCC – 3'
N	Antisense	5'- AGTCGTGCCTGTGTCTCTGG – 3'
Race3'	Sense	5'GGATGGACATGTAGAGGTGGCACGTTTG 3'

Northern Blotting

Uma sonda de cDNA de 963 pb, abrangendo região em comum a *ANKHD1* variantes 1 e 4, foi amplificada a partir de cDNA de células da linhagem K562, marcada radioativamente com [α -32P] dCTP, de acordo com o protocolo do *Megaprime Labeling Kit* (Amersham), e usada para a hibridização da membrana contendo RNAm poli(A)+ isolado de diferentes linhagens de células neoplásicas. Após uma pré-hibridização de 30 minutos a 68°C, a membrana foi hibridizada por 1 hora a 68°C em uma solução de hibridização acrescida da sonda de cDNA marcada radioativamente apresentando uma contagem no intervalo de $1-2 \times 10^6$ cpm/mL e uma atividade específica maior que 1×10^9 cpm/ μ g. Após a lavagem para remoção de excesso de sonda marcada, a membrana foi exposta em uma tela de “phosphorimaging” e reveladas no *Storm Phosphorimager* (Molecular Dynamics). As bandas 18S e 28S de RNA foram usadas como controle interno em todos os experimentos de hibridização.

Extração do RNA total

O RNA de células foi isolado utilizando Trizol (Life Technologies, USA). O Trizol é um reagente que apresenta uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. A extração de RNA com esse reagente é uma adaptação do método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (Chomczynski e Sacchi, 1987). Ao precipitado de células, contendo 5×10^6 a 1×10^7 células, foi acrescentado 1 mL de Trizol e a amostra homogeneizada até que se tornasse bastante fluida. A purificação do RNA se deu segundo o protocolo do fabricante. Nos casos onde o material a ser analisado não era abundante, o RNA total foi extraído com kit comercial – RNAeasy Mini e Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden) segundo as instruções do fabricantes. A quantificação do RNA obtido foi realizada através da leitura da densidade óptica (DO) de uma alíquota da amostra em espectrofotômetro com comprimento de onda equivalente a 260 nm, considerando que 1 DO à 260 nm equivale a 40 μ g/mL de RNA (NanoDrop Technologies, Inc., Rockland, DE). A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas, e esse varia normalmente entre 1,6 e 1,8. A qualidade das amostras de RNA obtidas após a extração foi avaliada através de

eletroforese em gel de agarose denaturante com formaldeído 1,2% e as porções 28 e 18 S foram visualizadas em luz ultravioleta (Figura 7).

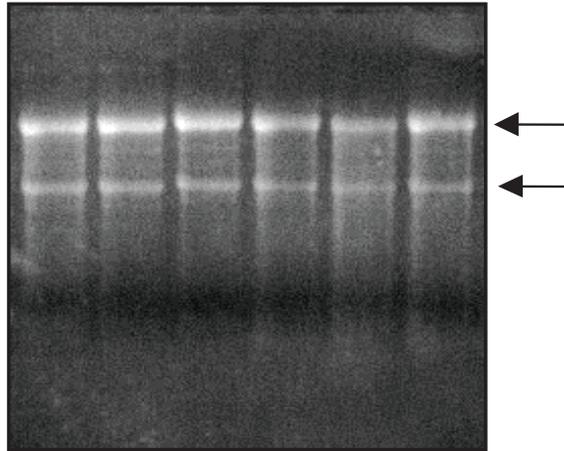


Figura 7: Gel de agarose denaturante a 1,2% de RNA total. Observamos as subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal. A presença das subunidades é indicativa do grau de integridade da amostra.

A) Tratamento do RNA total com DNase I

O RNA total de células foi tratado com DNase livre de RNase 1 U/ μ L (Invitrogen, Life Technologies), utilizando 1 U da enzima para tratar 1 a 5 μ g de RNA por 15 minutos à temperatura ambiente, a fim de eliminar uma possível contaminação deste material com DNA genômico. A reação foi interrompida pela adição de uma solução de

EDTA com concentração final de 2 mM. A enzima foi, subseqüentemente, inativada por uma incubação de 10 minutos a 65°C.

B) Transcrição em cDNA

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

PCR Quantitativo em tempo real (qPCR)

A qPCR é um método de quantificação da expressão gênica que tem como base o monitoramento da fluorescência emitida pela ligação do corante *SYBRGreen* à fita de DNA recém sintetizada em cada ciclo da PCR (Higuchi, 1993). A fluorescência emitida é captada por uma câmara CCD (*Charge-Coupled Device*), a qual apresenta uma amplitude de detecção de 530 a 580 nanômetros. Esta câmara se encontra acoplada ao equipamento *Gene Amp® 5700 SDS* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Quando o programa detecta o aumento da fluorescência (fase inicial ou lag) associada com o aumento exponencial (fase log) do produto da PCR, é determinado o ciclo de limiar (CT). Quanto maior a expressão de um gene, mais precoce será a amplificação do mesmo e, conseqüentemente, menor será o CT.

Os *primers* utilizados nas reações de qPCR em tempo real foram desenhados com o software “Primer Express” (Applied Biosystems). As seqüências desenhadas foram submetidas ao programa Blast para confirmação da homologia com o gene de interesse. Os *primers* sense e antisense foram desenhados em éxons separados de forma a detectar uma eventual contaminação com DNA genômico, uma vez que a amplificação do íntron entre os éxons aumentaria o tamanho do produto amplificado. Também foi seguido o critério de desenhá-los o mais próximo possível da cauda poli-A do RNAm, para evitar amplificações inespecíficas. Os *primers* utilizados neste estudo estão listados na tabela 5 e a localização no gene está indicada na Figura 8.

As reações de qPCR foram otimizadas testando-se inicialmente várias concentrações de primers (150nM, 300nM, 600nM e 900nm) com uma mesma quantidade de cDNA. A concentração selecionada foi aquela em que o gene de interesse obteve o menor valor de CT, ou seja, foi a concentração em que o gene foi amplificado mais precocemente.

A seguir foram realizadas reações de qPCR com a concentração ideal de primer e várias concentrações de cDNA em escala logaritmica (2×10^0 ng, $2 \times 10^{0,5}$ ng, 2×10^1 ng, $2 \times 10^{1,5}$ ng e 2×10^2 ng), para verificar se as condições de amplificação são eficientes (Figura 9) A eficiência de amplificação é obtida através da fórmula $E=10^{(-1/\text{slope})}$, onde slope é o coeficiente de inclinação da reta, e esse valor quando aplicado a fórmula de eficiência, tem que ser próximo de 2, o que significa que a cada ciclo de amplificação o material está sendo duplicado e isso equivale a 100% de eficiência (Pfaffl, 2001; Meijerink et al., 2001).

Tabela 5: Sequência dos *primers* utilizados na amplificação dos genes estudados pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Gene	Direção	Seqüência <i>Primer</i>
ANKHD1 variante 1(hMASK)	Sense	5'- CCTGCTTGGAACCCCTATGATAAA – 3'
ANKHD1 variante 1(hMASK)	Antisense	5'- CGTGCCAGGCCAAATCTG – 3'
ANKHD1variantes2e 3(PP2500)	Sense	5'- TCAGGTGAGGGTGGCCTTT – 3'
ANKHD1variantes2e 3(PP2500)	Antisense	5'- TACAACATCTATTCTTTACGTAGTAGCTTA – 3'
ANKHD1 EIF4EBP3 variante 4	Sense	5'- CGATGGTGGCCTCTCCTAAC – 3'
ANKHD1 EIF4EBP3 variante 4	Antisense	5'- CTTGCACTCCAGCAGGAACTT – 3'
GATA-1	Sense	5'- GTGGTGGTCGTCTGGCAGTT – 3'
GATA-1	Antisense	5'- CCTCATCCGGCCCAAGA – 3'
Beta actina	Sense	5'- AGGCCAACCGCGAGAAG – 3'
Beta actina	Antisense	5'- ACAGCCTGGATAGCAACGTACA – 3'
GAPDH	Sense	5'- GCACCGTCAAGGCTGAGAAC – 3'
GAPDH	Antisense	5'- CCACTTGATTTTTGGAGGGATCT – 3'

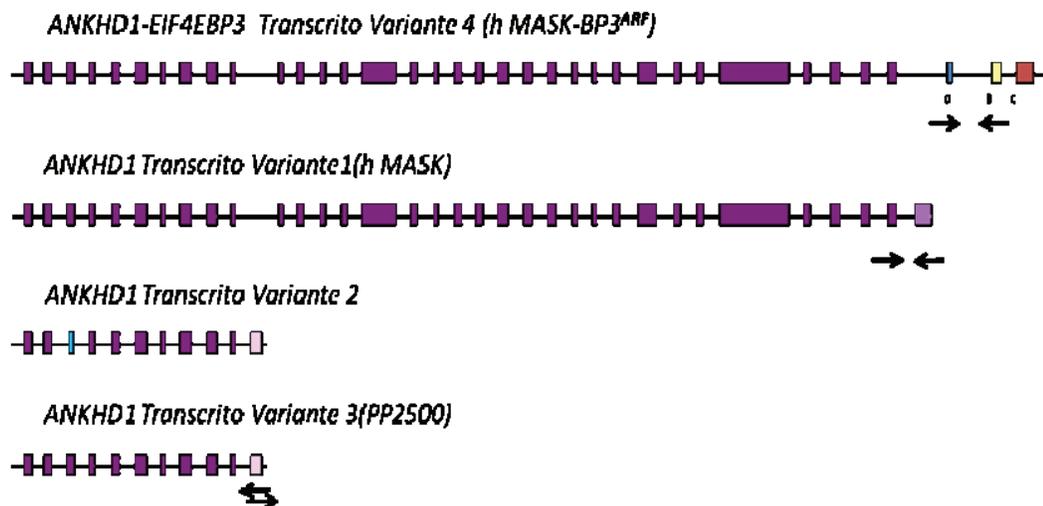
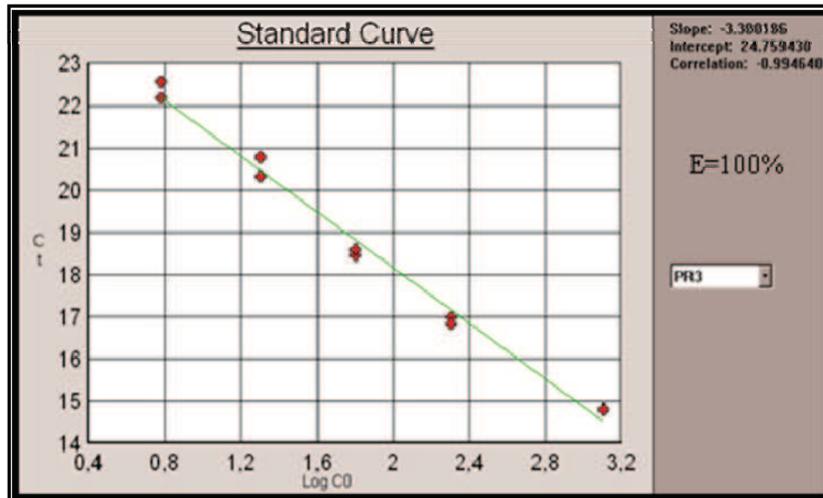


Figura 8: Representação esquemática de ANKHD1 e transcritos variantes e localização dos primers em regiões específicas de cada transcrito para avaliação da expressão gênica.

BETA-ACTINA – 300nM



ANKHD1 variantes 2 e 3 – 300nM

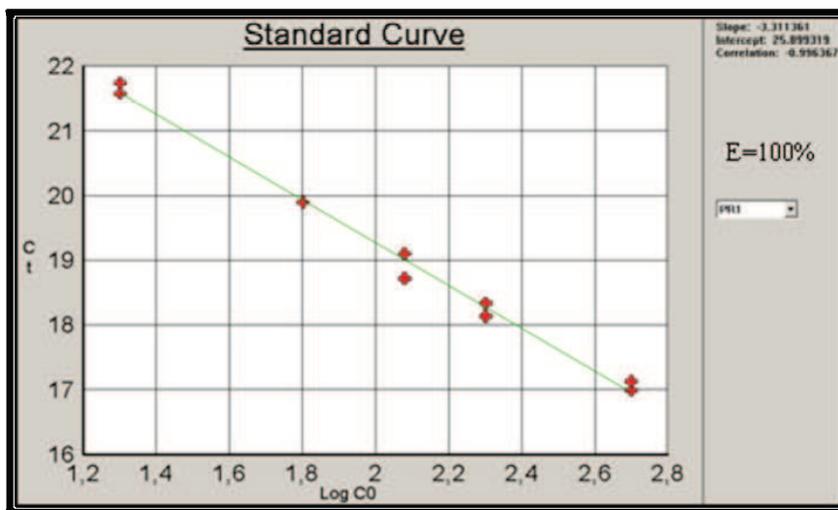


Figura 9: Análise de eficiência de amplificação dos primers *Beta actina* e *ANKHD1* variantes 2 e 3. As reações foram realizadas com 300nM de concentração de ambos primers e diferentes quantidades de cDNA (escala logarítmica). A eficiência das reações foi de 100%.

No presente estudo utilizamos para as reações de qPCR o kit “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 “ABI 5700 Sequence Detector System”. As reações foram realizadas no volume final de 12 µL sendo 6 µL de *SYBR*, 3 µL do mix de primers e 3 µL do mix de amostra de cDNA. O programa foi iniciado a 95°C por 10 minutos, seguindo-se de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Ao final de uma amplificação normal adiciona-se um passo de 20 minutos onde a temperatura aumenta gradualmente de 60°C para 95°C. À medida que os produtos gerados por PCR desnaturam com o aumento da temperatura, cai o sinal fluorescente do *SYBRGreen*. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR em cada reação, devido a diferença de T_m (temperatura de *melting*) entre os produtos de PCR causadas pelo número e composição de bases de cada produto (Figura 10). Todas as reações foram realizadas em duplicata e controles negativos com água estéril em substituição ao cDNA foram utilizados para todos os primers (NTC).

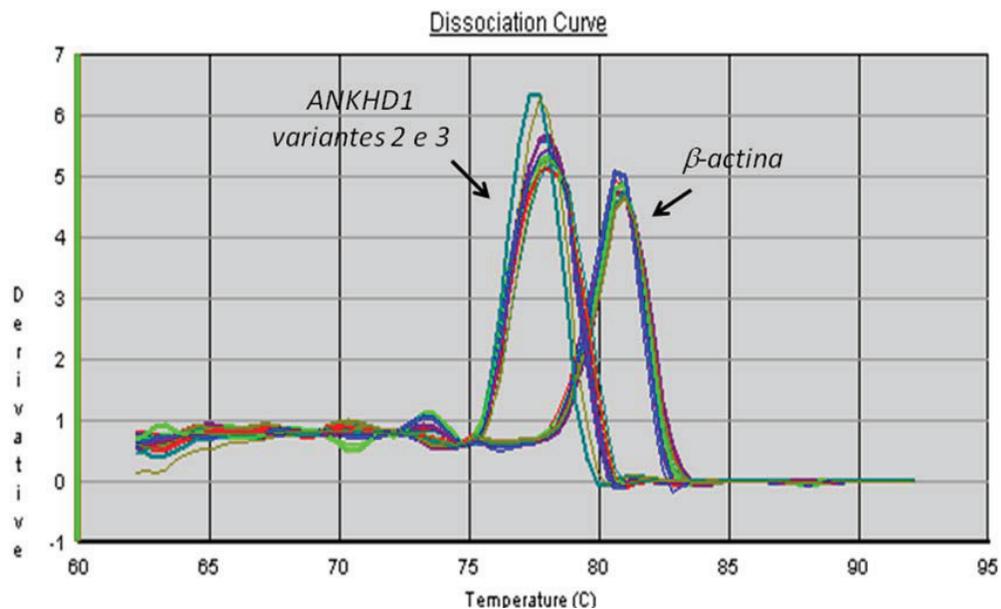


Figura 10: Curva de dissociação utilizada para analisar a ausência de contaminantes.

Para a quantificação da expressão dos genes de interesse foi utilizado o método de análise relativa dos dados, onde a expressão do gene foi normalizada em relação a controles endógenos de expressão constitutiva como os genes *Beta Actina* e *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). Também foram utilizadas nesta análise situações denominadas calibradoras como o tempo zero de um tratamento ou célula normal e célula neoplásica. A quantificação relativa da expressão gênica de *ANKHDI* e transcritos variantes foi calculada utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde estima-se que a situação calibradora tem valor “1” (um) de expressão. (Livak e Schmittgen, 2001).

Indução da diferenciação mielóide

A linhagem de células promielocítica, HL60, foi cultivada em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e 2,5 µg/mL de fungizone (Gibco), 50 µg/mL de estreptomicina (Gibco) e 25 µg/mL de gentamicina (Gibco). As células foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dois dias antes do início da indução da diferenciação utilizando ácido all trans retinóico (ATRA), as células foram cultivadas numa densidade de 2,5 x 10⁵ céls/mL. Após a adição do ATRA a uma concentração de 10⁻⁶M, as células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. A diferenciação celular foi monitorada através da observação da morfologia celular em lâminas de citospin coradas com Leishman e da análise de marcadores celulares específicos para a série monocítica e granulocítica através da citometria de fluxo. Amostras de células também foram coletadas diariamente para extração de RNA total.

Indução da Diferenciação dos Progenitores Eritróides Humano em Cultura Líquida de Duas Fases

As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas a partir de “buffy coat” de doadores saudáveis e isoladas por centrifugação num gradiente de Ficoll-Hypaque (densidade 1.077g/mL-Sigma) a 1.500 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente. A camada de células da interface foi coletada em tubo de centrífuga estéril e lavada em meio de cultura “Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium” (IMDM; Gibco) por três vezes através

de centrifugações a 1500 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. O botão de células foi ressuspenso em meio de cultura IMDM e a verificação da quantidade e viabilidade das células foi realizada através de câmara de Neubauer com corante azul de trypan. As células foram cultivadas numa densidade de aproximadamente 1×10^6 céls/mL em meio de cultura IMDM (Gibco) suplementado com 20% soro bovino fetal inativado e estéril (Gibco), 10% de meio condicionado coletado da linhagem de células de carcinoma da bexiga 5637 e 1 $\mu\text{g/mL}$ de ciclosporina A (Sandoz). As culturas foram incubadas a 37°C numa atmosfera úmida com de 5% de CO_2 por 7 dias .

Após esse período nessa cultura primária, as células não aderentes foram coletadas e lavadas em meio de cultura IMDM através de centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Foram quantificadas por exclusão das células mortas em câmara de Neubauer com azul de tripan.

As células foram colocadas novamente em cultura, em placas de 6 poços numa densidade de $0,5 \times 10^6$ céls/mL, contendo meio IMDM (Gibco) fresco suplementado com 30% de soro bovino fetal (Gibco), 1% de soro albumina bovina deionizada (BSA-Sigma), 10^{-5} mol/L 2-mercaptoetanol (Sigma), 1,5 mmol/L de glutamina (Gibco), 10^{-6} mol/L de dexametasona (Sigma), 300 $\mu\text{g/mL}$ de transferrina saturada com ferro (Sigma), 1 U/mL de eritropoietina recombinante (Cilag), 5ng/mL de “Stem Cell Factor” (SCF-Calbiochem), 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de fungizone (Gibco), 50 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (Gibco) e 25 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Gibco). As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2 e 5% de O_2 . Todos os dias a viabilidade das células foi verificada por exclusão das mortas após coradas com azul de tripan e a verificação da morfologia foi feita através de preparações de “citospin” coradas com “Leishman” (Figura 11). A diferenciação eritróide também foi monitorada observando-se os marcadores de superfície celular específicos para a linhagem de células eritróides através da citometria de fluxo. Amostras de células também foram coletadas diariamente para extração de RNA total.

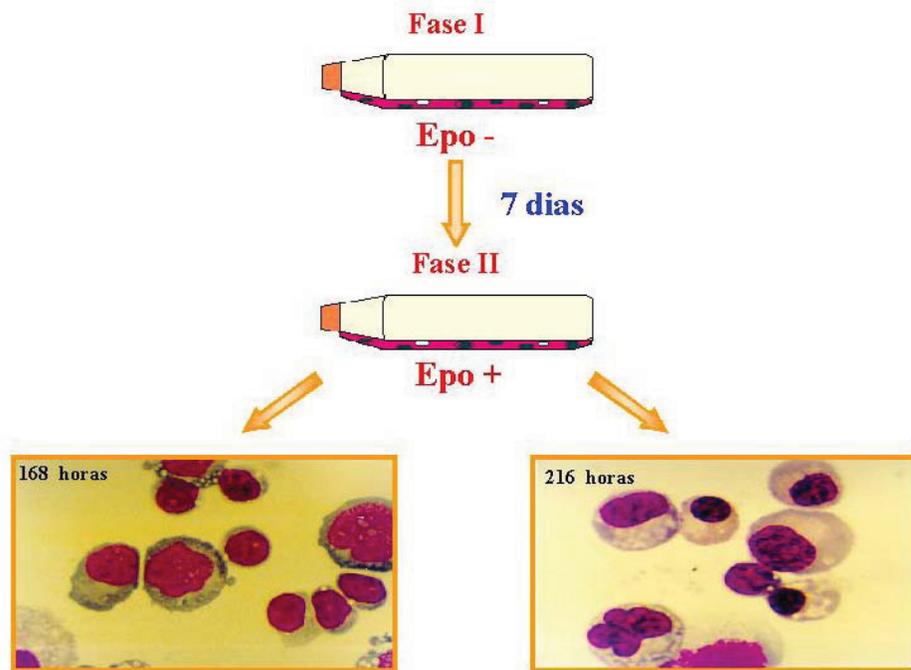


Figura 11: Desenho esquemático do método de cultura líquida em duas fases utilizado no cultivo de células precursoras eritróides humanas. As células mononucleares são isoladas do sangue periférico humano e cultivadas por 7 dias na fase I em meio de cultura contendo e fatores de crescimento do meio condicionado coletado da linhagem de células 5637 e na ausência de EPO. As células são então lavadas e colocadas na fase II em meio de cultura contendo EPO. Durante os próximos 10-14 dias as células continuam a proliferar e amadurecer até normoblastos ortocromáticos. Células coletadas com 168hs e 216hs da fase II. Coloração Leishman (1000x).

Citometria de fluxo (diferenciação eritróide e mielóide)

Para a dupla marcação dos antígenos de superfície celular glicoforina A e receptor de transferrina (CD71), misturamos 100 μL de suspensão celular contendo 5×10^5

células com 5 μ L de do anticorpo anti-glicoforina A conjugado com PE (Dako) e 5 μ L do anticorpo anti-receptor de transferrina conjugado com FITC (Dako) e incubamos no escuro a 4°C por 30 minutos. As células, devidamente marcadas, foram lavadas com uma solução de PBS, contendo BSA e azida sódica, fixadas com solução de paraformaldeído 1x e conservadas a 4°C, ao abrigo da luz, até a hora da aquisição no citômetro. Foram adquiridos, para cada análise, 10.000 eventos no total, e os dados foram analisados através do programa de computador CellQuest. A intensidade de fluorescência das células positivas foi determinada em relação a intensidade de fluorescência do anticorpo controle não relacionado. O marcador receptor de transferrina é característico de células que se encontram em estágios iniciais e intermediários da maturação eritróide enquanto que o marcador glicoforina A surge nas fases intermediárias da maturação e é bastante característico de células maduras.

Para melhor caracterizar a diferenciação das células da linhagem HL60 através da citometria de fluxo foi utilizado o anticorpo anti-human CD14 conjugado com FITC (Pharmigen), marcador específico para a série monocítica e o anticorpo anti-human CD15 conjugado com PE (Pharmigen) que é associado à série granulocítica. O protocolo de marcação e o tipo de análise foi o mesmo utilizado para a marcação e análise das células eritróides.

Indução da proliferação celular

As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas a partir de “buffy coat” de doadores saudáveis e isoladas por centrifugação num gradiente de Ficoll-Hypaque (densidade 1.077g/mL-Amershan) a 1.500 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente. A camada de células da interface foi coletada em tubo de centrífuga estéril e lavada em meio de cultura RPMI (Invitrogen) por três vezes através de centrifugações a 1500 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente.

O botão de células foi ressuspensão em meio de cultura RPMI (Invitrogen) e a verificação da quantidade e viabilidade das células foi realizada através de câmara de Neubauer com corante azul de tripan. As células foram cultivadas numa densidade de aproximadamente 1×10^6 céls/mL em meio de cultura RPMI (Invitrogen) suplementado com

10% soro bovino fetal inativado e estéril (Invitrogen). As culturas foram incubadas a 37°C numa atmosfera úmida com de 5% de CO₂ por 72 horas. A cada 24hs, após adição de PHA (50ng/mL - Invitrogen), foram coletadas amostras para análise da viabilidade e extração de RNA.

Indução da apoptose celular

A linhagem de células mielóide KG1, foi cultivada em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal e 2,5 µg/mL de fungizone (Gibco), 50 µg/mL de estreptomicina (Gibco) e 25 µg/mL de gentamicina (Gibco). As células foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dois dias antes do início da indução da apoptose utilizando o agente oxidante t-butil hidroperóxido (t-BOOH), as células foram cultivadas numa densidade de $2,5 \times 10^5$ céls/mL. Após a adição do t-BOOH nas concentrações de 5, 30 e 50 µM, as células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ por um período de 2 horas. Após as incubações as células foram coletadas para extração de RNA e avaliação da morte celular por citometria de fluxo através da marcação por Anexina V e iodeto de propídeo (PI).

Cultura de linfócitos B para obtenção de plasmócitos normais

As células mononucleares foram obtidas de um “pool” de 3 doadores de medula óssea, através de gradiente Ficoll-Hypaque, procedimento já descrito. Após a separação das células mononucleares da MO, os linfócitos B foram positivamente selecionadas por meio de marcação com anticorpo anti-CD19 revestido por microbeads e após separação na coluna LS+, 2×10^5 células foram incubadas com o fluorocromo PERCP para avaliar a eficácia da separação magnética por citometria de fluxo.

Cerca de $1,5 \times 10^5$ /ml linfócitos B purificados foram colocados em cultura na presença de uma combinação de interleucinas, ou seja, interleucina-2 (IL-2) (20 U/mL), IL-4 (50 ng/mL), IL-10 (50 ng/mL), e IL-12 (2 ng/mL) (Calbiochem, USA), e CD40 ligante (50 ng/mL). Após 4 dias de cultura, cerca de $3,0 \times 10^5$ /mL de linfócitos B foram colocados

em cultura por mais dois dias, sem CD40L e com (IL-2) (20 U/mL), IL-10 (50 ng/mL), e IL-12 (2 ng/mL) e IL-6 (5 ng/mL) (Calbiochem, USA).

No sexto dia de cultura as células CD138⁺ foram positivamente selecionadas por meio de marcação com anticorpo anti-CD138 revestido por microbeads. O anticorpo anti-CD95 foi utilizado na análise de citometria para verificar a porcentagem de células apoptóticas. A marcação do CD95 foi feita pelo fluorocromo FITC, do CD19 pelo fluorocromo PERCP e o CD138 pelo fluorocromo PE. As células CD138⁺ (plasmócitos normais) foram utilizadas para a extração de RNA (Figura 12).

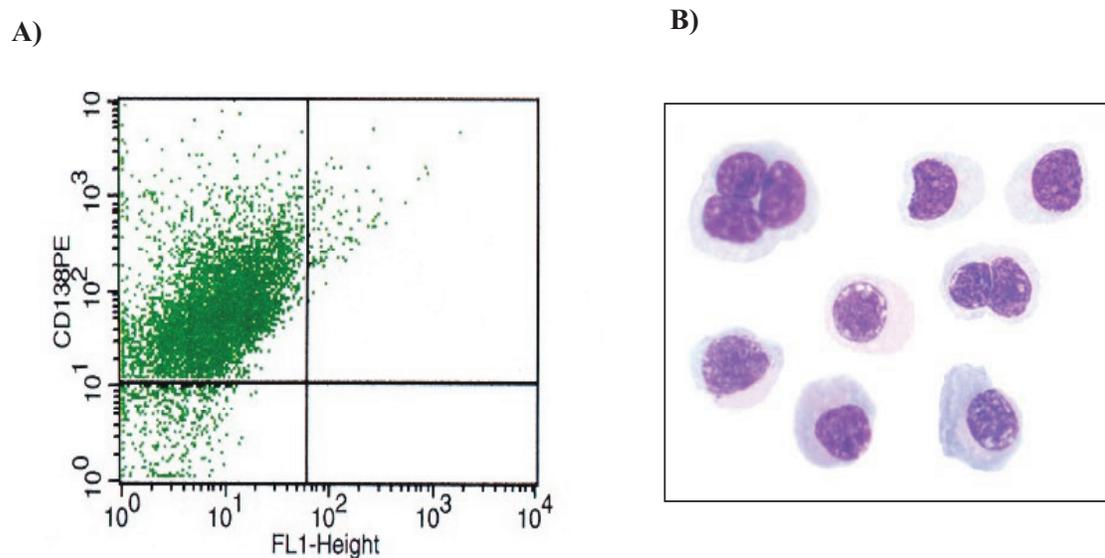


Figura 12: Plasmócitos obtidos através da diferenciação de linfócitos B em cultura líquida, marcados com esferas magnéticas CD138 e separados em coluna magnética. **A)** quadrante superior esquerdo de gráfico de pontos, obtido por citometria de fluxo com o anticorpo anti-CD138 e o fluorocromo ficoeritrina (PE) indicando a quantidade de células CD138⁺. **B)** Lâminas de citospin para verificação da morfologia e pureza dos plasmócitos normais obtidos através da diferenciação de linfócitos B em cultura líquida.

Obtenção de plasmócitos normais de tonsilas

Amostras de tonsilas foram obtidas de crianças submetidas a adenoamigdalectomia. O tecido fibroso das tonsilas foi repicado com bisturi e incubado com um tampão de digestão contendo 20mg de colagenase tipo 1A, 200mg de BSA, 20mL de meio DMEM e 10 μ L de gentamicina por um período de 1 hora em banho-maria à 37°C e sob agitação constante. Após a digestão completa do tecido, a reação foi interrompida pela adição de 10ml de soro bovino fetal (FBS). Esta mistura foi filtrada em uma membrana de 30 μ M para retirada de tecido não digerido. As células foram centrifugadas por 15 minutos a 1500 rpm e as hemácias foram lisadas com tampão de lise. Após, as células restantes foram quantificadas em câmara de Neubauer, incubadas com esferas magnéticas CD138 por 30 minutos no escuro e a 4°C e selecionadas em coluna magnética LS. A pureza das amostras foi verificada por citometria de fluxo e as células CD138⁺ (plasmócitos normais) foram utilizadas para a extração de RNA.

Separação magnética de plasmócitos de medula óssea de pacientes com MM

Foram colhidos em torno de 30 mL de medula óssea de cada paciente com mieloma múltiplo em heparina. As amostras foram mantidas sob refrigeração até a hora da manipulação. Para a retirada da gordura e outros fragmentos provenientes da punção, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm e a 20°C. Todo o sobrenadante foi retirado e a medula foi diluída em meio RPMI 1640 suplementado com 100U/mL de heparina.

As células mononucleares foram obtidas através de gradiente Ficoll-Hypaque e lavadas duas vezes através de centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos com meio RPMI. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer e incubadas com beads CD 138⁺ por 30 minutos no escuro e a 4°C. Após, as células foram separadas em colunas LS⁺ e marcadas com fluorocromo PE para a verificação da eficácia da separação por citometria de fluxo.

Separação magnética de células CD34⁺ de medula óssea de pacientes com Mielodisplasia

A) Separação de Células Mononucleares

Amostras de medula óssea de pacientes com SMD e indivíduos normais foram coletadas em tubo contendo heparina lítica e processadas imediatamente após a coleta. As amostras foram diluídas 1:2 em solução de PBS+ACD+BSA e em seguida colocadas em gradiente de Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Uppala Sweden) por 30 minutos à 1500 rpm em temperatura ambiente. O anel de células formado na interface foi coletado e lavado em PBS+ACD+BSA. Em seguida, as células foram lisadas em tampão de lise para hemácias por 15 minutos em gelo e centrifugadas por 5 minutos a 1750 rpm. Novamente as células foram lavadas em PBS e ressuspensas para contagem em câmara de Neubauer.

B) Isolamento de Células CD 34⁺

Após a contagem das células, estas foram incubadas com *FcR Blocking Reagent* e *Hapten-Antibody* por 15 minutos e após lavagem, incubadas com *Anti-Hapten MicroBeads*, segundo as orientações do fabricante (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). Após o tempo de incubação, as células foram lavadas, ressuspensas em PBS e passadas por uma coluna magnética LS (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) fixada em um suporte magnético. As células de interesse para o nosso estudo ficaram presas à coluna enquanto as contaminantes (monócitos e linfócitos) foram coletadas em tubo falcon. Em seguida, a coluna foi retirada do suporte magnético e uma leve pressão foi realizada através de um êmbolo para fazer com que as células CD 34⁺ se soltassem da coluna e pudessem ser coletadas em um novo tubo. As células CD 34⁺ foram então lavadas com PBS+ACD+BSA por 10 minutos a 1500 rpm e ressuspensas em 1mL de PBS+ACD+BSA para contagem em câmara de Neubauer. 1×10^4 células CD 34⁺ de pacientes com SMD e indivíduos controle foram marcadas com fluoróforo RPE (*anti-mouse immunoglobulins RPE, Rabbit F (ab') 2*) para citometria de fluxo, para verificar a pureza das células obtidas. Lâminas de *citospin* coradas com Leishman foram preparadas para verificação da morfologia celular.

C) Cultivo das Células CD 34⁺

As células CD 34⁺ foram cultivadas em metilcelulose Methocult™ H-4230 (Stem Cell Technologies Inc, Vancouver, British Columbia, Canadá). Para cada um mL de metil celulose foram cultivadas 3 x10³ células CD 34⁺, acrescidas de 50 ng de *Stem cell factor* (SCF; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN), três unidades de Eritropoetina (Epo; Vetter Pharma Fertigung GmbH, Ravensburg, Alemanha) e 30 UI de interleucina 3 (IL-3; Pepro Tech México, S.A. de C.V.). A metilcelulose foi pipetada em placa de 6 poços na concentração de um mL por poço em atmosfera úmida no interior da placa. A placa foi incubada por sete dias em estufa de CO₂ - 5%, a 37°C (Fase I – Figura 13). Após seis dias as colônias formadas por unidades formadoras de colônias eritróides (CFU-E) e proeritroblastos foram coletadas, lavadas, ressuspensas em meio Minimum Essential Medium Alpha (Alpha MEM; GIBCO™ Grand Island, N.Y., USA) e contadas em câmara de Neubauer. Nesse momento, foram coletadas células para extração de RNA total, citometria de fluxo e citospin. O restante das células foi colocado novamente em cultivo, agora em fase líquida, tendo como base o meio Alpha MEM (Fase II). Na Fase II utilizamos 30% de soro fetal bovino (SFB), 8% de albumina sérica bovina deionizada (BSA), 300 mg/mL de holotransferrina humana (Calbiochem, USA), 10⁻⁵ M de β – mercaptoetanol (Sigma Chemical CO, St. Louis, USA) e 2 unidades de Epo. As células foram cultivadas novamente em 5% CO₂ a 37°C (Croisille et al., 1999).

Além do dia 6, foram coletadas células no dia 14 da fase II para extração de RNA total. A diferenciação eritróide foi acompanhada por citometria de fluxo e a morfologia por *citospin* corado com Leishman. A viabilidade celular da fase I e II foi analisada por meio da técnica de azul de trypan.

D) Tratamento das células mononucleares e células CD 34⁺ com decitabina (DAC)

Células mononucleares de medula óssea de pacientes com SMD foram obtidas por separação em gradiente de Ficoll-Paque e cultivadas em suspensão por um período de 72 horas sob a ação da droga Decitabina (agente desmetilante) na concentração de 5µM

para avaliar possível modulação da expressão do gene *ANKHD1* por metilação. A condição controle foi realizada com a adição apenas do veículo, no caso PBS.

As células $CD34^+$ de pacientes com SMD foram tratadas com Decitabina na concentração de $5\mu\text{M}$ durante a fase II da diferenciação eritróide como já descrito. Amostras de células foram coletadas antes da adição de decitabina e ao final da diferenciação para avaliar uma possível modulação da expressão do gene *ANKHD1* por metilação.

O RNA total foi extraído de amostras de células tratadas e não tratadas com decitabina e a análise da expressão gênica foi realizada por qRT-PCR.

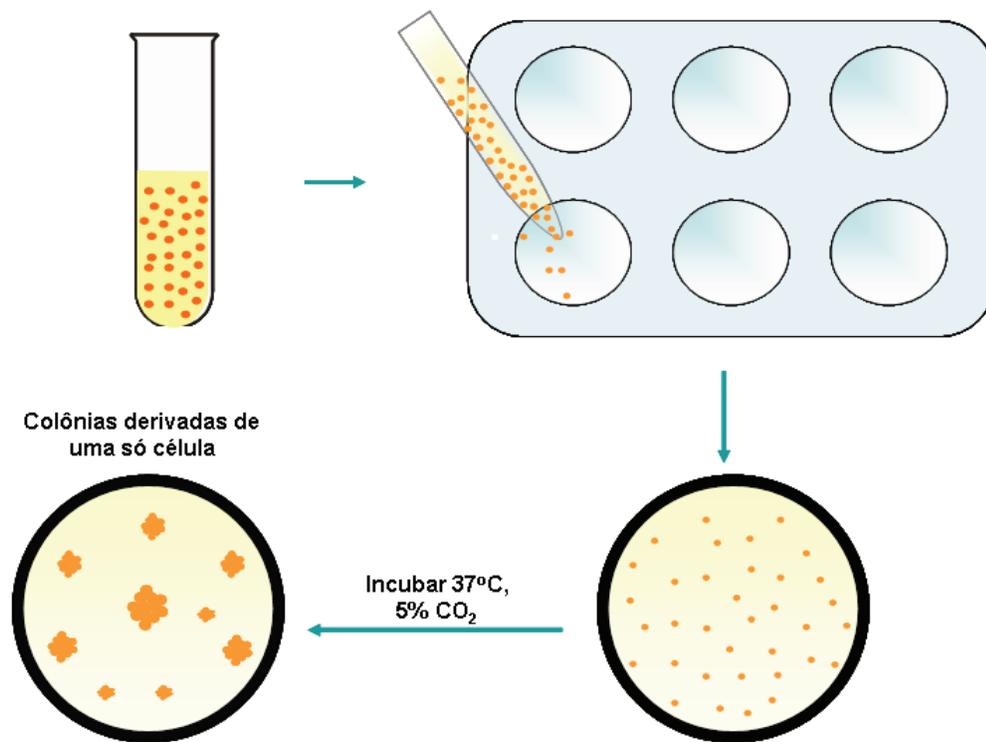


Figura 13: Representação esquemática da cultura de células $CD34^+$ - Fase I (figura adaptada da Tese Doutorado de Carolina Lanaro)

Produção do anticorpo anti-ANKHD1

Através da ferramenta Protscale, disponível no endereço eletrônico www.expasy.org, foi escolhida uma seqüência de 16 aminoácidos, com capacidade antigênica: HPMHQQLSDPSTFSQ (aa 2423 – 2437) (Figura 14). A escolha do peptídeo é baseada em sua imunogenicidade e podem-se utilizar vários parâmetros para fazer essa predição através da ferramenta ProtScale. No entanto, a escolha de dois parâmetros já é suficiente para que todos os outros corroborem com a imunogenicidade do peptídeo escolhido. Nesse caso, foi utilizado o caráter hidrófobo de Kyte e Doolittle (Kyte e Doolittle, 1982) e a predição da estrutura secundária β -turn de Chou e Fasman (Chou e Fasman, 1979). No primeiro parâmetro, quanto menos hidrófobo for o peptídeo, mais imunogênico. Já no segundo parâmetro, quanto maior a probabilidade do peptídeo apresentar uma β -turn, maior a probabilidade de ser imunogênico. Assim, os parâmetros descritos acima revelaram que uma das seqüências de peptídeos escolhida pela sua imunogenicidade (HPMHQQLSDPSTFSQ) era a mesma seqüência usada pelo grupo de Dr. Francis Poulin (Department of Genome Sciences, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA), que descreveu a proteína ANKHD1 (Poulin et al., 2003), e que, gentilmente, nos cedeu uma alíquota para teste do anticorpo policlonal produzido em coelhos. Após a escolha da região antigênica de 16 aminoácidos, a produção do anticorpo policlonal purificado anti-ANKHD1 foi solicitada a Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

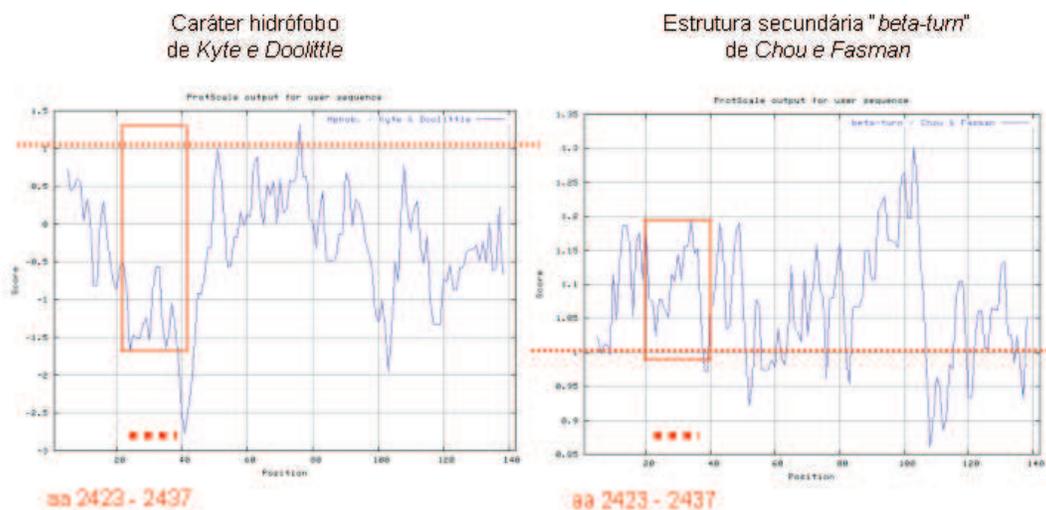


Figura 14: Representação da predição da imunogenicidade da seqüência de aminoácidos 2423 a 2437 de ANKHD1. O gráfico a esquerda representa a visualização da predição do caráter hidrófobo de Kyte e Doolittle da região de aminoácidos de ANKHD1 escolhida para a produção do anticorpo anti-ANKHD1, obtidas através da ferramenta ProtScale. O gráfico à direita representa a visualização da predição da estrutura secundária β -turn de Chou e Fasman desta seqüência. A representação da região dos 16 aminoácidos escolhidos (aa 2423 – 2437) está indicada na parte inferior da figura. A linha pontilhada em vermelho indica o score 1. O retângulo vermelho indica o baixo caráter hidrófobo e a alta probabilidade da seqüência de 16 aminoácidos apresentar uma β -turn, indicando a sua imunogenicidade.

Western Blotting

Ao precipitado celular contendo 5×10^6 a 1×10^7 células foi acrescentado tampão de extração de proteínas contendo 100 mM Tris (pH 7.6), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 0,1 mg Aprotinina, 35 mg PMSF/mL, 10 mM Na_3VO_4 , 100 mM NaF, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, e 4

mM EDTA. As amostras foram homogeneizadas até que se tornassem bastante fluidas. Após 30 minutos a 4°C, essas amostras passaram por um processo de centrifugação a 4°C durante 20 minutos para remoção dos restos celulares. Alíquotas com mesma concentração protéica foram usadas para produção do extrato total proteico ou para imunoprecipitação. Para produção do extrato total proteico, adicionou-se às alíquotas tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditioneitol e aqueceu-se em água fervente por 4 minutos. Após isso, as amostras foram submetidas à eletroforese ou armazenadas a -80°C. Para produção de imunoprecitado, adicionou-se às alíquotas o anticorpo anti-ANKHD1 ou anticorpo de interesse e proteína A-Sepharose 6MB. Após o término da incubação e da lavagem, os precipitados foram ressuspensos em tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditioneitol e aquecidas em água fervente por 4 minutos. Em seguida, as proteínas imunoprecipitadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 8%-SDS-PAGE em aparelho de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 90 minutos a 120 V (constante) em aparelho miniaturizado de transferência da Bio-Rad. A ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 1 hora com tampão de bloqueio (5% leite em pó magro, 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, and 0.02% Tween 20) a 4°C. A membrana de nitrocelulose foi então incubada com anticorpos específicos diluídos em tampão de bloqueio (0.3% de leite em pó magro) por 12 horas a 4°C e então lavadas 3 vezes com solução basal (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, and 0.02% Tween 20). Os anticorpos anti-ANKHD1 utilizados nos experimentos de Western Blotting foram o anti-ANKHD1 desenvolvido pela Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), a partir da escolha do peptídeo antigênico de 16 aminoácidos, e o RC 2335 cedido pelo Dr. Francis Poulin (Department of Genome Sciences, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA). Além deste anticorpo foi utilizado o anticorpo primário anti-SHP2 da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). O sistema de revelação usado foi o baseado em quimioluminescência, de acordo com as instruções no kit ECLTM Western Blotting Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Em suma, as membranas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário, conjugado à HRP (Horseradish peroxidase), lavadas novamente, e então submetidas ao substrato da enzima, resultando

num produto luminescente, detectado por auto-radiografias em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY).

RNA de interferência

Moléculas de short hairpin RNA (shRNA) para *ANKHDI* transcritos variantes 2 e 3 foram desenhadas seguindo o protocolo do fabricante do vetor pSilencer 2.1-U6 neo (Ambion). As moléculas de shRNA foram geradas através da hibridização de oligonucleotídeos de DNA (IDT) com sequência sense 5' – AGC TTT TCC AAA A AA GCT ACT ACG TAA AGA ATAG TC TCT TGA ACT ATT CTT TAC GTA GTA GCG – 3' e antisense 5'- GAT CCG CTA CTA CGT AA GAA TAG TTC AAG AGA CTA TTC TTT ACG TAG TAG CTT TTT TGG AAA – 3' por aquecimento a 90°C por 3 minutos e resfriamento dos mesmos a 37°C por 1 hora.

Os oligonucleotídeos hibridizados foram clonados no vetor pSilencer 2.1-U6 neo (Figura 15) na presença da enzima T4 ligase a 25°C por 1h. Após clonagem, bactérias DH5 α foram transformadas com 10 μ L do material clonado. A transformação seguiu-se primeiramente a 0°C por 20 minutos, depois a 42°C por 90 segundos e novamente a 0°C por 2 minutos. As bactérias transformadas foram cultivadas em meio líquido SOC (10mM de cloreto de magnésio e de sulfato de magnésio, 20mM de glicose, triptona, extrato de levedura, cloreto de sódio e cloreto de potássio) a 37°C, 220rpm por 1 hora. Após este período, foram plaqueadas em meio sólido LB com 100 μ g/mL de Ampicilina e incubadas em estufa 37°C por 12 horas. Em seguida, colônias foram selecionadas, cultivadas em meio líquido Circle Grow, e tiveram seu DNA seqüenciado para que possíveis mutações existentes fossem verificadas na seqüência codificadora da molécula interferente para *ANKHDI* e transcritos variantes 2 e 3. Um vetor controle negativo, pSilencer 2.1-U6 neo com expressão de molécula interferente não-homóloga ao genoma humano ou ao genoma de camundongo nem ao de rato, também foi amplificado em bactérias transformadas.

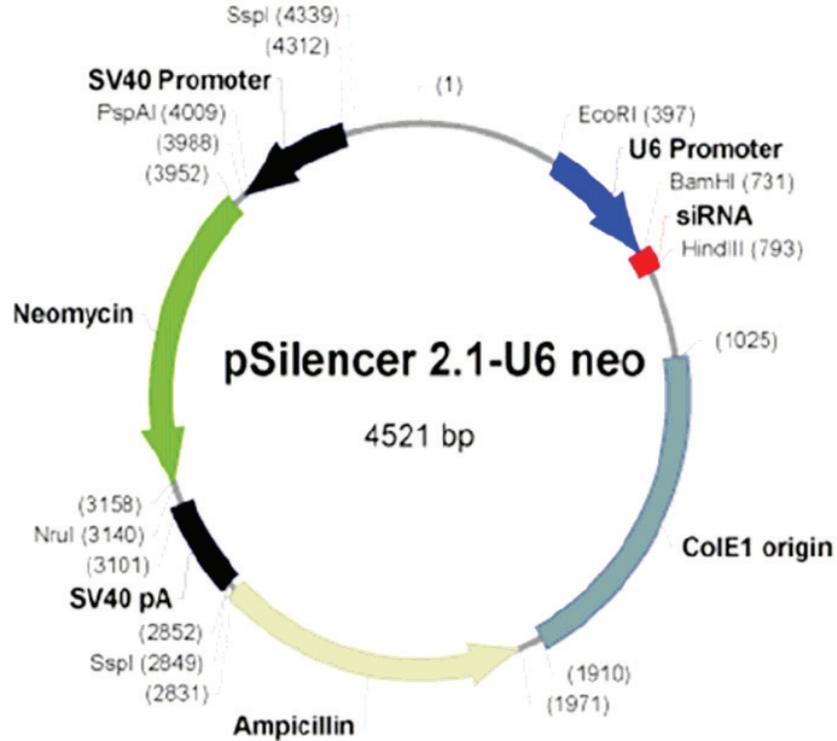


Figura 15: Esquema do vetor de expressão de moléculas shRNAs, *pSilencer 2.1-U6 neo*, utilizado neste estudo.

Após confirmação no cromatograma da integridade da sequência codificadora da molécula interferente, um clone bacteriano contendo o plasmídeo com a sequência da molécula interferente para *ANKHD1* transcritos variantes 2 e 3 e um contendo o plasmídeo controle negativo foram selecionados e crescidos em 500ml de meio LB com ampicilina à concentração de 100mg/mL por 16 horas para a produção em larga escala. Após esse período, a extração do DNA plasmidial foi realizada utilizando-se o kit QIAGEN Plasmid Mega (QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante. Novamente, os DNAs produtos destas purificações foram sequenciados para verificar a integridade da sequência codificadora.

Células da linhagem 293 foram submetidas à transfecção transitória através do método de lipofecção utilizando o reagente Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. As células foram tripsinizadas, lavadas e cultivadas em meio DMEM com 10% de soro bovino fetal, em uma concentração de 1×10^6 células no dia precedente a transfecção. No dia do experimento as células foram lavadas com tampão PBS estéril e incubadas com OPTI-MEM até o momento da lipofecção.

O DNA plasmidial, na concentração de 15µg, foi incubado com 60 µL de lipofectamina 2000 na presença de OPTI-MEM por um período de 25 minutos. Em seguida o complexo DNA-lipofectamina foi adicionado às células e estas foram mantidas em contato com essa solução por 6 horas. Ao final desse tempo foi acrescentado às células meio de cultura fresco com 10% de soro bovino fetal e as células foram mantidas em cultura. Após 72 horas, as células foram coletadas e submetidas a extração de RNA para verificar a redução da expressão gênica de *ANKHD1* transcritos variantes 2 e 3 e ao estudo de apoptose celular.

Estudo da apoptose celular

O estudo da apoptose foi realizado através da marcação das células 293 com anexina V (annexin V-FITC/BD PharMingen, CA, USA) e Iodeto de Propídio e (Propidium Iodide/Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) por citometria de fluxo. Células 293 submetidas à inibição de ANKHD1 transcritos 2 e 3 e controle negativo (5×10^5) foram submetidas a duas lavagens em tampão PBS e ressuspensas em 400 µL de tampão de ligação (10 mM Hepes pH=7,4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ e 1,8 mM CaCl₂). Foi adicionado 1 µg/mL de anexina V-FITC e as amostras foram incubadas durante 20 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Imediatamente antes da aquisição, foi adicionado 1 µL/mL de Iodeto de Propídio e 10000 eventos foram adquiridos. A apoptose também foi verificada através da marcação das células 293 com anticorpo anti caspase 3 ativada (Calbiochem). Foi adicionado 1 µL do anticorpo às células lavadas e as amostras foram incubadas por 1 hora em estufa de CO₂. Após esse período as células foram lavadas e foram adquiridos 10000 eventos no citômetro FACSCalibur (BD Bioscience). Os dados foram analisados utilizando-se o software CellQuest (BD Bioscience). As células positivas

para anexina V e negativas para PI e positivas para caspase 3 ativada, em relação ao número total de células, indicaram células 293 em processo de morte celular programada.

Análise Estatística

A comparação dos valores da quantidade relativa de expressão do RNAm de *ANKHD1* entre os pacientes com diagnóstico de Leucemias Agudas, Mielodisplasia, Mieloma Múltiplo e células hematopoéticas normais foi realizada através do teste estatístico de Mann-Whitney U. Valor de $P \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

1. Identificação e Caracterização do gene *ANKHDI* e de seus transcritos variantes “*in silico*”

Na tentativa de obter a seqüência completa do cDNA parcial da *EST RC3* (499pb) nós empregamos buscas de similaridade contra o banco de dados do genoma humano, no *NCBI*, e usamos as seqüências genômicas obtidas para buscar novas *ESTs* que pudessem pertencer ao mesmo transcrito. Foram encontradas 3 seqüências de cDNA de cerca de 2140pb com alta homologia a *EST RC3* (BC009420, NM_024668 e XM_015814).

Iniciadores foram desenhados, de acordo com as seqüências genômicas cobertas pela *EST* e pelas outras seqüências homólogas. Reações de PCR de cDNA de cérebro e da linhagem de células K562 e reações de seqüenciamento foram empregadas para validar a inclusão de novas seqüências ao transcrito. Também realizamos a técnica de *RACE 3'* para a determinação da extremidade 3' do RNAm. Usando esses procedimentos, obtivemos toda a seqüência codificadora do novo gene.(Figura 16)

A comparação entre a seqüência validada experimentalmente por nós e as seqüências de cDNA NM_024668 (inicialmente uma proteína hipotética FLJ20288 mas hoje denominada *ANKHDI* transcrito variante 3) e AF258557 (gene *PP2500*), seqüência depositada posteriormente, revelou uma identidade de 100%.

Observamos que as seqüências dos cDNAs de NM_024668 e AF258557 apresentam 100% de identidade entre si, tratando-se portanto de uma mesma seqüência com denominações e datas de depósito diferentes no banco de dados *GenBank*.

Nós podemos inferir que a seqüência por nós validada corresponde a seqüência do cDNA *ANKHDI* transcrito variante 3 (*PP2500*).

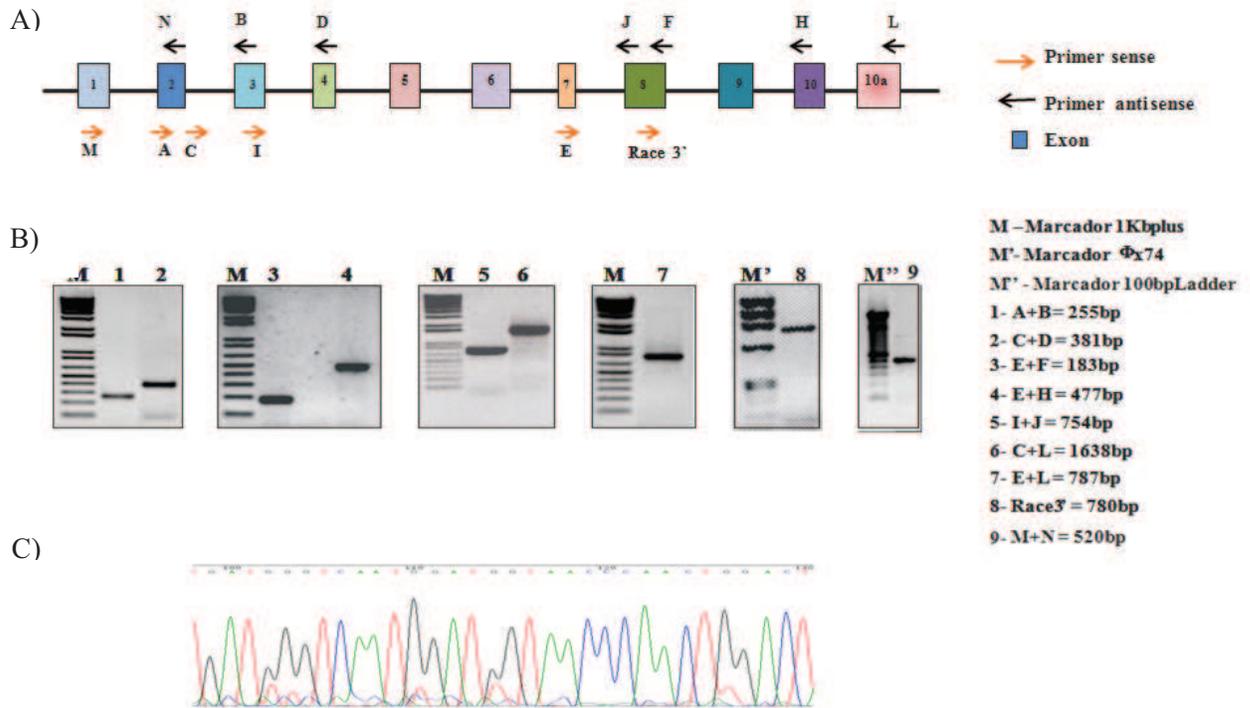


Figura 16: Validação por PCR e seqüenciamento das seqüências previstas pela análise computacional a partir do cDNA parcial da *EST RC3*. A seqüência obtida apresenta-se 100% homóloga as seqüências depositadas no Banco de Dados GeneBank como *ANKHDI* transcrito variante 3 e *PP2500*. **A)** Representação esquemática do conjunto de iniciadores desenhados para PCR ao longo de toda a seqüência prevista e para a obtenção da seqüência na extremidade 3' pelo método de *RACE*. As letras foram utilizadas para designar os iniciadores. **B)** Produtos amplificados por PCR obtidos da combinação do conjunto de iniciadores representados no esquema do item A. **C)** Representação de um eletroferograma obtido do seqüenciamento de uma das regiões previstas pela análise computacional.

Na análise “*in silico*”, identificamos a existência de outros transcritos com alta homologia à seqüência do gene *PP2500*, os genes *MASK* (AF521882) e *MASK-BP3* (*ARF*) (AF521883). Ambos os transcritos já foram descritos por Poulin e colaboradores (Poulin et al., 2003) em um estudo de expressão gênica. Neste estudo foi observado que o transcrito *MASK-BP3* (*ARF*) resultava da fusão do gene *EIF4EBP3* (AC005214) com o gene homólogo humano à *Mask* da *Drosophila melanogaster* (Smith et al., 2002). O produto da fusão foi inicialmente denominado *Human MASK-4E-Binding Protein 3 Alternative Reading Frame* (*hMASK-BP3*^{*ARF*}) e a seqüência sem fusão foi denominada *Human MASK* (*hMASK*). Posteriormente, uma nova seqüência, homóloga ao gene *PP2500*, foi depositada no banco de dados *GenBank* como *hMASK transcript variant 2* (NM_017978).

Baseando-se na nomenclatura de novos genes e proteínas aprovada pelo “*Gene Nomenclature Committee HUGO*” (Povey et al., 2001), a denominação *hMASK* foi substituída pela denominação *ANKHDI*.

A análise genômica baseada em bioinformática revelou que estes transcritos variantes codificam proteínas com repetições de anquirina e apresentam similaridade a um *contig* no braço longo do cromossomo 5 (banda 5q31.3): NT_029289.10.

Uma comparação realizada entre as seqüências de cDNA dos novos transcritos e a região do cromossomo 5 que os contém, sugere que a seqüência completa do gene *ANKHDI* variante 3 é de aproximadamente 2.164pb e composta por 11 éxons. O cDNA do gene *ANKHDI* variante 2 possui aproximadamente 2.149 pb, 11 éxons e uma deleção de 32 pb no éxon 3. A seqüência de cDNA da variante 1 é de aproximadamente 8.196 pb e possui no total 34 éxons. Na fusão da *ANKHDI variante 1* com o gene *EIF4EBP3* houve a perda do éxon 34 da *variante 1* e ganho dos exons 0, B e C do gene *EIF4EBP3*, gerando no total 36 éxons caracterizando o gene *ANKHDI- EIF4EBP3* que possui aproximadamente 8319 pb. A partir das observações foi possível estabelecer que o gene *ANKHDI* variante 3 possui alta homologia com os dez primeiros éxons das seqüências de *ANKHDI variante 1* e *ANKHDI- EIF4EBP3*, com exceção do éxon 10A que não se encontra presente nos transcritos maiores provavelmente pela ocorrência de uma clivagem alternativa do RNAm nesse éxon (Figura 17).

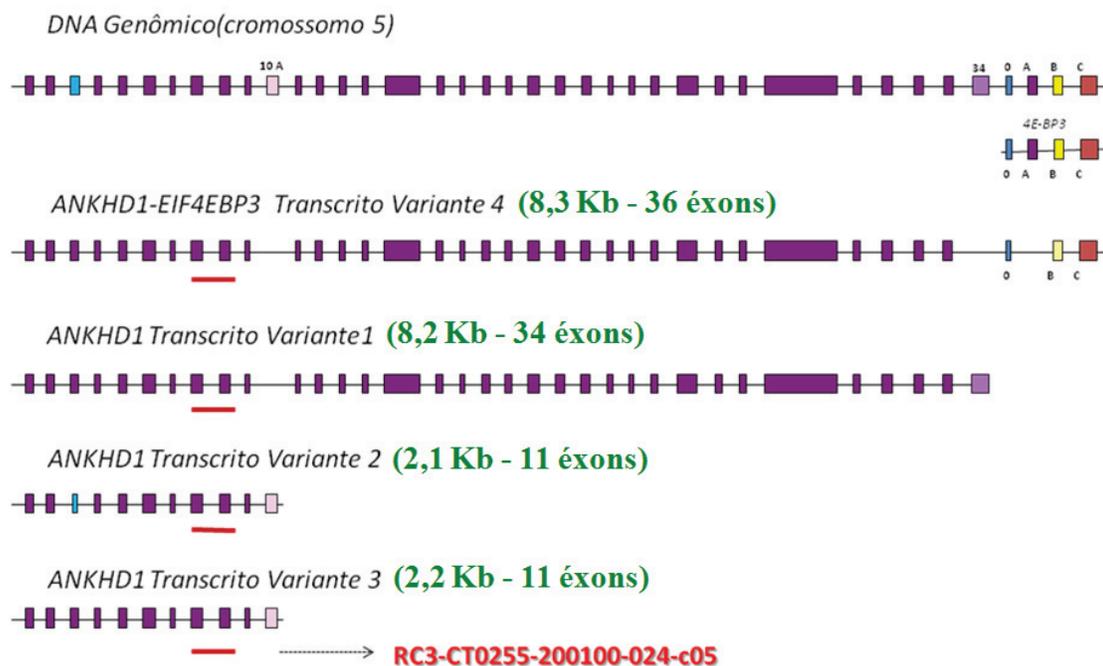


Figura 17: Representação esquemática da sequência genômica do gene *ANKHD1* localizado no cromossomo 5 (banda 5q31.3) e de seus transcritos variantes resultantes de clivagem alternativa. Os retângulos representam os éxons e as linhas representam os introns. O gene *EIF4EBP3*, contíguo ao gene *ANKHD1*, apresenta 4 éxons denominados 0, A, B e C. Na fusão do gene *ANKHD1* variante 1 com o gene *EIF4EBP3* houve a perda do éxon 34 de *ANKHD1*, que possui 34 éxons, e ganho dos éxons 0, B e C de *EIF4EBP3*, originando o transcrito *ANKHD1- EIF4EBP3* com 36 éxons. Os transcritos *ANKHD1* variantes 2 e 3 apresentam 11 éxons em comparação aos transcritos maiores, sendo os 10 primeiros éxons altamente homólogos, com exceção do éxon 3 da variante 2 que apresenta uma deleção de 32 pb e do éxon 10A que está ausente nos transcritos maiores. A sequência da *EST* RC3-CT0255-200100-024-c05 e sua homologia com os éxons 8 e 9 do gene *ANKHD1* e seus transcritos variantes está indicada no esquema.

O gene *ANKHD1* transcritos variantes 2 e 3 codificam proteínas com cerca de 619 e 627 aminoácidos respectivamente. Ambos polipeptídeos contêm 10 domínios de repetições de anquirina organizados em 2 blocos de quatro domínios e 1 bloco com 2 domínios. A *ANKHD1* variante 1 codifica uma proteína com 2542 aminoácidos que compreende 20 domínios de repetições de anquirina organizadas em 5 blocos de 4 repetições e um domínio KH na porção C terminal. O gene *ANKHD1- EIF4EBP3* codifica uma proteína com 2617 aminoácidos. Os 2523 primeiros resíduos são idênticos aos da *ANKHD1* variante 1. Os 94 últimos resíduos resultam da tradução dos éxons 0, B e C. O domínio KH foi inicialmente descrito em proteínas com capacidade de interagir com ácidos nucleicos (Gibson et AL., 1993) (Figura 18).

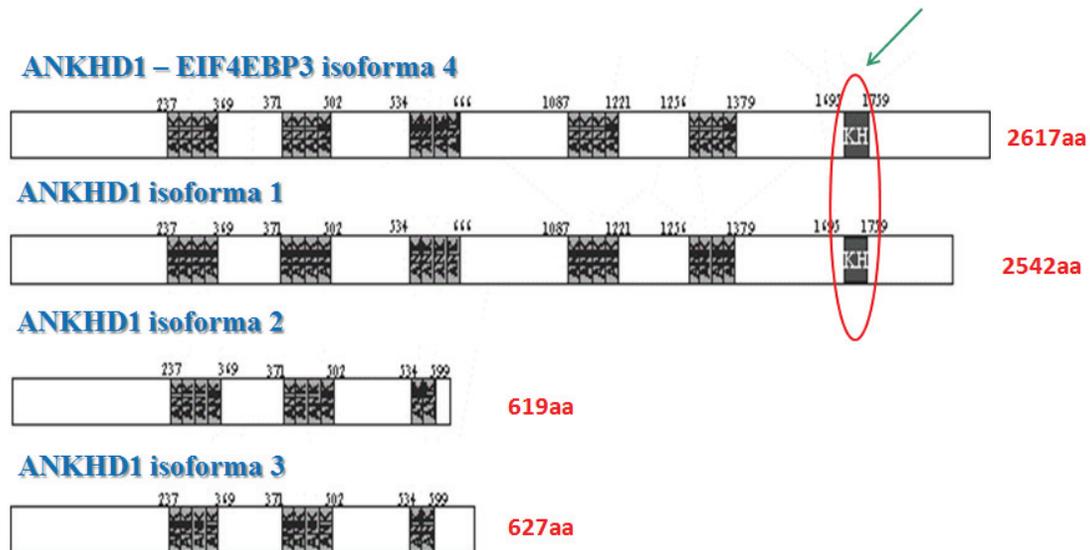


Figura 18: Representação esquemática da estrutura proteica primária de ANKHD1 e suas isoformas. As isoformas 1 (2542aa) e EIF4EBP3 (2617) apresentam 20 domínios de anquirina (indicada como ANK) organizadas em 5 blocos de 4 domínios e mais um domínio KH na porção C terminal. As isoformas 2 (619aa) e 3 (627aa) apresentam 10 domínios de anquirina organizadas em 2 blocos de 4 domínios e 1 bloco de 2 domínios mas o domínio KH se encontra ausente. Os 10 primeiros domínios de anquirina são altamente homólogos nas 4 isoformas de ANKHD1. A posição de cada domínio (numeração descrita na parte superior) estão indicados no esquema.

Utilizando programas computacionais de predição gênica, que são desenvolvidos para reconhecer padrões na estrutura gênica, como regiões codificantes e seqüências sinalizadoras (promotores, códons de início e parada de síntese de RNA, sítios de clivagem, sítios de ligação a fatores de transcrição, sinais de poliadenilação entre muitos outros sinais), observamos a localização de possíveis sítios doadores de clivagem alternativa em vários éxons dos transcritos de *ANKHDI*, uma explicação bastante razoável para a presença de vários transcritos de um mesmo gene (Figura 19).

***** NetGene2 v. 2.4 *****

The sequence: ANKHD1 transcription variant 3 has the following composition:

Length: 2164 nucleotides.

27.4% A, 20.2% C, 28.6% G, 23.8% T, 0.0% X, 48.8% G+C

Donor splice sites, direct strand

	pos 5'→3'	phase	strand	confidence	5'	exon	intron	3'
éxon 3	612	1	+	0.42	ACTGCTGATG	^	GTAAGCTTT	
éxon 10A	1964	0	+	0.96	CAAGCATCAG	^	GTGAGGGTGG	H
éxon 10A	2018	0	+	0.36	GATGTTGTAG	^	GTAACCAGAA	

The sequence: ANKHD1 transcription variant 1 has the following composition:

Length: 8196 nucleotides.

29.3% A, 22.4% C, 23.2% G, 25.1% T, 0.0% X, 45.6% G+C

Donor splice sites, direct strand

	pos 5'→3'	phase	strand	confidence	5'	exon	intron	3'
éxon 3	612	1	+	0.42	ACTGCTGATG	^	GTAAGCTTT	
éxon 15	2709	1	+	0.67	GAAACCAAAG	^	GTCAGAAAGA	
éxon 15	2991	1	+	0.34	AAAGTATCAG	^	GTAATCAGCA	
éxon 16	3131	0	+	0.83	GATAGCAGCT	^	GTGAGTACCA	
éxon 21	3842	0	+	0.88	AGCAGAAGTA	^	GTGAGTTTGC	
éxon 21	3928	2	+	0.65	CTTCTGGAGG	^	GTATGCAGAG	
éxon 27	5073	1	+	0.55	CRACTTGAAG	^	GTGAAGTGAC	
éxon 32	7365	1	+	0.36	GGCTTATCAG	^	GTGGTCGCA	

The sequence: ANKHD1-EIF4EBP3 has the following composition:

Length: 8319 nucleotides.

28.8% A, 23.5% C, 23.6% G, 24.2% T, 0.0% X, 47.0% G+C

Donor splice sites, direct strand

	pos 5'→3'	phase	strand	confidence	5'	exon	intron	3'
éxon 3	612	1	+	0.42	ACTGCTGATG	^	GTAAGCTTT	
éxon 15	2709	1	+	0.67	GAAACCAAAG	^	GTCAGAAAGA	
éxon 15	2991	1	+	0.34	AAAGTATCAG	^	GTAATCAGCA	
éxon 16	3131	0	+	0.83	GATAGCAGCT	^	GTGAGTACCA	
éxon 21	3842	0	+	0.88	AGCAGAAGTA	^	GTGAGTTTGC	
éxon 21	3928	2	+	0.65	CTTCTGGAGG	^	GTATGCAGAG	
éxon 27	5073	1	+	0.55	CRACTTGAAG	^	GTGAAGTGAC	
éxon 32	7365	1	+	0.36	GGCTTATCAG	^	GTGGTCGCA	
éxon 36 (C)	8278	1	+	0.00	GGGGAATGGA	^	GTAAGTCACC	

Figura 19: Esquema representando os resultados da análise de possíveis sítios de clivagem alternativa na região codificante do gene ANKHD1 e seus transcritos variantes. Foram encontrados vários possíveis sítios doadores de clivagem em diversos éxons destes transcritos, o que explicaria a diversidade dos produtos gênicos.

Além da região codificante foi possível prever a localização de uma região promotora com importantes sinais reguladores de expressão gênica como o TATA box, domínios de ligação a um importante fator de transcrição denominado *GATA-1* e a presença de sequências ricas no dinucleotídeo CG denominadas ilhas CpG, estruturas muito importantes envolvidas no controle de expressão gênica (Figuras 20 e 21).

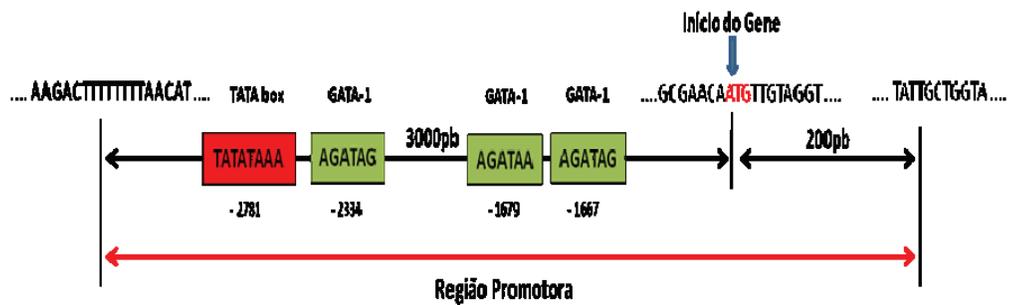


Figura 20: Esquema representativo da possível região promotora do gene *ANKHD1*. Para a análise da presença dos elementos regulatórios, foi selecionada uma sequência de 3000pb a montante e 200pb a jusante do primeiro ATG do gene (início do gene). Foram utilizados programas computacionais de predição e por meio deles foi possível determinar sítios de ligação a vários fatores de transcrição destacando-se o fator de transcrição *GATA-1*, muito importante na hematopoese, bem como sequências regulatórias como o *TATA* box, importante na regulação da expressão gênica.

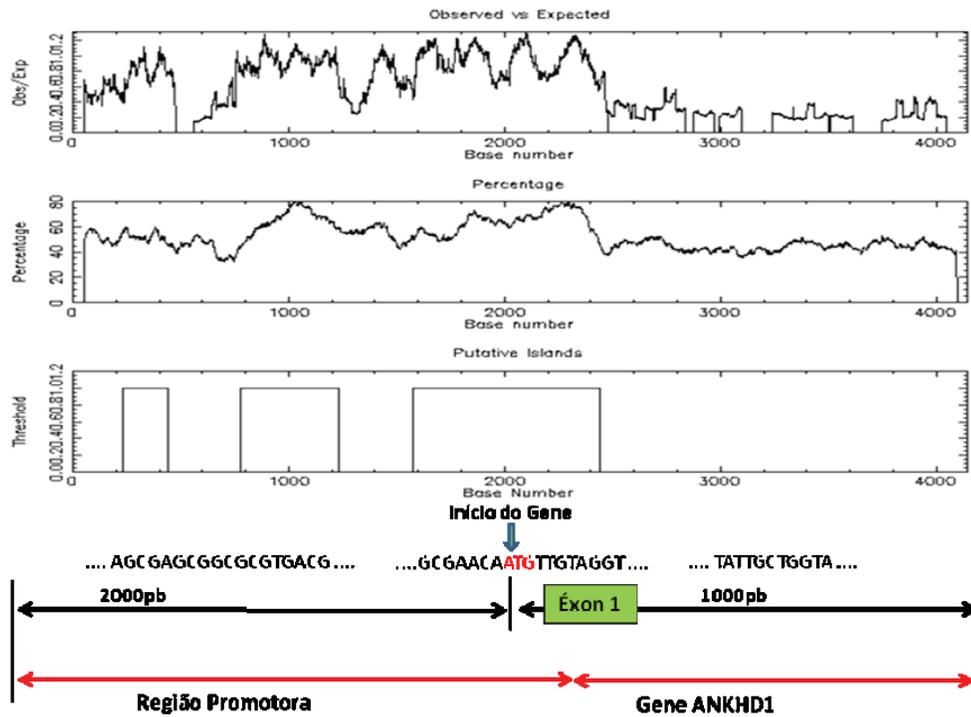


Figura 21: Esquema representativo da localização das regiões ricas em CG denominadas ilhas CpG. Para análise foi selecionada uma sequência de 2000pb a montante e 1000pb a jusante do primeiro ATG (início do gene) e verificamos a presença de 3 ilhas CpG. Parte da maior ilha (862pb) se localiza no primeiro éxon do gene *ANKHD1* e se estende até a região promotora e as demais ilhas (455pb e 206pb) estão presentes totalmente na região promotora. As ilhas CpG participam da regulação de genes por meio do padrão de metilação que os resíduos de citosina apresentam.

2. Análise da expressão gênica de *ANKHD1* e de seus transcritos variantes por meio das técnicas de *Northern Blotting* e qRT-PCR em células normais e neoplásicas

Para avaliar o grau de expressão do gene *ANKHD1* em linhagens de células neoplásicas (representativas de leucemias aguda e tumores sólidos), foi utilizada uma seqüência de 963 pb, comum as variantes 1 e 4, como sonda de hibridização na técnica de *northern blotting* e que identificou um RNAm de aproximadamente 8,2Kb em todas as linhagens testadas mas com uma menor expressão nas linhagens hematopoiéticas Jurkat e U937 (Figura 22).

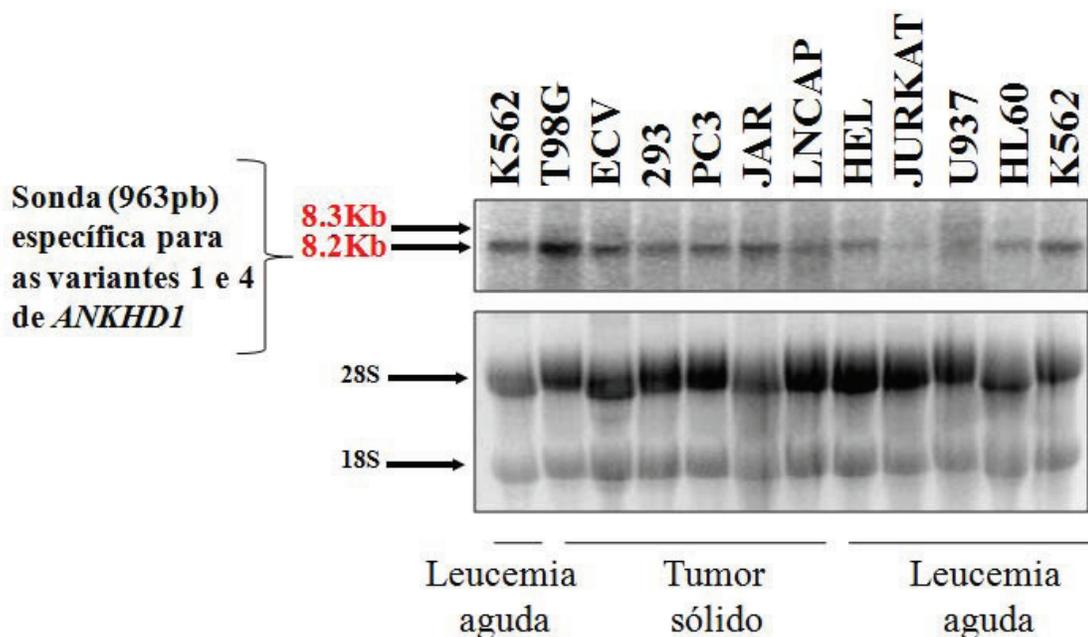


Figura 22: Análise da expressão do RNAm dos transcritos 1 e 4 do gene *ANKHD1* por *Northern blotting* em linhagens de células leucêmicas e de tumores sólidos. Foi utilizada como sonda uma seqüência de 963pb, região comum aos transcritos *ANKHD1* variante 1 e *ANKHD1-EIF4EBP3* variante 4. A sonda localizou um RNAm de 8,2 Kb e um de 8,3 Kb em todas as linhagens analisadas, correspondentes as seqüências completas depositadas dos dois transcritos, mas com uma menor expressão nas linhagens Jurkat e U937.

Com a intenção de verificar se o padrão de expressão observado em linhagens neoplásicas se repetia em tecidos normais, foram realizados ensaios de qRT-PCR, utilizando-se amostras de tecidos normais obtidos por biopsia. Os resultados, ilustrados na Figura 23, mostram que o gene *ANKHD1* e seus transcritos variantes estão presentes em todos os tecidos normais analisados em comparação com células mononucleares obtidas de medula óssea normal mas não apresentam diferença significativa de expressão entre os tecidos com exceção do intestino normal e linfonodo.

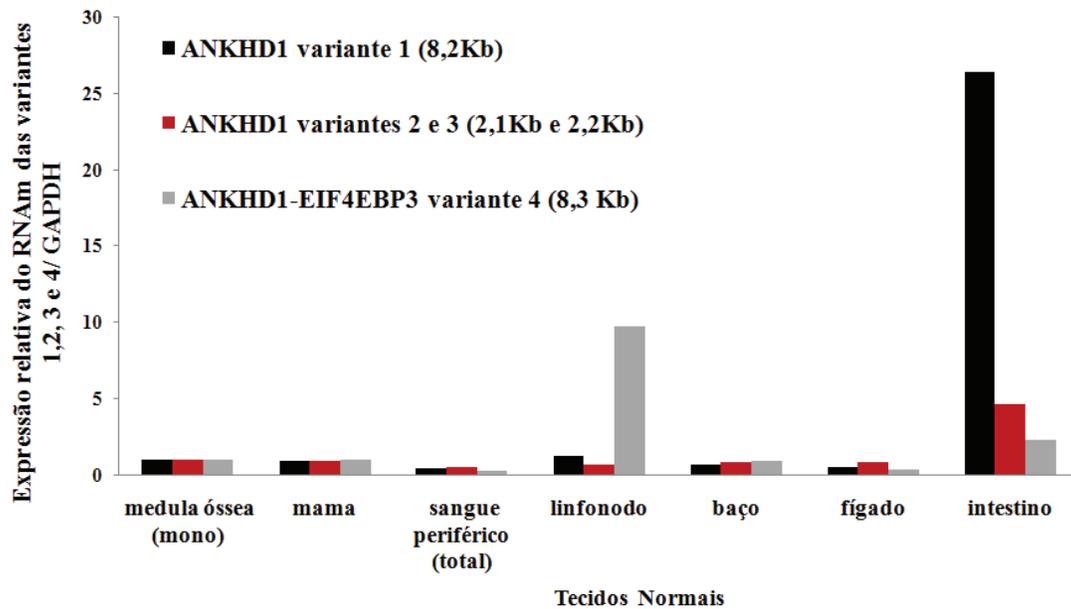


Figura 23: Expressão do RNAm de *ANKHD1* e seus transcritos variantes em tecidos normais. O qRT-PCR foi realizado a partir de cDNA de diferentes tecidos normais provenientes de biopsia. Os resultados da expressão foram obtidos após normalização da reação com o controle endógeno *GAPDH* e comparação com células mononucleares de medula óssea normal. Todos os transcritos se encontram expressos nos diferentes tecidos em níveis semelhantes, com exceção da maior expressão observada de *ANKHD1* variante 1 no intestino e *ANKHD1-EIF4EBP3* variante 4 em linfonodo.

3. Análise da expressão gênica de *ANKHD1* e de seus transcritos variantes durante o processo de diferenciação celular

Para verificar um possível envolvimento do gene *ANKHD1* com o processo de diferenciação celular, utilizamos dois sistemas hematopoéticos como modelo de estudo e por meio do método de qRT-PCR avaliamos o perfil de expressão deste gene e seus transcritos durante o processo.

A. Diferenciação Celular Mielóide

Utilizamos nesse modelo de estudo a linhagem de células promielocítica HL60 e como indutor da diferenciação celular o ácido trans retinóico (ATRA). Amostras de células foram coletadas antes da adição de ATRA para comparação. Após 6 dias de tratamento, as células HL60 foram coletadas para análise da expressão gênica e caracterização da diferenciação celular com base na análise morfológica por microscopia convencional e análise dos antígenos de superfície celular CD14 e CD15 por citometria de fluxo. Ao final da diferenciação celular observamos a presença de células com fenótipo semelhante a neutrófilos e 70% das células com marcação CD15⁺, antígeno de superfície fortemente expresso por neutrófilos, indicando a eficácia do modelo de estudo. A análise do RNAm demonstrou um aumento nos níveis de expressão do gene *ANKHD1* variantes 1,2, 3 e 4 de cerca de 4 vezes durante a diferenciação celular mielóide (Figura 24).

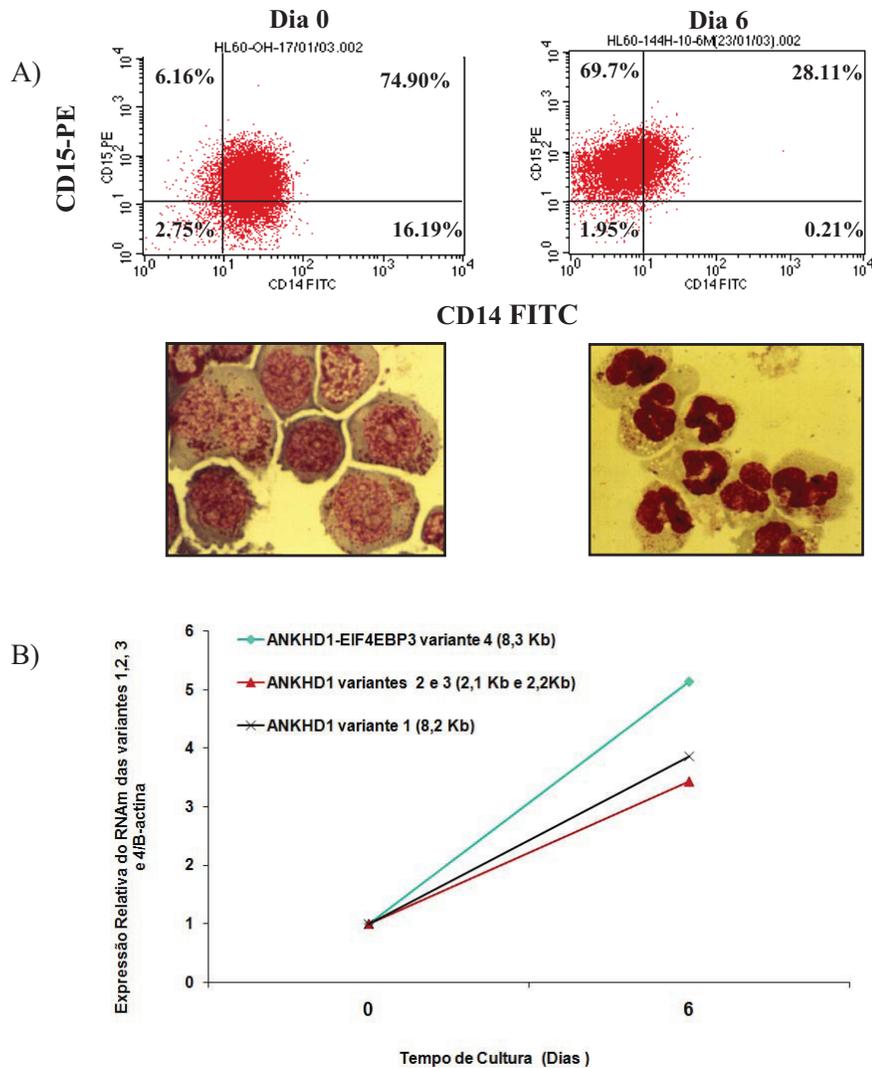


Figura 24: Caracterização da diferenciação celular mielóide, com base na morfologia (microscopia convencional) e no padrão de expressão dos antígenos CD14 e CD15 (citometria de fluxo). **A)** Após a adição de ATRA, e ao final de 6 dias, observamos células com fenótipo de neutrófilos, e a maior parte delas expressando o antígeno CD15, característico de neutrófilos, o que caracteriza o final da maturação da linhagem mielóide nesse modelo de estudo. **B)** Gráfico representando os resultados obtidos da análise de expressão gênica por qRT-PCR durante a diferenciação celular mielóide. Observamos que ao longo da diferenciação, com o amadurecimento das células HL60, houve um aumento da expressão do RNAm das variantes do gene *ANKHD1*, destacando-se a *ANKHD1* variante 1 (*hMASK*) com uma expressão de cerca de 5 vezes ao final da diferenciação.

B. Diferenciação Celular Eritróide

O sistema de cultura líquida em duas fases (Fibach et al., 1989) foi utilizado como modelo de indução da diferenciação celular eritróide. Na primeira fase, células mononucleares do sangue periférico de doadores saudáveis foram cultivadas na presença de sobrenadante de células 5637, rico em fatores de crescimento hematopoéticos, promovendo a proliferação de células progenitoras e na segunda fase, estas células foram cultivadas somente na presença do fator de crescimento e de diferenciação eritróide, a eritropoietina (EPO).

Após a adição da EPO, amostras de células foram coletadas para avaliação da expressão gênica e da diferenciação celular eritróide com base na análise morfológica por microscopia convencional e análise dos marcadores de superfície celular Glicoforina A (GPA) e Receptor de Transferrina (CD71) por citometria de fluxo. Ao final da diferenciação celular observamos a presença de células na fase final da diferenciação eritróide, até mesmo células extrusando o núcleo e 80% das células com marcação GPA⁺ e CD71⁺, antígeno de superfície fortemente expresso por células da linhagem eritróide, indicando a eficácia do modelo de estudo. A análise do RNAm demonstrou um aumento nos níveis de expressão do gene *ANKHDI* variantes 1 e 4 de cerca de 2 vezes e da variante 3 de cerca de 7 vezes durante a diferenciação celular eritróide (Figura 25A e Figura 25B).

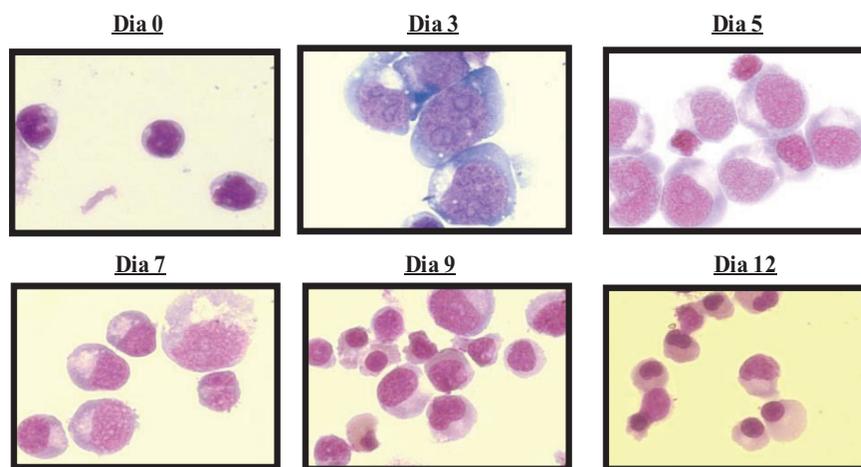
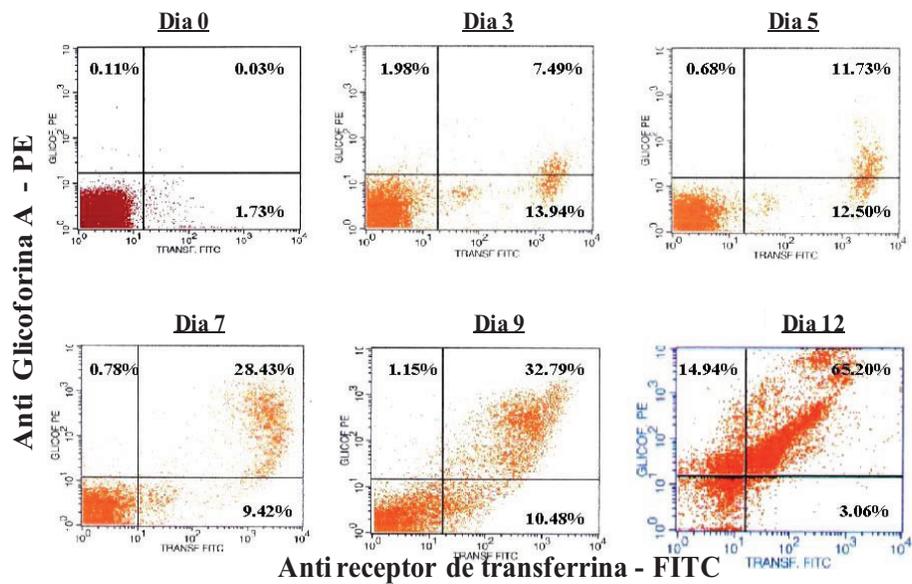


Figura 25A: Caracterização da diferenciação celular eritróide, com base na morfologia (microscopia convencional) e no padrão de expressão dos antígenos receptor de transferrina e Glicoforina A (citometria de fluxo). Após a adição de Epo, observamos eritroblastos em diferentes fases da diferenciação, desde proeritroblastos até eritroblastos ortocromáticos, e ao final de 12 dias, células em fase de extrusão do núcleo, e a maior parte expressando os antígenos receptor de transferrina e Glicoforina A, o que caracteriza o final da maturação da linhagem eritróide.

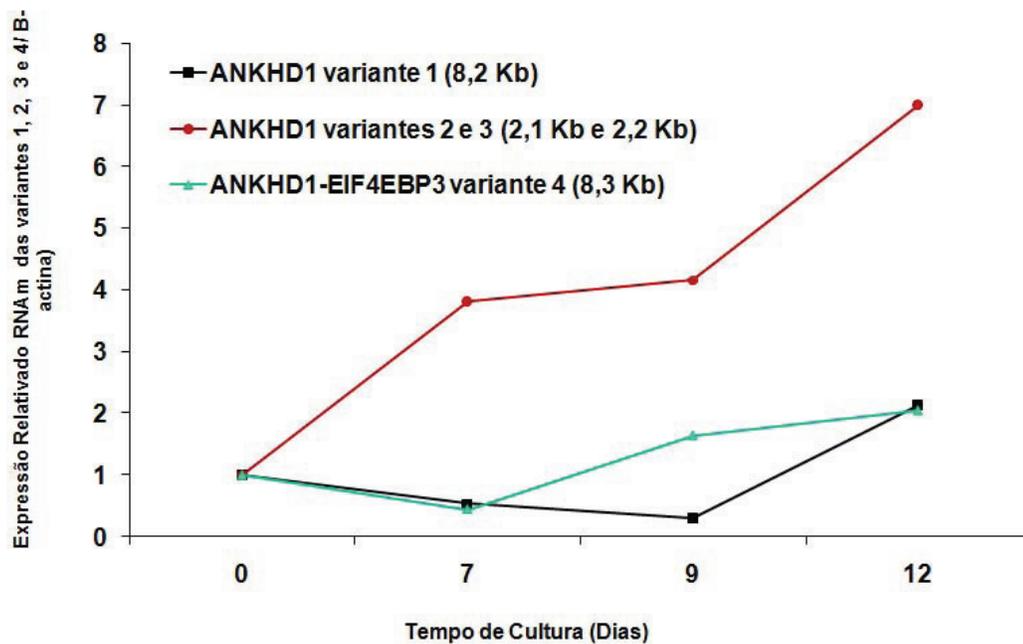


Figura 25B: Caracterização da diferenciação celular eritróide, com base na morfologia (microscopia convencional) e no padrão de expressão dos antígenos receptor de transferrina e Glicoforina A (citometria de fluxo). Gráfico representando os resultados obtidos da análise de expressão gênica por qRT-PCR durante a diferenciação celular eritróide. Observamos que ao longo da diferenciação, com o amadurecimento das células eritróide, houve um aumento da expressão do RNAm das variantes do gene *ANKHD1*, destacando-se a *ANKHD1* variantes 2 e 3 com uma expressão de cerca de 7 vezes ao final da diferenciação.

4. Análise da expressão gênica de *ANKHD1* e de seus transcritos variantes durante o processo de proliferação celular

Para verificar um possível envolvimento do gene *ANKHD1* com o processo de proliferação celular, foi utilizado como modelo de estudo células mononucleares de sangue periférico de doadores saudáveis e como indutor da proliferação o agente mitogênico fitohemaglutinina (PHA) e por meio do método de qRT-PCR foi avaliado o perfil de expressão deste gene e seus transcritos durante o processo. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer (Figura 26).

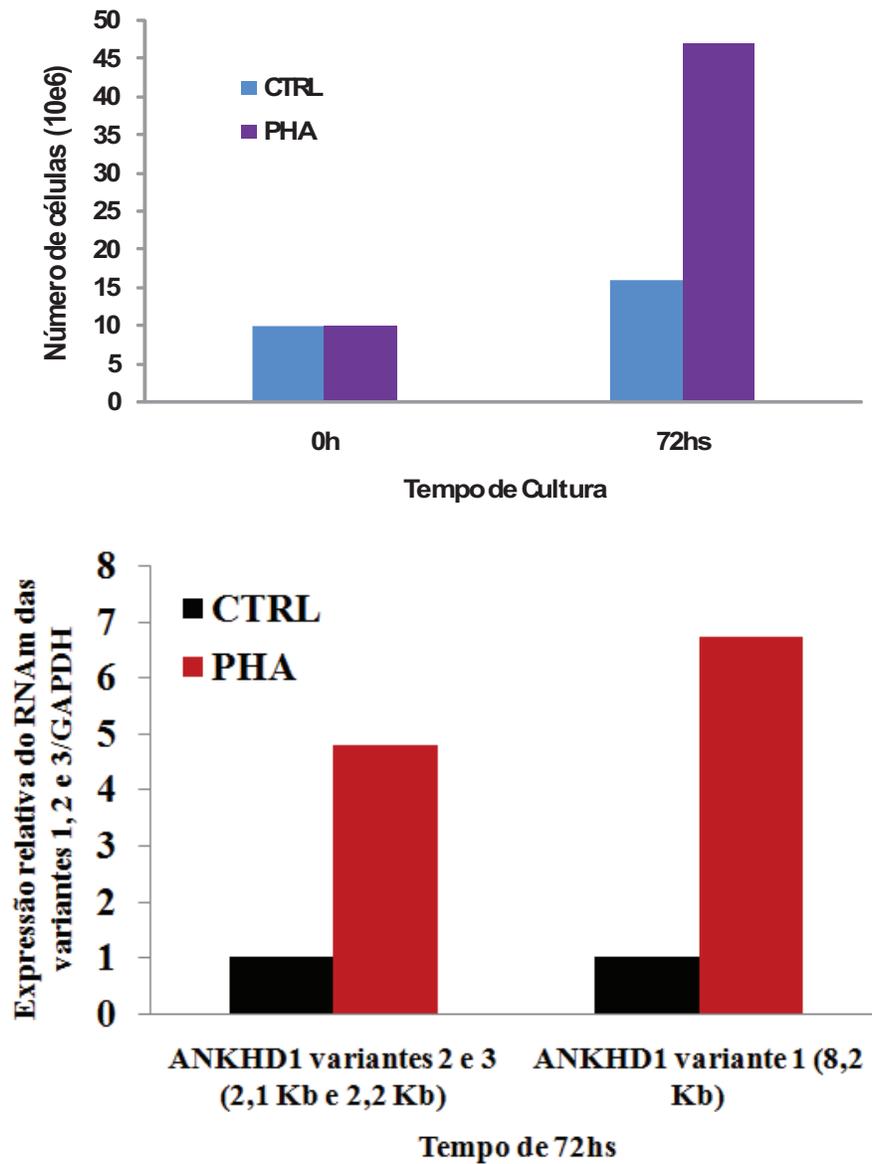


Figura 26: Proliferação de linfócitos humanos sob estímulo do mitógeno Fitohemaglutinina (PHA). **A)** Após 72 hs de cultivo, células com e sem PHA foram coletadas e quantificadas em câmara de Neubauer. **B)** A análise da expressão foi realizada nos linfócitos normais ativados por qRT-PCR e verificamos o aumento de cerca 6 vezes do gene *ANKHD1* variantes 1, 2 e 3 ao final de 72 horas em comparação com os linfócitos não ativados.

5. Indução da apoptose celular em linhagem de células leucêmica e análise da expressão gênica de *ANKHD1* e de seus transcritos variantes

Com o objetivo de avaliar se o gene *ANKHD1* e seus transcritos variantes estão envolvidos no processo de apoptose celular, a linhagem de células leucêmica KG1 foi tratada com o agente oxidante t-butil hidroxi-peróxido (t-BOOH) e por meio do método de qRT-PCR foi avaliado o perfil de expressão deste gene e seus transcritos durante o processo (Figura 27).

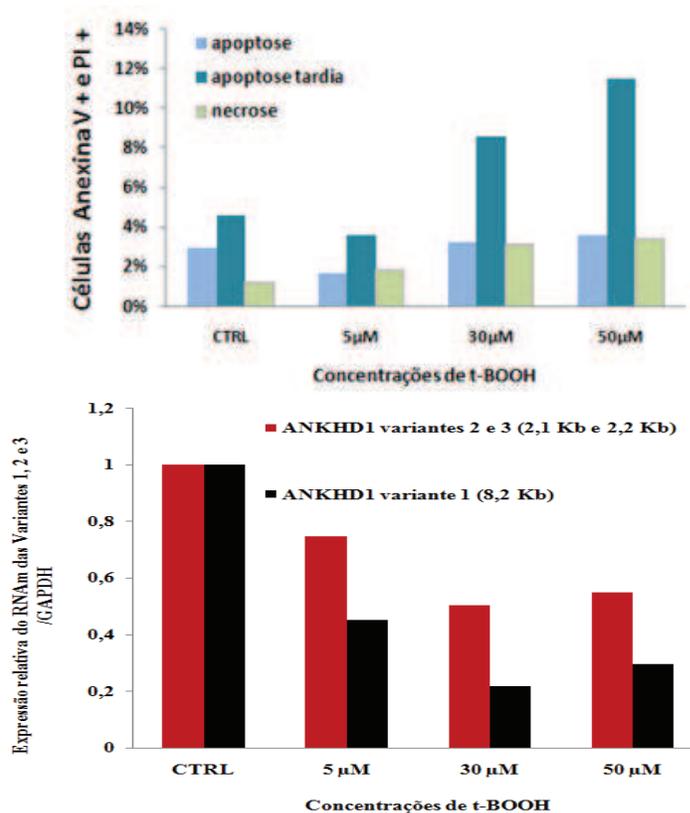
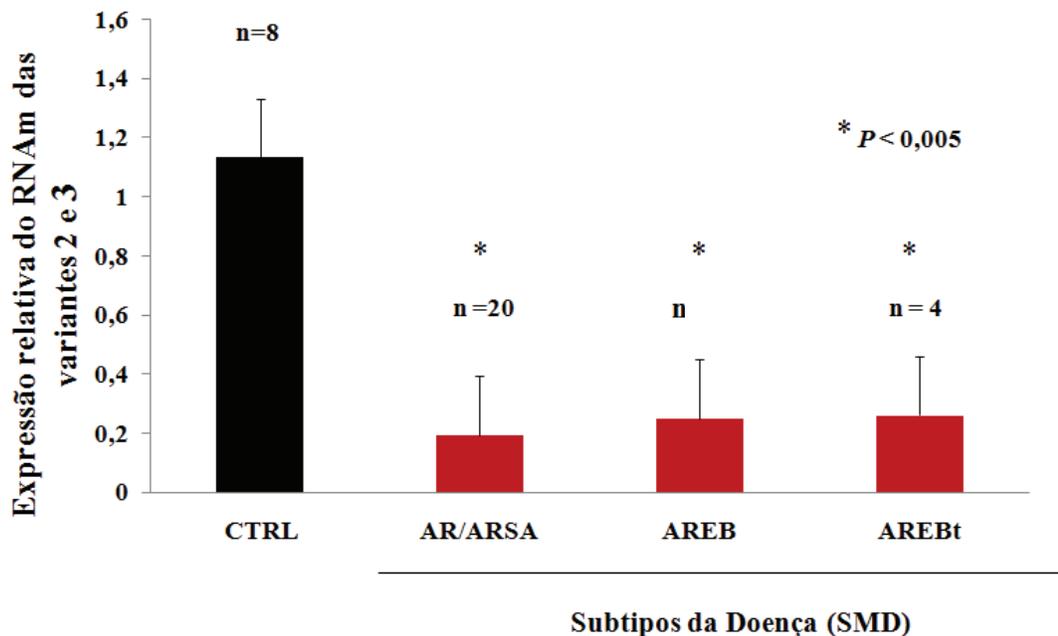


Figura 27: Determinação do grau de apoptose induzida por t-BOOH na linhagem de células KG1. A) As células foram tratadas com diferentes concentrações de t-BOOH por um período de 2 horas e a apoptose foi analisada por ANEXINA V e PI através de citometria de fluxo. Observamos um aumento progressivo nos níveis de apoptose concomitante ao aumento da concentração do oxidante. **B)** A expressão do gene *ANKHD1* transcritos variantes 1,2 e 3 apresenta uma diminuição inversamente proporcional ao aumento dos níveis de apoptose.

6. Perfil da expressão gênica de *ANKHDI* e de seus transcritos variantes em neoplasias hematológicas

A. *ANKHDI* variantes 2 e 3 estão sub expressas em Síndrome Mielodisplásica (SMD)

O RNAm de *ANKHDI* esteve sub expresso em amostras de medula óssea de pacientes com diagnóstico de SMD, quando comparado à expressão em células hematopoéticas normais. Essa diferença de expressão foi estatisticamente significativa nas várias categorias da doença ($P < 0.005$) (Figura 28).



* P comparado ao CTRL (medula óssea normal)

Figura 28: Expressão do RNAm de *ANKHDI* transcritos variantes 2 e 3 em células de pacientes com diagnóstico de SMD. qRT-PCR foi realizado a partir de cDNA de sangue total de medula óssea de pacientes com SMD (n= 34) ou de células totais de medula óssea de indivíduos normais (n=8). Observou-se uma menor expressão das variantes 2 e 3, estatisticamente significativa, nas amostras de SMD em relação as células hematopoéticas normais.

B. Expressão de *ANKHDI* transcritos variantes 2 e 3 em células CD34⁺ de pacientes com SMD durante a diferenciação eritróide

Com o objetivo de investigar mais profundamente a expressão do gene *ANKHDI* variantes 2 e 3 na Mielodisplasia, foram separadas as células CD34⁺ da medula óssea de pacientes do subtipo AR (anemia refratária) e utilizando um sistema de cultura adaptado para células de difícil crescimento, foram obtidas células viáveis para análises do perfil de diferenciação eritróide (Figura 29) e estudo de expressão gênica (Figura 30).

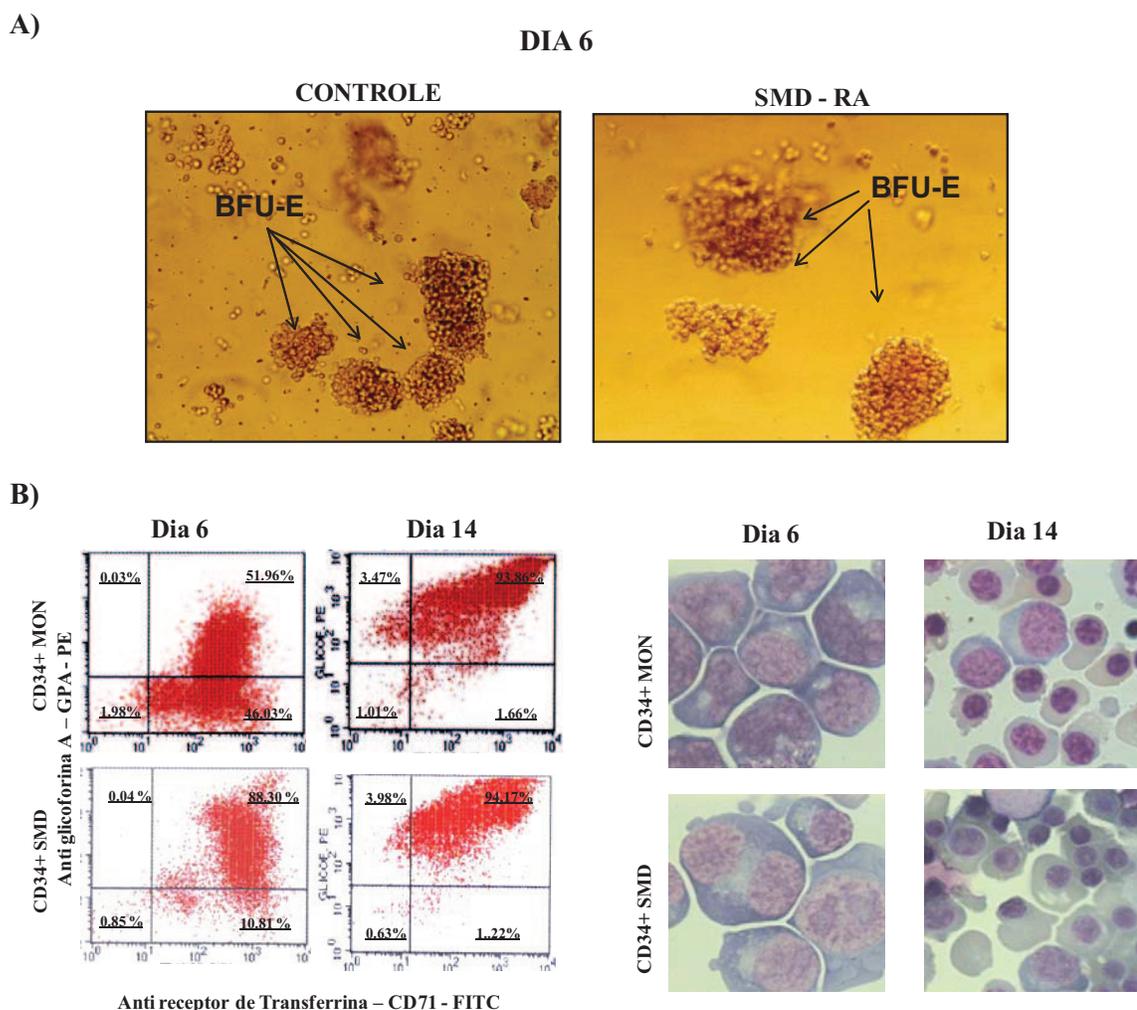
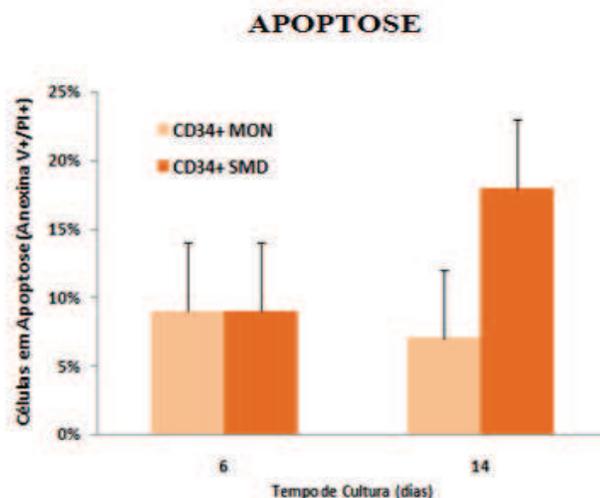


Figura 29: Amostras de medula óssea de doadores saudáveis e de pacientes com diagnóstico de SMD do subtipo AR foram coletadas e da fração de células mononucleares obteve-se células CD34⁺. **A)** Estas células foram cultivadas em metilcelulose com fatores de crescimento adequados e ao final de 6 dias foi observada a expansão dos progenitores eritróides e a formação de colônias BFU-E, CFU-E. **B)** Estas células foram mantidas em cultura líquida por mais 8 dias e durante esse período foram coletadas amostras de células para a caracterização da diferenciação eritróide, expressão gênica e análise da apoptose. Não houve diferença significativa no padrão de expressão dos marcadores de superfície celular, receptor de transferrina e glicoforina A, entre as células eritróides maduras dos doadores saudáveis e dos pacientes. Ambos apresentaram o mesmo padrão morfológico ao final da diferenciação eritróide com a presença de eritroblastos ortocromáticos e células em fase de extrusão nuclear.

A)



B)

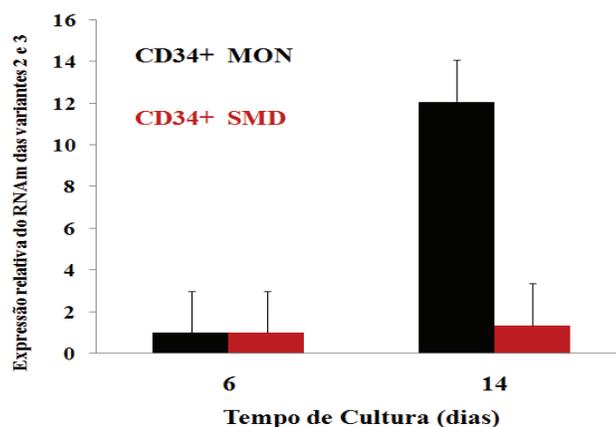


Figura 30: Análise da apoptose e expressão de *ANKHD1* variantes 2 e 3 em células CD34⁺ de doadores normais e pacientes com SMD nos dias 6 e 14 da diferenciação eritróide. **A)** A cultura de células normais apresentou 9,5% de células em apoptose no dia 6 e 7,2% no dia 14, enquanto a cultura de SMD apresentou 9% no dia 6 e 18% no dia 14. **B)** A expressão das variantes 2 e 3 de *ANKHD1* aumentou cerca de 12 vezes durante a diferenciação eritróide de células CD34⁺ de medula óssea de doadores normais como já havíamos observado nos primeiros experimentos. No entanto, o mesmo não foi observado nas células CD34⁺ dos pacientes com SMD. A expressão das variantes 2 e 3 foi muito menor se comparado com a expressão nas células CD34⁺ normais. A menor expressão do gene *ANKHD1* variantes 2 e 3 em SMD parece estar de alguma forma relacionada com os níveis aumentados de apoptose observado ao final da diferenciação eritróide.

C. Modulação da expressão do fator de transcrição *GATA-1* em células CD34⁺ de pacientes com SMD durante a diferenciação eritróide

Em razão de *GATA-1* ser um dos fatores de transcrição mais importantes na hematopoese, estar fortemente relacionado à diferenciação eritróide terminal e de *ANKHDI* apresentar em sua região promotora, de acordo com as análises *in silico*, sítios de ligação a esse fator de transcrição, foi verificada a expressão de *GATA-1* durante a diferenciação eritróide das células CD34⁺ de doadores normais e de pacientes com SMD e uma possível relação com a expressão do gene *ANKHDI* variantes 2 e 3(Figura 31).

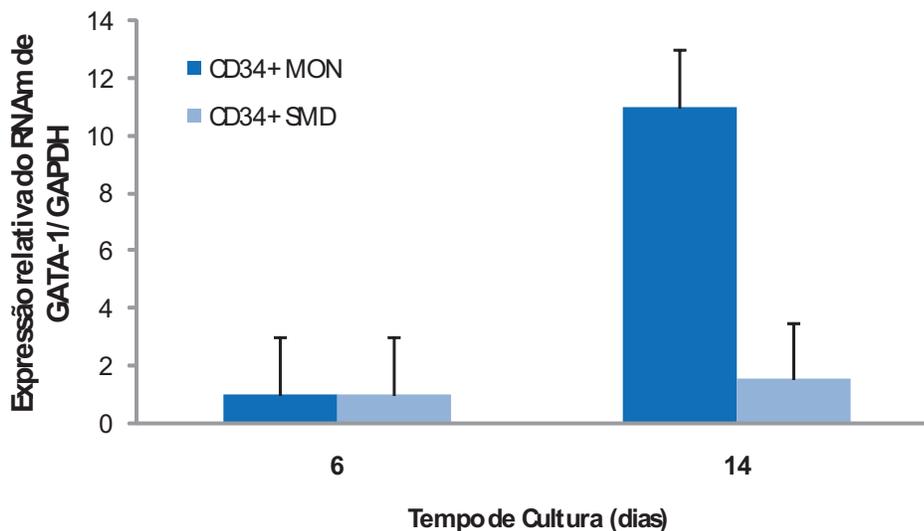


Figura 31: Análise da expressão do gene *GATA-1* durante a diferenciação eritróide de células CD34⁺ de doadores de medula óssea normais e de pacientes diagnosticados com SMD por qRT-PCR. Foi observado que durante a diferenciação eritróide, na fase terminal, das células CD34⁺ normais, houve um aumento da expressão do RNAm de *GATA-1* muito semelhante ao aumento de expressão de *ANKHDI* variantes 2 e 3. A expressão do fator *GATA-1* não sofreu modulação durante a diferenciação eritróide nas células dos pacientes com SMD, apresentando um mesmo nível durante todo o processo, como foi observado em relação a *ANKHDI* variantes 2 e 3.

D. Análise do efeito da Decitabina (DAC), um inibidor da metilação, sobre a expressão do gene *ANKHDI* variantes 2 e 3 durante a diferenciação eritróide de células CD34⁺ e em células mononucleares de pacientes com SMD

A hipoexpressão de *ANKHDI* variante 3 observada em amostras de medula óssea total de pacientes com SMD, a hipoexpressão durante a diferenciação eritróide de células CD34⁺ desses mesmos pacientes e a presença de ilhas CpG na região promotora do gene *ANKHDI*, direcionou a avaliação da expressão deste gene sob o efeito da inibição da metilação exercida pelo agente decitabina, utilizado na terapêutica de algumas doenças (Figura 32).

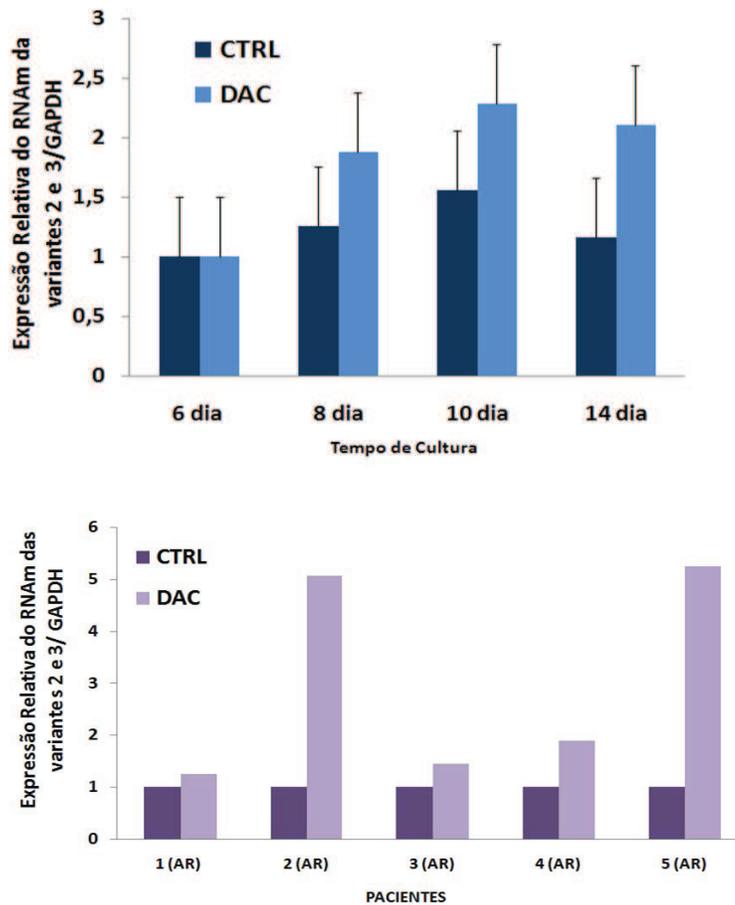


Figura 32: Análise da expressão do gene *ANKHD1* variantes 2 e 3 em células de paciente com SMD submetidas a tratamento com decitabina. **A)** Células CD34⁺ de pacientes com SMD foram tratadas com 5uM de DAC durante a diferenciação eritróide e amostras de células foram coletadas em vários pontos da cultura. Houve aumento da expressão das variantes 2 e 3 nas amostras tratadas com DAC em comparação com a mesma amostra não tratada. **B)** Células mononucleares de pacientes com SMD foram tratadas em cultura com DAC por 3 dias. Observamos um aumento variado na expressão do gene *ANKHD1* variante 3 nas amostras tratadas com DAC em relação aos seus respectivos controles.

E. *ANKHD1* transcritos variantes 2 e 3 estão hiperexpresso em Leucemias Agudas

O RNAm de *ANKHD1* variantes 2 e 3 está hiperexpresso em amostras de medula óssea de pacientes com diagnóstico de LMA, quando comparada à expressão em células hematopoéticas normais. Essa diferença de expressão é estatisticamente significativa nesta neoplasia hematológica ($P = 0.048$) (Figura 33).

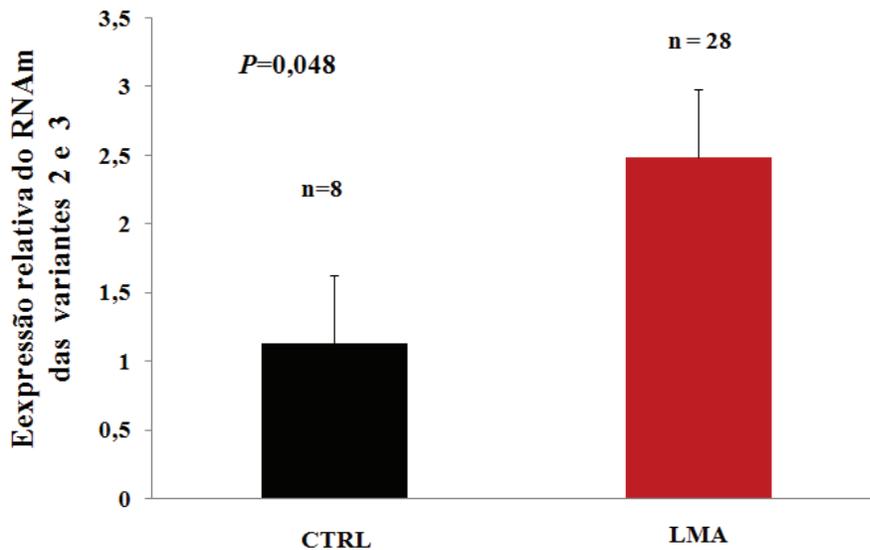


Figura 33: Aumento da expressão do gene *ANKHD1* variantes 2 e 3 em células leucêmicas. A quantificação da expressão foi realizada por RT-PCR em tempo real em amostras de medula óssea total de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda. Foram analisadas 28 amostras de pacientes e 8 amostras de doadores de medula óssea normal. A diferença na expressão foi considerada estatisticamente significativa ($P=0.048$).

F. *ANKHDI* transcritos variantes 2 e 3 estão hiperexpresso em Linhagens de Células de Mieloma Múltiplo (MM)

Por tratar-se de uma neoplasia hematológica caracterizada pela proliferação anormal de plasmócitos e ativação de mecanismos anti-apoptóticos nessas células, foi investigado o padrão de expressão do gene *ANKHDI* e seus transcritos variantes, inicialmente em linhagens de células representativas de Mieloma Múltiplo (MM) (Figura 34).

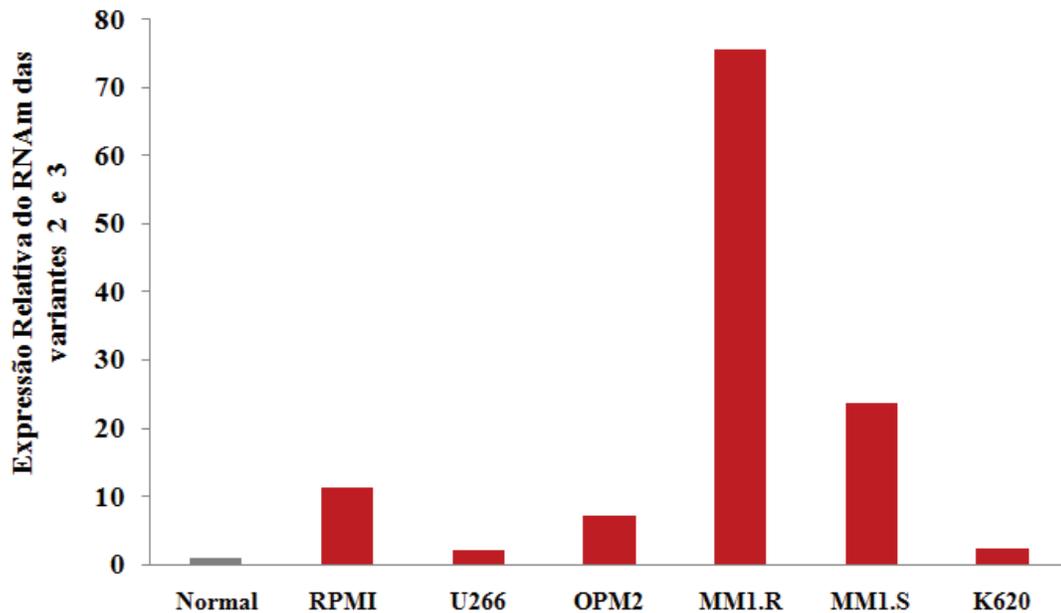


Figura 34: Expressão do RNAm de *ANKHDI* variantes 2 e 3 em linhagem de células de mieloma múltiplo. Foram analisadas amostras das células RPMI 8226, U266, OPM2, MM1.R (resistente a dexametasona), MM1.S (sensível a dexametasona), K620 e células CD138⁺ normais. A expressão das variantes 2 e 3 foi maior nas linhagens de células MM em relação as células CD138⁺ normais. É interessante notar a expressão de cerca de 80 vezes apresentada pela linhagem de células MM1.R, resistente a indução a apoptose por dexametasona.

G. Análise da expressão do gene *ANKHDI* e transcritos variantes em células CD138⁺ (plasmócitos) de Mieloma Múltiplo

Os resultados obtidos em linhagens de células de MM levaram a investigação da expressão do gene *ANKHDI* e transcritos variantes em células CD138⁺ de medula óssea de pacientes diagnosticados com Mieloma Múltiplo. Por meio de qRT-PCR foi verificado que os transcritos de *ANKHDI* estão hiperexpressos em células CD138⁺ de pacientes com MM comparando-se com células CD138⁺ normais obtidas de medula óssea ou de tonsilas. A diferença de expressão foi considerada estatisticamente significativa com $P < 0,05$ (Figura 35).

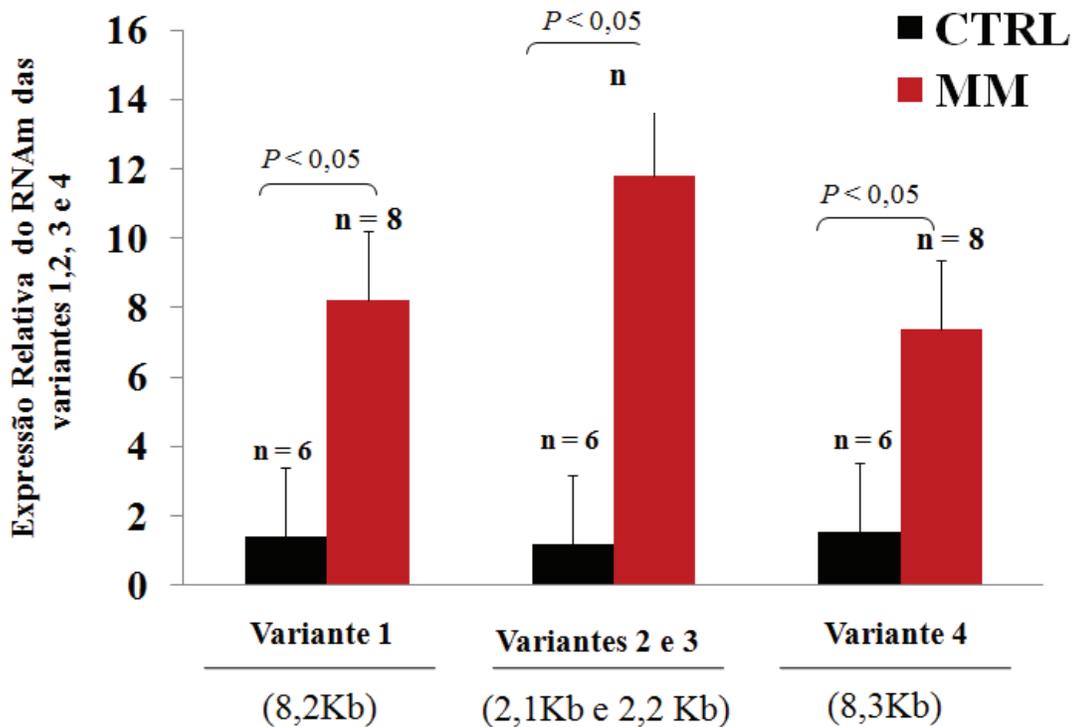


Figura 35: Expressão diferencial do gene *ANKHDI* e transcritos variantes em células CD138⁺ (plasmócitos) de pacientes com Mieloma Múltiplo por qRT-PCR. Foram analisadas 36 amostras de pacientes e 6 amostras de indivíduos saudáveis. Observamos um aumento de 7 a 12 vezes na expressão dos transcritos variantes de *ANKHDI* no MM em relação às células normais. Essa diferença é estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

H. Indução da Apoptose Celular na linhagem de células RPMI 8226

Tendo em vista os resultados de hiperexpressão do gene *ANKHD1* e seus transcritos em MM, a apoptose foi induzida na linhagem RPMI 8226 com dexametasona no intuito de verificar se expressão do gene *ANKHD1* sofre algum tipo de modulação (Figura 36). Os níveis de apoptose foram quantificados por Anexina V+ e PI+ e a expressão gênica foi avaliada por qRT-PCR.

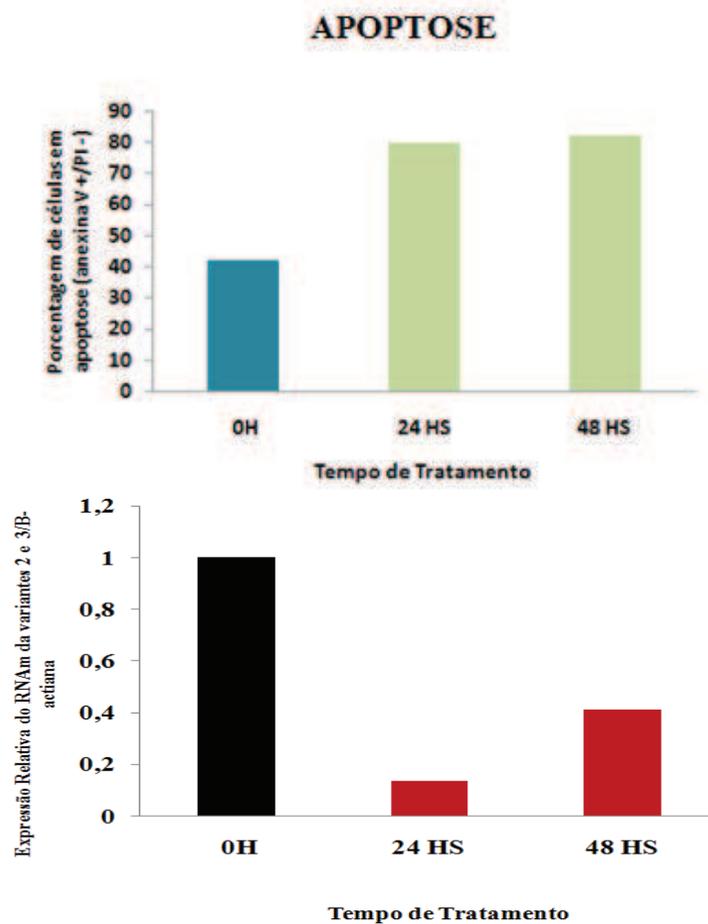


Figura 36: Indução da apoptose em células da linhagem RPMI 8226 por dexametasona. **A)** Após 48 hs da exposição a dexametasona, amostras de células foram coletadas para análise da apoptose por citometria de fluxo. Ao final da indução, cerca de 80% das células se apresentaram positivas para anexina V. **B)** A análise da expressão por qRT-PCR demonstrou uma diminuição da expressão do gene *ANKHD1* variantes 2 e 3 em relação ao aumento dos níveis de apoptose.

I. Associação entre ANKHD1 e SHP2 em Mieloma Múltiplo

De acordo com dados publicados pelo nosso grupo, de que ANKHD1 se associa a SHP2 em linhagem leucêmica K562 (Traina et al., 2006) e que SHP2 se encontra hiperativada em Mieloma Múltiplo, foi verificada a possível associação de ANKHD1 e SHP2 na linhagem de mieloma múltiplo RPMI 8226 por *Western Blotting* (Figura 37).

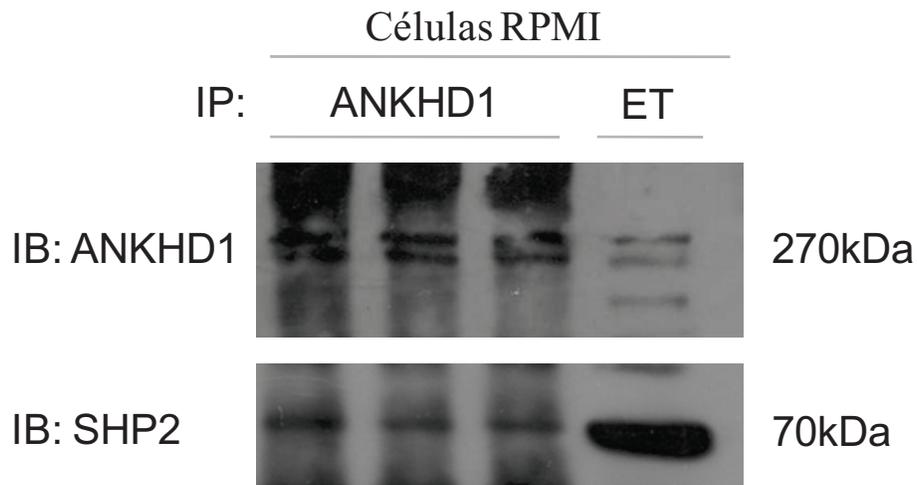


Figura 37: Os lisados de células, com iguais quantidades de proteínas, foram imunoprecipitadas com o anticorpo anti - ANKHD1 e submetidas à imunoblotting com o anticorpo anti-SHP2. Foi observada uma banda de 70kDa correspondente a SHP2, demonstrando que há interação das duas proteínas em células RPMI 8226. No extrato total foi notado a presença da banda correspondente a ANKHD1 (270kDa) e a SHP2 (70kDa). Como controle interno da reação temos a imunoprecipitação e o imunoblotting com ANKHD1.

J. Silenciamento de *ANKHD1* transcritos variantes 2 e 3 por RNA de interferência (RNAi)

Foram realizadas várias tentativas de silenciamento gênico em diferentes linhagens de células hematopoéticas mas sem obtenção de sucesso. Métodos de transfecção por eletroporação e lipofecção se mostraram inviáveis por causar grande morte celular e apresentar baixa eficiência de transfecção nestas células dificultando a análise dos efeitos inibitórios de *ANKHD1* sobre a apoptose e proliferação celular.

No entanto, na linhagem de células aderentes 293, embora a eficiência de transfecção não tenha sido alta, foi observada redução de expressão em torno de 50% de *ANKHD1* variantes 2 e 3 em relação ao controle negativo após 72hs (Figura 38). Entretanto, esta inibição não foi suficiente para causar efeitos biológicos relacionados a apoptose como era esperado. (Figura 39).

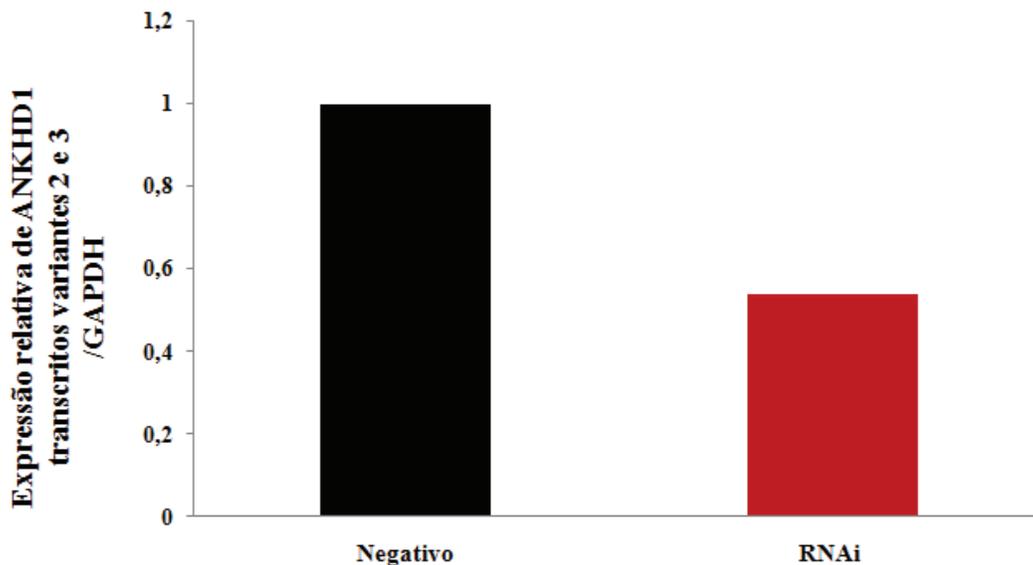


Figura 38: Inibição da expressão gênica de *ANKHD1* através de RNAi em células neoplásicas. Células da linhagem 293 aderente foram submetidas à transfecção do controle negativo ou à transfecção de RNAi para *ANKHD1* transcritos 2 e 3 através de lipofecção. O perfil de expressão foi avaliado por qRT-PCR após 72 horas de silenciamento por RNAi e foi observado uma redução na expressão de *ANKHD1*.

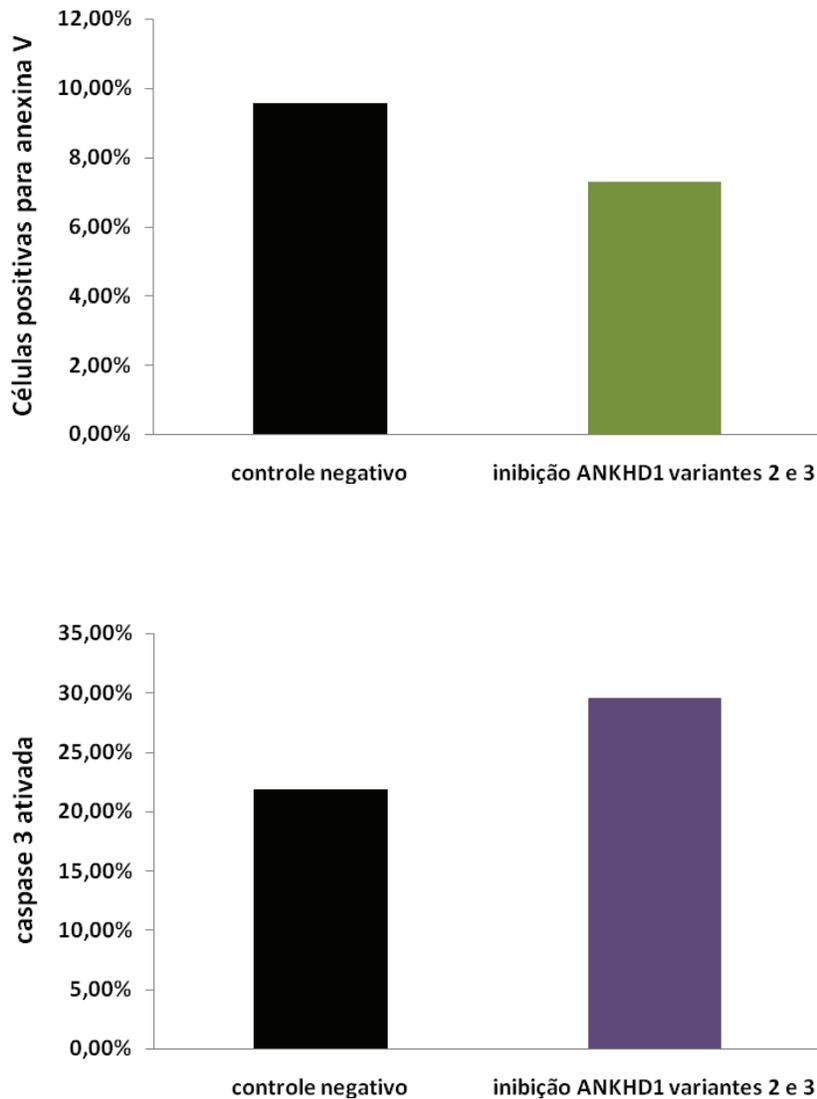


Figura 39: Apoptose celular após inibição de *ANKHD1* transcritos variantes 2 e 3 por RNAi. **A)** Células 293 transfectadas com controle negativo e células submetidas à inibição de ANKHD1 através de RNAi, foram coletadas 72 horas após a lipofecção, submetidas à marcação de anexina V e PI e analisadas por citometria de fluxo. **B)** Estas mesmas células foram submetidas à marcação com anticorpo anti caspase 3 ativada e também analisadas por citometria de fluxo. Ambas análises não demonstraram diferença significativa nas células submetidas à inibição de ANKHD1 transcritos variantes 2 e 3 em relação ao controle negativo.

DISCUSSÃO

Uma compreensão mais ampla das bases moleculares que regem o desenvolvimento das neoplasias hematológicas, que inclui a identificação dos genes primariamente envolvidos, além de sua caracterização funcional, é um dos grandes objetivos das muitas linhas de pesquisas desenvolvidas no mundo pós era genômica. Pouco se sabe a respeito sobre a fisiopatologia de muitas doenças tumorais e sobre os processos que medeiam à freqüente transformação neoplásica. Novas terapias têm sido propostas com base nas características biológicas das células neoplásicas, porém os eventos moleculares responsáveis pela manutenção ou propagação da população clonal anômala ainda não foram suficientemente esclarecidos, sendo que muitas vezes os agentes terapêuticos utilizados não são alvo-específico.

A identificação e caracterização estrutural e funcional de genes diferencialmente expressos entre tecidos tumorais e normais constituem etapas fundamentais para permitir a compreensão do processo neoplásico e o desenvolvimento de novas estratégias antitumorais.

No presente estudo, a partir de dados gerados pelo Projeto Genoma Humano do Câncer, identificamos e caracterizamos o gene *ANKHD1* e quatro dos seus transcritos variantes por meio de análise *in silico* e procedimentos laboratoriais envolvendo técnicas de biologia celular e molecular.

O gene *ANKHD1* se localiza no braço longo do cromossomo 5, mais precisamente na região 5q31.3, onde estão localizados vários genes relacionados a proliferação celular e controle da hematopoese e cujas alterações genéticas têm sido implicadas em doenças hematológicas (Knutsen et al., 2003; Brezinova et al., 2000). Ao longo desse estudo verificamos a existência de vários transcritos deste gene originados provavelmente por mecanismo de clivagem alternativa e nossa análise computacional detectou possíveis sítios de clivagem em vários éxons deste gene.

É interessante mencionar que esse mecanismo, inicialmente considerado pouco freqüente em eucariotos, é responsável pela origem de pelo menos 60% dos transcritos existentes no genoma de camundongos e humanos. Estes eventos são observados entre diferentes tipos celulares, durante o desenvolvimento ou durante outros processos biológicos e resultam no aumento da diversidade do transcriptoma e proteoma pela geração

de múltiplos transcritos de RNAm a partir de um único gene (Shepard & Hertel, 2008; Hertel, 2008; Kim et al., 2006).

Recentes estudos sugerem que a regulação do mecanismo de clivagem alternativa pode determinar quando e onde uma determinada proteína deverá ser produzida e que mudanças no padrão desse mecanismo podem modular muitas atividades celulares, tanto em situações fisiológicas como em patológicas (Hertel, 2008; Blaustein et al., 2007; Smith & Valcárcel, 2000). Algumas vias de sinalização têm sido implicadas na regulação deste mecanismo. Trabalhos recentes têm esclarecido sobre o mecanismo molecular pelo qual estímulos extracelulares ativam as cascatas de sinalização que modulam a maquinaria de clivagem e conseqüentemente o padrão de muitos precursores de RNAm (Blaustein et al., 2007).

Além disso, a prevalência de clivagem alternativa do RNAm como mecanismo de regulação da expressão gênica, faz com que se torne um provável alvo para alterações levando a doenças humanas (Cáceres & Kornblihtt, 2002; Cooper & Mattox, 1997). Dessa forma, a presença de vários transcritos do gene *ANKHD1*, indica a possibilidade de seu envolvimento em vários processos biológicos importantes, tanto em condições normais como em neoplasias.

A proteína ANKHD1, inicialmente denominada hMASK (Human Multiple Ankyrin Repeats Single KH domain), identificada por Poulin e colaboradores (Poulin et al., 2003), é ortóloga à Mask da *Drosophila* (Smith et al., 2002) e seqüências homólogas e ortólogas foram encontradas em outros organismos, indicando que é uma proteína conservada entre as espécies. Apresenta na sua seqüência domínios conservados de repetições de anquirina, característica que deu início a este estudo. As repetições de anquirina são encontradas em um grande número de proteínas que desempenham importantes funções biológicas como as proteínas envolvidas no transporte celular, na manutenção da integridade do citoesqueleto, no controle da transcrição gênica e do ciclo celular, nas respostas inflamatórias, no desenvolvimento, nas várias vias de sinalização celular e algumas têm sido ligadas a doenças humanas. O grande número de proteínas com repetições de anquirina reflete a versatilidade deste domínio em particular (Mosavi et al., 2004). As isoformas 1 e 4 da proteína ANKHD1 apresentam 20 repetições de anquirina

enquanto as isoformas 2 e 3 apresentam 10 repetições de anquirina. A presença destes domínios sugerem que estas isoformas participem de interações protéicas e vias de sinalização celular relevantes. Além disso, as isoformas 1 e 4 possuem um domínio KH na região C terminal. Este domínio possui cerca de 70 aminoácidos e foi descrito em algumas proteínas que se ligam a ácidos nucleicos (Gibson et al., 1993; Siomi et al., 1993) mas sua função ainda não foi definida na proteína ANKHD1.

A análise da expressão gênica de *ANKHD1* e seus transcritos variantes demonstrou que são largamente expressos tanto em linhagens de células neoplásicas como em tecidos normais, em diferentes níveis, nos vários tipos de tecidos analisados. Esses dados são consistentes com os obtidos por Poulin e colaboradores (Poulin et al., 2003). Pode-se especular que estas diferenças de expressão são tecido-específicas e estejam sendo reguladas por mecanismo de clivagem alternativa.

Em *Drosophila melanogaster*, Mask foi inicialmente identificada através de uma metodologia desenhada para detectar novas proteínas que poderiam interagir com elementos das vias de sinalização dos receptores de tirosina quinase (RTK) como a proteína tirosina fosfatase Corkscrew (CSW), homóloga a *Src Homology-2 domain-containing protein tyrosine Phosphatase-2* (SHP2) humana e proteínas efetoras das vias Ras/MAPK, PI3K e PLC γ . A caracterização fenotípica da Mask em *Drosophila* sugere que esta é uma nova proteína envolvida em vias de sinalização de tirosina quinase e parece desempenhar papel crucial na diferenciação, sobrevivência e proliferação das células fotoreceptoras dos olhos da *Drosophila* (Smith et al., 2002). Com base nessas observações, no presente estudo foram realizados ensaios *in vitro*, utilizando modelos hematopoéticos, os quais permitem a análise deste complexo sistema através da manipulação de várias condições e componentes da cultura de células, com o objetivo de estabelecer um possível papel do gene *ANKHD1* e seus transcritos variantes em processos biológicos basais.

A homeostase do sistema hematopoético é mantida por mecanismos que controlam os aspectos de sobrevivência, proliferação e diferenciação através de uma rede de sinalização complexa constituída por vários tipos de moléculas como hormônios, citocinas, fatores de crescimento e de transcrição. No presente estudo, durante o processo de diferenciação eritróide, onde células progenitoras hematopoéticas normais foram

submetidas ao tratamento com eritropoietina (EPO), foi observado um aumento na expressão de todas as variantes do gene *ANKHDI* e tal padrão de expressão também foi notado durante o processo de diferenciação mielóide, onde células da linhagem HL60 foram induzidas a se diferenciar com ácido all trans retinóico (ATRA). No ensaio de proliferação celular, linfócitos normais do sangue periférico foram submetidos à estimulação mitogênica exercida pela lectina fitohemaglutinina (PHA) (Sell & Costa, 2000) e durante esse processo, além do aumento do número de células, também foi observado aumento da expressão de *ANKHDI*. Entretanto, a indução da apoptose em células da linhagem leucêmica KG1 demonstrou uma diminuição na expressão de *ANKHDI* em relação inversa aos níveis de apoptose exibidos frente às diferentes concentrações do agente oxidante t-butil hidroxiperoxido (t-BOOH) utilizadas.

Na eritropoese, o hormônio eritropoietina (EPO) interage diretamente com seu receptor (EPO-R) na membrana das células precursoras hematopoéticas, fosforilando e ativando a tirosina quinase JAK2, a qual leva a ativação de várias vias de transdução de sinais, que incluem a PI3-quinase/AKT, a STAT5-Bcl-XL e a ERK/MAPK, resultando na proliferação e diferenciação terminal das células precursoras eritróides e proteção desses precursores contra apoptose (Ingley et al., 2004). O fator de transcrição GATA-1, crucial a diferenciação terminal das células eritróides, é fosforilado e ativado pela EPO, via PI3-quinase/AKT (Zhao et al., 2006). Em estudos de camundongo nocaute das fosfatases SHP1, SHP2, CD45 e proteína tirosina fosfatase 1B (PTB-1B) foi demonstrado o envolvimento destas quatro tirosinas fosfatases na regulação da eritropoese. Outros estudos demonstraram que SHP2 é essencial à gastrulação murina durante a embriogênese e análises de células tronco embrionárias deficientes em SHP2 revelaram diminuição na formação de colônias eritróides; a fosfatase SHP2 é um substrato robusto para a fosforilação de tirosina por EPO-R, o que leva ao recrutamento de Grb2-Sos e ativação da via de sinalização Ras/Raf/MAP quinase e de alguns fatores de transcrição (Richmond et al., 2005; Ingley et al., 2004). A diferenciação mielóide induzida por ATRA, em células HL60 (AML-M2), por outro lado, ocorre pela inibição da via PI3K/AKT. A diminuição nas taxas de proliferação dessas células é explicada pela parada na fase G1 do ciclo celular, outro efeito exercido pelo ATRA (Barber et al., 2008; Ozpolat et al., 2008; Ozeki and Shively, 2008; Ishida et al., 2004; Bertagnolo et al., 1999). Dessa forma, o padrão de expressão gênica apresentado pelo

gene *ANKHDI* e seus transcritos variantes, tanto em células normais como em células neoplásicas, submetidas aos diferentes processos biológicos acima citados, sugere que tenham um papel de elevada relevância nas vias de sinalização celulares responsáveis pelo estabelecimento da hematopoese.

A desregulação do processo de apoptose rompe com o complexo e delicado equilíbrio existente entre a proliferação, sobrevivência e morte celular e desempenha um importante papel no desenvolvimento de doenças como o câncer, em particular as neoplasias hematológicas (Testa & Riccioni, 2007). A síndrome mielodisplásica é uma neoplasia caracterizada por várias disfunções ocorridas na medula óssea, como altos níveis de apoptose na linhagem eritróide e displasia mielóide. Cerca de 30% dos casos evoluem para leucemia mielóide aguda (Hopfer et al., 2008; Fontenay & Gyan, 2008). De modo geral, o processo de apoptose ocorre com a ativação seqüencial de caspases iniciadoras (procaspase 8, 9 e 10) e efetoras (caspase 3, 6 e 7). A ativação das caspases efetoras leva à morte celular por clivagem proteolítica de vários alvos celulares, entre eles, as proteínas envolvidas em vias de sinalização relacionadas à proliferação e sobrevivência como MAPK, JAK/STAT, PI3K/Akt, Src quinase, NK- κ B, BCL2 e outros substratos (Chauhan & Anderson, 2003).

A baixa expressão gênica de *ANKHDI* transcrito variante 3 em células totais da medula óssea de pacientes com síndrome mielodisplásica e em células CD34+ submetidas ao processo de diferenciação eritróide, comparada com células hematopoéticas normais, sugere que *ANKHDI* possa estar envolvido na fisiopatologia dessa neoplasia. Curiosamente, por análise de bioinformática, detectamos na região promotora de *ANKHDI*, a presença de sítios de ligação ao fator de transcrição *GATA-1* e, durante a diferenciação eritróide, diferentemente do que ocorre em células hematopoéticas normais, também não houve aumento da expressão *GATA-1*, importante para a diferenciação eritróide terminal (Pope et al., 2000). Os dados aqui obtidos com relação à *GATA-1* são consistentes aos observados por outros pesquisadores em SMD e sugerem que *GATA-1* seja clivado pela caspase 3 ativada durante o processo de diferenciação eritróide com conseqüente bloqueio da maturação na fase terminal, e aumento nos níveis de apoptose. Corroborando estes achados, no presente estudo, ao final da diferenciação eritróide foi constatado um aumento

nos níveis de apoptose nas células de pacientes com SMD comparado com as células normais (Droin et al., 2008; Tehranchi et al., 2005).

Outros fatores devem ser considerados com relação aos desequilíbrios que levam ao estabelecimento da SMD. Eventos epigenéticos, principalmente a hipermetilação de ilhas CpG localizadas na região promotora de vários genes regulatórios importantes têm sido descritos em SMD (Hopfer et al., 2008). Tal fato poderia esclarecer o aumento da expressão do gene *ANKHD1* em células mononucleares de pacientes com SMD tratadas com o desmetilante decitabina em comparação a células não tratadas e em células CD34⁺ durante a diferenciação eritróide, visto que, através de análise de bioinformática, observamos na região promotora do gene *ANKHD1* a presença de 3 ilhas CpG. Entretanto, outros estudos serão necessários para definir o padrão de metilação presente nessas ilhas. Neste contexto, *ANKHD1* torna-se um gene bastante interessante, visto que está subexpresso em células de pacientes com SMD, está relacionado com os processos de diferenciação eritróide e apoptose e parece estar metilado nesta doença.

A leucemia mielóide aguda (LMA), neoplasia caracterizada pelo descontrole da proliferação de um clone celular anômalo originado por mutações gênicas ou por alterações epigenéticas, apresenta desregulação de múltiplas vias de sinalização e a ativação constitutiva das vias PI3K/AKT, JAK/STAT, RAS/Raf/MEK/ERK e PKC α tem sido implicada na patogênese e progressão dessa doença (Testa & Riccioni, 2008). A elevada expressão do gene *ANKHD1* transcrito variante 3 observada nas células totais da medula óssea de pacientes com diagnóstico de LMA em comparação com células hematopoéticas normais e em linhagens de células como K562 e KG1, sugere um possível envolvimento deste gene nessa neoplasia. Esses achados são consistentes com os obtidos por Traina e colaboradores (Traina et al., 2006) que observaram a superexpressão gênica e protéica de ANKHD1 isoforma 1 tanto em linhagens leucêmicas como nas células da medula óssea de pacientes com LMA.

A localização citoplasmática da proteína ANKHD1 isoforma 1 em células hematopoéticas normais e leucêmicas e a localização citoplasmática da proteína Mask da *Drosophila*, ortóloga de ANKHD1, nos discos imaginais do olho, reforçam a suposição de seu envolvimento em vias de sinalização relevantes que medeiam sinais extracelulares até o

núcleo da célula (Traina et al., 2006; Smith et al., 2000). A localização de uma proteína no citoplasma e na membrana celular é achado freqüente, uma vez que muitas proteínas citoplasmáticas são recrutadas à membrana quando da ativação de receptores transmembranas por estímulos extracelulares. Exemplo de uma proteína localizada no citoplasma e na membrana celular, que merece ser citada neste contexto, é a SHP2 (Xu et al. 2005).

SHP2 é uma fosfatase de tirosina citoplasmática codificada pelo gene *PTPN11*, participa de vias de sinalização celular de fatores de crescimento e citocinas, e exerce importantes funções na regulação da proliferação, diferenciação e migração celular através da ativação da via de sinalização da MAP quinase (Feng, 1999; Neel et al., 2003) e AKT (Hakak et al., 2000; Wu et al., 2001; Zhang et al., 2002). A ativação de SHP2, resultante de mutações no gene *PTPN11* (Chan & Feng 2007) ou de sua fosforilação (Xu et al., 2005), é achado comum em leucemias agudas. Somente a superexpressão de SHP2 não é suficiente para o desenvolvimento da leucemia aguda e outros fatores devem ser necessários à leucemogênese. A associação entre *ANKHD1* isoforma 1 e SHP2 foi demonstrada em linhagem de células leucêmica K562 e de carcinoma de próstata LNCaP. Tal achado sugere que *ANKHD1* seja uma proteína adaptadora e sua associação com SHP2 possa ser necessária à leucemogênese e ao desenvolvimento de outras neoplasias (Traina et al., 2006) e essa associação pode representar a identificação de uma nova interação protéica essencial para vias de sinalização celular em neoplasias como o Mieloma Múltiplo.

Em linhagens de células, representativas de mieloma múltiplo, foi observada alta expressão do gene *ANKHD1* transcritos variantes 2 e 3 em relação a plasmócitos normais, com maior predominância de expressão na linhagem MM1.R, que tem por característica ser resistente à apoptose induzida por dexametasona. A elevada expressão do gene *ANKHD1* e transcritos variantes também foi constatada nas células CD138⁺ (plasmócitos) de pacientes diagnosticados com mieloma múltiplo em relação à plasmócitos normais. A apoptose induzida por dexametasona em células da linhagem RPMI 8226 (sensível a dexametasona) demonstrou inibição da expressão do gene *ANKHD1* transcritos variantes 2 e 3. Deste modo sugerimos que *ANKHD1* está envolvida nos processos anti-apoptóticos e na resistência à dexametasona de plasmócitos neoplásicos provavelmente através de sua associação com SHP2 (Traina et al., 2006).

A interleucina IL-6 é muito conhecida por desempenhar papel crítico como agente indutor anti-apoptótico no MM. Seus efeitos são mediados por vias autócrinas e parácrinas e pelo receptor de superfície celular com dois componentes: a subunidade ligante específica

IL-6R α (gp80) e a subunidade gp130 transdutora de sinais (Khong et al., 2008). Em estudos anteriores foi demonstrado que a IL-6 medeia os processos de proliferação e sobrevivência celular em MM através das vias de sinalização que envolvem MEK/MAPK, JAK/STAT, PI3K/AKT (Khong et al., 2008) e RAFTK (Chauhan et al., 1999; Chauhan et al., 2000). Além disso IL-6 confere proteção contra os efeitos apoptóticos induzidos por dexametasona através da ativação da proteína tirosina fosfatase SHP2 via gp130. IL-6 se liga ao seu receptor (IL-6 R α /gp80), o qual interage com o transdutor de sinal gp130. O domínio citoplasmático de gp130 contém domínios fosfotirosina para recrutamento da SHP2. Após a ligação a esse domínio, SHP2 é ativada e desfosforila a tirosina quinase de adesão focal relacionada (RAFTK ou Pik2), que é um dos seus substratos (Hideshima et al., 2001). Deste modo, IL-6 inibe a ativação de RAFTK que em estado ativado medeia a apoptose induzida por dexametasona em MM por mecanismos moleculares ainda não esclarecidos (Chauhan et al., 2000). A apoptose induzida por dexametasona em células MM1.S (sensíveis a dexametasona) é conduzida pela ativação da caspase 9 resultando na clivagem da caspase 3. No entanto, a IL6 induz a ativação de PI3K que em associação a SHP2 ativa AKT, com conseqüente inativação de caspase 9, conferindo desta maneira proteção contra a apoptose no MM (Hideshima et al., 2001). O conjunto destes resultados somados à associação de SHP2 com ANKHD1 demonstrada neste estudo, em células da linhagem RPMI 8226, sugerem que ANKHD1 tenha papel importante na resistência à apoptose de células de MM (Figura 40). Corroborando esta hipótese, duas novas isoformas variantes de ANKHD1 (VAPR-L and VAPR- S) foram identificadas e através de estudos de inibição do gene observou-se que podem estar envolvidas em processos anti-apoptóticos em células HeLa e NT2 (Miles et al., 2005).

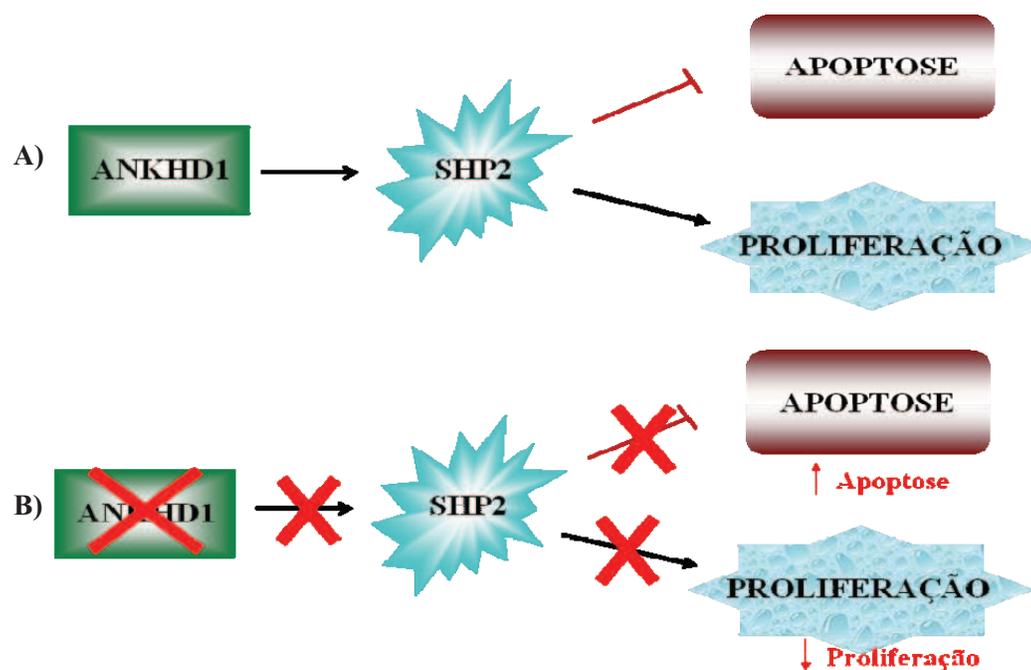


Figura 40: Representação esquemática da suposta função anti-apoptótica da ANKHD1 através de sua associação com SHP2 em Mieloma Múltiplo. **A)** ANKHD1 associa-se a SHP2 inibindo a função pro-apoptótica de RAFTK. A função pro-apoptótica de RAFTK ocorre através da indução por dexametasona. **B)** Supostamente, a inibição de ANKHD1 levaria a não ativação de SHP2 resultando no aumento dos níveis de apoptose e diminuição na proliferação celular.

No presente estudo, a inibição da expressão de *ANKHD1* variantes 2 e 3 por RNAi, utilizando vetor plasmidial, em linhagem de células hematopoéticas em suspensão, não ocorreu de modo satisfatório. A baixa eficiência de transfecção e altas taxas de morte celular causadas pelos métodos utilizados foram fatores limitantes a análise dos efeitos inibitórios de *ANKHD1* nestas células. Em células da linhagem 293 foi demonstrada a inibição parcial de *ANKHD1* em relação ao controle negativo. Entretanto, esta inibição não foi suficiente para causar efeitos biológicos relacionados a apoptose como era esperado.

Estudos funcionais preliminares realizados através da inibição da expressão de *ANKHDI* transcrito variante 1 por RNAi, em células de LLA (Jurkat), utilizando pequenos oligos comerciais, demonstraram o aumento de cerca de duas vezes na percentagem de células anexina V positiva nas células submetidas à inibição de *ANKHDI* comparadas às células controle, indicando maior apoptose nas células com inibição do gene. Esses dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa publicados na forma de tese de doutorado da aluna Fabíola Traina reforçam a necessidade de outras abordagens para melhor evidenciar o papel de *ANKHDI* em vias de apoptose.

ANKHDI também é modulada nos processos de proliferação celular, como demonstrado em nosso estudo e em contraposição observamos modulação da expressão de *ANKHDI* também nos ensaios de apoptose, porém de maneiras opostas. Enquanto as células submetidas à proliferação apresentaram um aumento na expressão de *ANKHDI*, as células submetidas ao processo de apoptose mostraram diminuição na expressão em relação inversa aos níveis de apoptose exibidos.

Proteínas contendo repetições de anquirina possuem uma variedade de funções biológicas e têm sido descritas em vários organismos, desde vírus a humanos. Assim, o conjunto dos resultados aqui obtidos de aumento da expressão gênica durante a proliferação e diferenciação celulares, assim como em células resistentes á apoptose, sugerem que *ANKHDI* tenha papel importante nos processos celulares normais e neoplásicos.

CONCLUSÕES

O conjunto de resultados obtidos no presente estudo permitiram as seguintes conclusões:

- 1- O gene *ANKHDI*, inicialmente denominado *hMASK*, localiza-se no braço longo do cromossomo 5 (banda 5q31.3) e apresenta vários transcritos que diferem em tamanho como consequência do uso de sinais de clivagem alternativa presentes em vários exons deste gene.
- 2- Através de análise “in silico”, utilizando várias ferramentas de bioinformática, foram identificados na região promotora do gene *ANKHDI*, elementos regulatórios importantes como sítios de ligação ao fator de transcrição *GATA-1* e seqüências ricas no dinucleotídeo CG, as denominadas ilhas CpG.
- 3- Todos os transcritos de *ANKHDI* codificam proteínas com domínios de repetições de anquirina e as isoformas 1 e 4 apresentam um domínio KH na porção C terminal.
- 4- Os transcritos de *ANKHDI* apresentam expressão tanto em células neoplásicas como em tecidos humanos normais, em níveis variados.
- 5- Durante os processos de diferenciação e proliferação celular os transcritos variantes de *ANKHDI* apresentam elevada expressão enquanto que no processo de apoptose a expressão está diminuída.
- 6- No Mieloma Múltiplo e nas Leucemias Agudas, os transcritos variantes de *ANKHDI* estão hiperexpressos e na Síndrome Mielodisplásica estão hipoexpressos.
- 7- Diferentemente do que ocorre em doadores normais, não houve aumento na expressão dos transcritos variantes de *ANKHDI* e do fator de transcrição *GATA-1* durante a diferenciação eritróide de células CD34+ de pacientes com Síndrome Mielodisplásica.

- 8- Houve aumento na porcentagem de células Anexina V + durante a diferenciação eritróide de células CD34⁺ de pacientes com Síndrome Mielodisplásica comparada com células CD34⁺ de doadores de medula óssea.
- 9- O tratamento com decitabina ocasionou aumento da expressão dos transcritos variantes de *ANKHD1* durante a diferenciação eritróide de células CD34⁺ e em células mononucleares de pacientes com Síndrome Mielodisplásica, sugerindo que os transcritos estão hipoexpressos em razão de mecanismos de metilação.
- 10- ANKHD1 está associada a SHP2 em linhagem celular de Mieloma Múltiplo (RPMI 8226).
- 11- Não houve sucesso na inibição de ANKHD1 transcritos variantes 2 e 3 por RNAi, em células hematopoéticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Advani, A.S., Rodriguez, C., Jin, T., Jawde, R.A., Saber, W., Baz, R., Kalaycio, M., Sobecks, R., Sekeres, M., Tripp, B., His, E. Increased C-kit intensity is a poor prognostic factor for progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed AML. **Leukemia Research** 32: 913–918, 2008.
- Aggarwal, R., Ghobrial, I.M., Roodman, G.D. Chemokines in multiple myeloma. **Experimental Hematology**. 34: 1289–1295, 2006.
- Austin, J. and Kimble, J. Transcript analysis of *gfp-1* and *lin-12*, homologous genes require for cell interactions during development of *C. elegans*. **Cell**, 58(3): 565-571, 1989.
- Azab, A.K.; Runnels, J.M.; Pitsillides, C.; Moreau, A-S.; Azab, F.; Leleu, X.; Jia, X.; Wright, R.; Ospina, B.; Carlson, A.L.; Alt, C.; Burwick, N.; Roccaro, A.M.; Ngo, N.T.; Farag, M.; Melhem, M.R.; Sacco, A.; Munshi, N.C.; Hideshima, T.; Rollins, B.J.; Anderson, K.C.; Kung, A.L.; Lin, C.P.; Ghobrial, I. M. The CXCR4 inhibitor AMD3100 disrupts the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment and enhances their sensitivity to therapy. **Blood**. Prepublished online Jan 12, 2009.
- Barber, N., Belov, L., Christopherson, R.I. All-*trans* retinoic acid induces different immunophenotypic changes on human HL60 and NB4 myeloid leukaemias. **Leukemia research**. 32: 315-322, 2008
- Beck, K. A., Buchanan, J. A. and Nelson, W. J. Golgi membrane skeleton: identification, localization and oligomerization of a 195 kDa ankyrin isoform associated with the Golgi complex. **J Cell Sci**, 110 (Pt 10)(1239-1249, 1997.
- Beck, K. A. and Nelson, W. J. A spectrin membrane skeleton of the Golgi complex. **Biochim Biophys Acta**, 1404(1-2): 153-160, 1998.
- Bennett, V. and Gilligan, D. M. The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. **Annu Rev Cell Biol**, 9(27-66), 1993.

- Bennett, V.; Chen, L. Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. **Current Opinion in Cell Biology** . 13: 61–67, 2001.
- Bennett, V., Healy, J. Organizing the fluid membrane bilayer: diseases linked to spectrin and ankyrin. **Trends in Molecular Medicine** Vol.14 No.1 28-36, 2007.
- Bentires-Alj, M., Paez, J. G., David, F. S., Keilhack, H., Halmos, B., Naoki, K., et al. Activating mutations of the noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 gene in human solid tumors and adult acute myelogenous leukemia. **Cancer Res**, 64(24): 8816-8820, 2004.
- Blank, V., Kourilsky, P. and Israel, A. NF-kappa B and related proteins: Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. **Trends Biochem Sci**, 17(4): 135-140, 1992.
- Blaustein, M., Pelisch, F., Srebrow, A. Signals, pathways and splicing regulation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 39: 2031-2048, 2007.
- Bork, P. Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? **Proteins**, 17(4): 363-374, 1993.
- Braun, T., Carvalho, G., Coquelle, A., Vorenin, A.C., Lepelley, P., Hirsch, F., Kiladjians, J.J.; Ribrag, V., Fenaux, P., Kroemer, G. NF-κB constitutes a potential therapeutic target in highriskmyelodysplastic syndromes. **Blood**. 107: 1156-1165, 2006.
- Breeden, L. and Nasmyth, K. Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the Notch gene of Drosophila. **Nature**, 329(6140): 651-654, 1987.
- Brezinova, J., Zemanova, Z., Cermak, J., Michalova, K. Fluorescence insitu hybridization confirmation of 5q deletions in patients with hematological malignancies. **Cancer Genet. Cytogenet**. 117, 45–49, 2000.
- Cáceres. J.F., Kornblihtt. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. **Trends in genetics**. Vol.18 No.4 186-193. April, 2004.
- Camargo A.A., de Souza S. J., Brentani R.R., Simpson A.J. Human gene Discovery through experimental definition of transcribed regions of the human genome. **Curr Opin Chem Biol**. 6 (1) 13-6, 2002.

- Case, M., Matheson, E., Minto, L., Hassan, R., Harrison, C.j., Bown, N., Bailey, S., Vormoor, J., Hall, A.G., Irving, J.A.E. Mutation of Genes Affecting the RAS Pathway Is Common in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancer Res.** 68: (16). August 15, 2008
- Chan, R. J. and Feng, G. S. PTPN11 is the first identified proto-oncogene that encodes a tyrosine phosphatase. **Blood**, 109(3): 862-867, 2007.
- Chan, G., Kalaitzidis, D., Nell, B.G. The tyrosine phosphatase Shp2 (PTPN11) in cancer. **Cancer Metastasis Rev.** 27: 179- 192, 2008.
- Chauhan, D., Kharbanda, S., Ogata, A. Interleukin-6 inhibits Fas-induced apoptosis and stress-activated protein kinase activation in multiple myeloma cells. **Blood** 89: 227–234, 1997.
- Chauhan, D., Pandey, P., Ogata, A. Cytochrome-c dependent and independent induction of apoptosis in multiple myeloma cells. **Journal of Biological Chemistry.** 272: 29995–29997, 1997.
- Chauhan, D.; Hideshima, T.; Pandey, P.; Treon, S.; Teoh, G.; Raje, N.; Rosen, S.; Krett, N.; Husson, H.; Avraham, S.; Kharbanda, S.; Anderson, K.C. RAFTK/PYK2-dependent and -independent apoptosis in multiple myeloma cells. **Oncogene.** 18, 6733-6740, 1999.
- Chauhan, D., Pandey, P., Hideshima, T. SHP2 mediates the protective effect of interleukin-6 against dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. **J Biol Chem.** 275: 27845-27850, 2000.
- Chauhan, D., Anderson, K.C. Apoptosis in multiple myeloma: Therapeutic implications. **Apoptosis.** 6: 47–55, 2001.
- Chauhan, D.; Anderson, K.C. Mechanisms of cell death and survival in multiple myeloma (MM): Therapeutic implications. **Apoptosis.** Vol 8, N° 4, 2003.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, 162(1): 156-159, 1987.
- Chou, P. Y. and Fasman, G. D. Prediction of beta-turns. **Biophys J**, 26(3): 367-383, 1979.

- Claessens, Y-E; Bouscary, D; Dupont, J-M; Picard, F; Melle; Gisselbrecht, S; Lacombe, C; Dreyfus, F; Mayeux, P; Roupie, M.F. In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors from patients with myelodysplastic syndromes: evidence for Fas-dependent apoptosis. **Blood**. 99: 1594-1601, 2002.
- Claudio, J.O; Khan, E.M; Tang, H; Gonçalves, J; Voralia, M; Li, Z.H; Nadeem, V.; Cukerman, E.; Pabalan, O.F.; Liew, C.C.; Woodgett, J.R; Stewart, A.K. A molecular compendium of genes expressed in multiple myeloma. **Blood**. 100:2175-2186, 2002.
- Colleoni, G.W.B.; Tratamento de primeira linha no mieloma múltiplo. **Rev. bras. hematol. hemoter**. 29(1): 31-3, 2007.
- Cooper, T. A., and Mattox W. The regulation of splice-site selection, and its role in human disease. **Am J. Hum Genet**. 61, 259-66, 1997.
- Cortelezzi, A.; Colombo, G., Pellegrini, C., Silvestris, I., Mazzeo, L.M., Bosari, S., Deliliers, G, L., Fracchiolla, N.S. Bone marrow glycophorin-positive erythroid cells of myelodysplastic patients responding to high-dose rHuEPO therapy have a different gene expression pattern from those of nonresponders. **Am. J. Hematol**. 83:531–539, 2008.
- Dahia, P. Descobrimos genes no século XXI; na área de onco-endocrinologia. **Arq Bras Endocrinol Metab**. 46/4: 341-350, 2002.
- Doepfner, K.T.; Boller, D.; Arcaro, A. Targeting receptor tyrosine kinase signaling in acute myeloid leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. 63: 215–230, 2007.
- Donk, N.W.C.J. V.; Lokhorst, H.M.; Bloem, A.C. Growth factors and antiapoptotic signaling pathways in multiple myeloma. **Leukemia**. 19, 2177–2185, 2005.
- Droin, N.; Catherine, S.; Jacquelin, A.; Gue'ry, L.; Garrido, C.; Fontenay, M.; Hermine, O.; Solary, E. A role for caspases in the differentiation of erythroid cells and macrophages. **Biochimie**. 90: 416 e 422. 2008.
- Durie, B.G.M. & Salmon, S. E., A clinical staging system for multiple myeloma. **Cancer**. 36: 842-854, 1975.
- Feng, G. S. Shp-2 tyrosine phosphatase: signaling one cell or many. **Exp Cell Res**, 253(1): 47-54, 1999.

- Fibach, E., Manor, D., Oppenheim, A., Rachmilewitz, E.A. Proliferation and maturation of human erythroid progenitors in liquid culture. **Blood** 73,100–103, 1989.
- Fontenay, M.; Gyan E. Apoptotic pathways to death in myelodysplastic syndromes. **Haematologica**. 93(9): 1288-1292, 2008.
- Gascard, P. and Mohandas, N. New insights into functions of erythroid proteins in nonerythroid cells. **Curr Opin Hematol**, 7(2): 123-129, 2000.
- Gibson, T.J., Thompson, J.D., Heringa, J. The KH domain occurs in a diverse set of RNA-binding proteins that include the antiterminator NusA and is probably involved in binding to nucleic acid. **FEBS Lett**. 324,361–366, 1993.
- Gorina, S. and Pavletich, N. P. Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. **Science**, 274(5289): 1001-1005, 1996.
- Greenstein, S., Ghias, K., Krett, N.L., Rosen, S.T. Mechanisms of Glucocorticoid-mediated Apoptosis in Hematological Malignancies. **Clinical Cancer Research**. Vol. 8, 1681–1694, June 2002.
- Grivicich, I., Regner, A., Rocha, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 53(3): 335-343, 2007.
- Hakak, Y., Hsu, Y. S. and Martin, G. S. Shp-2 mediates v-Src-induced morphological changes and activation of the anti-apoptotic protein kinase Akt. **Oncogene**, 19(28): 3164-3171, 2000.
- Heider, U., Fleissner, C., Zavski, I., Kaiser, M., Hecht, M., Jacob, C., Sezer, O. Bone markers in multiple myeloma. **European journal of cancer**. 42: 1544-1553. 2006.
- Hertel, K.J.; Combinatorial Control of Exon Recognition. **The journal of biological chemistry**. Vol. 283, n° 3, pp. 1211- 1215, January 18, 2008.
- Hideshima, T., Nakamura, N., Chauhan, D., Anderson, K.C. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. **Oncogene**. 20: 5991-6000, 2001.

- Hideshima, T.; Mitsiades, C.; Tonon, G.; Richardson, P.G.; Anderson, K.C. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. **Cancer**. Vol.7, 585-598, August, 2007.
- Hodges, V.M., Rainey, S., Lappin, T.R., Maxwell, A.P. Pathophysiology of anemia and erythrocytosis. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. 64: 139-158, 2007.
- Higashitsuji, H., Itoh, K., Nagao, T., Dawson, S., Nonoguchi, K., Kido, T., et al. Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. **Nat Med**, 6(1): 96-99, 2000.
- Hopher, O., Komor, M., Koehler, I. S., Schulze, M., Hoelzer, D., Thiel, E., Hofmann, W.K. DNA methylation profiling of myelodysplastic syndrome hematopoietic progenitor cells during in vitro lineage-specific differentiation. **Experimental Hematology**. 35: 712–723, 2007.
- Hose, D., Rème, T., Meiber, T., Moreaux, J., Seckinger, A., Lewis, J., Benes, V., Benner, A., Hundermer, M., Hielscher, T., Shaughnessy Jr, J.D., Barlogie, B., Neben, K., Kramer, A., Hillengass, J., Bertsch, U., Jauch, A., Vos, J.D., Rossi, J.F., Mohler, T., Blakes, J., Zimmermanns, J., Klein, B., Goldschmidt, H. Inhibition of aurora-kinases for tailored risk adapted treatment of multiple myeloma. **Blood**. Prepublished online Jan 26, 2009.
- Illmer, T., Thiede, C., Fredersdorf, A., Stadler, S., Neubauer, A., Ehninger, G., Schaich, M. Activation of the RAS Pathway Is Predictive for a Chemosensitive Phenotype of Acute Myelogenous Leukemia Blasts. **Clin Cancer Res**. 11(9) 3217-3224, 2005
- Ingle, E., Tilbrook, P.A., Klimken, S.P. New Insights into the regulation of erythroid cells. **Jubmb life**. 56(4): 177–184, April 2004
- Ishida, S., Mogami, Y.S., Shinozaki, Y., Kagechika, H., Shudo, K., Ozawa, S., Sawada, J.I., Ohno, Y., Inoue, K. Differential modulation of PI3-kinase/Akt pathway during all-trans retinoic acid- and Am80-induced HL-60 cell differentiation revealed by DNA microarray analysis. **Biochemical Pharmacology**. 68: 2177–2186, 2004.
- Kerbaui, D.B.; Deeg, H.J. Apoptosis and antiapoptotic mechanisms in the progression of myelodysplastic syndrome. **Experimental Hematology** .35: 1739–1746, 2007.

- Jacobs, M. D. and Harrison, S. C. Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. **Cell**, 95(6): 749-758, 1998.
- Kim, E.; Magen, A.; Ast. G. Different levels of alternative splicing among eukaryotes. **Nucleic Acids Research**. Vol. 35, n°1, pp.125–131, 2007.
- Knutsen, T., et al. Cytogenetic, spectral karyotyping, fluorescence in situ hybridization, and comparative genomic hybridization characterization of two new secondary leukemia cell lines with 5q deletions, and MYC and MLL amplification. **Genes Chromosomes Cancer**. 37, 270–281, 2003.
- Kordeli, E., Lambert, S. and Bennett, V. AnkyrinG. A new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of Ranvier. **J Biol Chem**, 270(5): 2352-2359, 1995.
- Kornblau, S.M., Womble, M., Qiu, Y.H., Jackson, C.E., Chen, W., Konopleva, M., Elihu H. Estey, E.H., Andreeff, M. Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. **Blood**. 108: 2358-2365, 2006.
- Kunimoto, M., Otto, E. and Bennett, V. A new 440-kD isoform is the major ankyrin in neonatal rat brain. **J Cell Biol**. 115(5): 1319-1331, 1991.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **J Mol Biol**, 157(1): 105-132, 1982.
- Lambert, S., Yu, H., Prchal, J. T., Lawler, J., Ruff, P., Speicher, D., et al. cDNA sequence for human erythrocyte ankyrin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 87(5): 1730-1734, 1990.
- Lerario, A.M., Mendonça, B.B. ; Lin, C.J. Avanços recentes no conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese adrenocortical. **Arq Bras Endocrinol Metab**. 49/5: 753-768, 2005.
- Lindberg, E.H.; Malcovati, L. Supportive care, growth factors, and new therapies in myelodysplastic syndromes. **Blood Reviews**. 22: 75–9, 2008.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, 25(4): 402-408, 2001.

- Loh, M.L., Vattikuti, S., Schubbert, S., Reynolds, M.G., Clarson, E., Lieuw, K.H., Cheng, J.W., Lee, C.M; Stokoe, D; Bonifas, J.M; Curtiss, N.P; Gotlib, J; Meshinchi, S; Beau, M.M.L; Emanuel, P.D; Shannon, K.M. Mutations in PTPN11 implicate the SHP-2 phosphatase in leukemogenesis. **Blood**. 103: 2325-2331, 2004.
- Mallo, M.; Arenillas, L.; Espinet, B.; Salido, M.; Hernández, M.J.; Lumbreras, E., Rey, M. D.; Arranz,E.; Ramiro, S.; Font, P.; González, O., Renedo, M.; Cervera, J.; Such, E.; Sanz, G.F.; Luño, E.; Sanzo, C.; González, M.; Calasanz, M.J.; Mayans, J.; Ballesteros, C.G.; Amigo, V.; Collado, R.; Oliver, I.; Carbonell, F.; Bureo, E.; Insunza, A.; Yañez, L.; Muruzabal, M.J.; Beltrán, E.G.; Andreu, R.; León, P.; Gómez, V.; Sanz, A.; Casasola, N.; Moreno, E.; Alegre, A.; Martín, M.L.; Pedro, C.; Serrano, S.; Florensa, L.; Solé, F. Fluorescence *in situ* hybridization improves the detection of 5q31 deletion in myelodysplastic syndromes without cytogenetic evidence of 5q-. **Haematologica**. 93 (7): 1001- 1008, 2008.
- Martins, S.L.R., Falcão,R.P. A importância da imunofenotipagem na leucemiamielóide aguda. **Rev. Assoc. Med. Bras**. v.46 n.1 São Paulo jan./mar., 2000.
- Medeiros, C. R., Plasmócitos e doenças correlatas. In: Zago, M.A., Falcão, R. P., Pasquini, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo, Editora Atheneu. 2001, p. 677-688.
- Metze, I.L, Magalhães, S.M.M. Síndromes mielodisplásicas – Protocolo de exclusão. **Rev. bras. hematol. hemoter**. 26(4): 263-267, 2004.
- Milella, M; Kornblau,S.M; Estrov, Z; Carter,B.Z; Lapillonne, H; Harris, D; Konopleva, M; Zhao, S; Estey, E; Andreeff, M. Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. **J. Clin. Invest**. 108:851–859, 2001.
- Miles, M. C., Janket, M. L., Wheeler, E. D., Chattopadhyay, A., Majumder, B., Dericco, J., et al. Molecular and functional characterization of a novel splice variant of ANKHD1 that lacks the KH domain and its role in cell survival and apoptosis. **Febs J**, 272(16): 4091-4102, 2005.

- Miller K. B. and Daoust P. R., Clinical Manifestations of Acute Myeloid Leukemia. In: Hoffman, R. , Benz, Jr. E. J., Shattil, S. J., Furie, B., Cohen, H. J., Silberstein, L. E., McGlave, P. **Hematology basic principles and practice**. Philadelphia, Editora Elsevier, 2005, p. 1071-1097
- Mosavi, L. K., Cammett, T. J., Desrosiers, D. C. and Peng, Z. Y. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. **Protein Sci**, 13(6): 1435-1448, 2004.
- Neel, B. G., Gu, H. and Pao, L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. **Trends Biochem Sci**, 28(6): 284-293, 2003.
- Niarber, N., Belov, L., Christopherson, R.I. All-*trans* retinoic acid induces different immunophenotypic changes on human HL60 and NB4 myeloid leukaemias. **Leukemia Research**. 32: 315–322
- Nolte, F. & Hofmann, W.K. Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes. **Ann Hematol**. 87: 777–795, 2008.
- Otto, E., Kunimoto, M., McLaughlin, T. and Bennett, V. Isolation and characterization of cDNAs encoding human brain ankyrins reveal a family of alternatively spliced genes. **J Cell Biol**, 114(2): 241-253, 1991.
- Ozeki, M. & Shively, J.E. Differential cell fates induced by all-trans retinoic acid-treated HL-60 human leukemia. **J. Leukoc. Biol**. 84: 769–779, 2008.
- Ozpolat, B., Akar, U., Calancha, I.Z., Mejia, P.V., Alvarez, M.A., Berestein, G.L. Death-associated protein 5 (DAP5/p97/NAT1) contributes to retinoic acid-induced granulocytic differentiation and arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia. **Apoptosis**. 13:915–928, 2008.
- Pascual, J., Castresana, J. and Saraste, M. Evolution of the spectrin repeat. **Bioessays**, 19(9): 811-817, 1997.
- Peters, L. L. and Lux, S. E. Ankyrins: structure and function in normal cells and hereditary spherocytes. **Semin Hematol**, 30(2): 85-118, 1993.

- Piazza, A.F., Ruzzene, M., Gurrieri, C., Montini, B., Bonanni, L., Chioetto, G., Maira, G.D., Barbon, F., Cabrelle, A., Zambello, R., Adami, F., Trentin, L., Pinna, L.A., Semenzato, G. Multiple myeloma cell survival relies on high activity of protein kinase CK2. **Blood**. 108: 1698-1707, 2006
- Poulin, F., Brueschke, A. and Sonenberg, N. Gene fusion and overlapping reading frames in the mammalian genes for 4E-BP3 and MASK. **J Biol Chem**, 278(52): 52290-52297, 2003.
- Pope, S.H., Fibach, E., Sun, J., Chin, K., Rodgers, G.P. Two-phase liquid culture system models normal human adult erythropoiesis at the molecular level. **Eur J Haematol**, 64: 292-303, 2000
- Richmond, T.D.; Chohan, M.; Barber, D.L. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. **Trends in Cell Biology** .Vol.15, N°3 March 2005.
- Salvesen, G.S & Timmer, J.C. Caspase substrates. **Cell Death and Differentiation**. 14, 66–72, 2007.
- Sharma, S., Lichtenstein. Dexamethasone-induced apoptotic mechanisms in myeloma cells investigated by analysis of mutant glucocorticoid receptors. **Blood**. 112:1338-1345, 2008.
- Sedgwick, S. G. and Smerdon, S. J. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. **Trends Biochem Sci**, 24(8): 311-316, 1999.
- Sell, A.M., Costa, C.P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina **Acta Scientiarum**. 22(2):297-303, 2000.
- Shain, K.H.; Yarde, D.N.; Meads, N.B; Huang, M.; Jove, Hazlehurst, L.A.; Dalton, W.S. B1 integrin adhesion enhances IL-6-mediated STAT3 signaling in myeloma cells: implications for microenvironment influence on tumor survival and proliferation. **Cancer Research**. 69: (3),1009-1015, 2009.
- Shepard, P.J., Hertel, K.J. Conserved RNA secondary structures promote alternative splicing. **Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press** . 14: 1463-1469, 2008.

- Siendones, E., Barbarroja, N., Torres, L.A., Buendy, P., Velasco, F., Dorado, G., Torres, A., Pedrera, C.L. Inhibition of Flt3-activating mutations does not prevent constitutive activation of ERK/Akt/STAT pathways in some AML cells: a possible cause for the limited effectiveness of monotherapy with small-molecule inhibitors **Hematol Oncol.** 25: 30–37. 2007.
- Siomi, H., Matunis, M.J., Michael, W.M., Dreyfuss, G. The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *NucleicAcids Res.* 21, 1193–1198, 1993.
- Sloand, E.M.; Pfannes, L.; Chen, G.; Shah, S.; Solomou, E.E.; Barrett, J.; Young, N.S. CD34 cells from patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome (MDS) express early apoptotic markers but avoid programmed cell death by up-regulation of antiapoptotic proteins. **Blood.** 109: 2399-2405, 2007.
- Smith, C.W.J., Valcárcel, J. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. **TIBS.** 381-399, August, 2000.
- Smith, R.k.; Carroll, P.M.; Allard, J.D.; Simon, M.A.; MASK, a large ankyrin repeat and KH domain-containing protein involved in Drosophila receptor tyrosine kinase signaling. **Development.** 129, 71-82, 2002.
- Smith, A.; Wisloff, F.; Samson, D. Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma 2005. **British Journal of Haematology,** 132, 410–451, 2005.
- Steelman, L.S., Pohnert, S.C., Shelton, J.G., Franklin, R.A., Bertrand, F.E., McCubrey, J.A. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. **Leukemia.** 18, 189–218, 2004.
- Steffen, B., Tidow, C.M., Schwable, J., Berdel, W.E., Serve, H. The molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology.** 56 195–221
- Tartaglia, M., Niemeyer, C. M., Fragale, A., Song, X., Buechner, J., Jung, A., et al. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. **Nat Genet,** 34(2): 148-150, 2003.

- Tartaglia, M., Martinelli, S., Cazzaniga, G., Cordeddu, V., Iavarone, I., Spinelli, M., et al. Genetic evidence for lineage-related and differentiation stage-related contribution of somatic PTPN11 mutations to leukemogenesis in childhood acute leukemia. **Blood**, 104(2): 307-313, 2004a.
- Tartaglia, M., Niemeyer, C. M., Shannon, K. M. and Loh, M. L. SHP-2 and myeloid malignancies. **Curr Opin Hematol**, 11(1): 44-50, 2004b.
- Traina, F., Favaro, P.M.B., Medina, S. de S., Duarte, A, da S.S., Winnschofer, S.M.B., Costa, F.F., Saad, S.T.O. ANKHD1, Ankyrin Repeat and KH Domain Containing 1, is overexpressed in acute leukemias and is associated with SHP2 in K562 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1762(9): 828-834, 2006.
- Tehranchi, R., Invernizzi, R., Grandien, Alf., Zhivotovshy, Fadeel, B., Forsblom, A.M., Travaglino, E., Samuelson, J., Hast, R., Nilsson, L., Cazzola, M., Wibom, R., Lindberg, E.H. Aberrant mitochondrial iron distribution and maturation arrest characterize early erythroid precursors in low-risk myelodysplastic syndromes. **Blood**. 106: 247-253, 2005.
- Testa, U., Riccioni, R. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. **Progress in Hematology**. 92:81-94, 2007.
- Timmer, J.C.; Salvesen, G.S, Caspase substrates. **Cell Death and Differentiation**. 14, 66–72, 2007.
- Wang, L.H.; Yang, X.Y.; Zhang, X.; Farrar, W.L. Inhibition of adhesive interaction between multiple myeloma and bone and marrow stromal cells by PPAR $\{\gamma\}$ cross talk with NF- $\{\kappa\}$ B C/EBP. **Blood**. 110: 4373-4384, 2007.
- Wu, C. J., O'Rourke, D. M., Feng, G. S., Johnson, G. R., Wang, Q. and Greene, M. I. The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for mediating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation by growth factors. **Oncogene**, 20(42): 6018-6025, 2001.
- Verdelli, D.; Mattioli, M.; Fabris, S.; Nobili, L.; Intini, D.; Gueneri, S.; Todoerti, K.; Zanella, A.; Deliliers, G. L.; Lombardi, L.; Neri, A. Molecular and biological characterization of three novel interleukin-6-dependent human myeloma cell lines. **Haematologica**. 90:1541-1548, 2005.

- Xu, F-h.; Sharma, S.; Gardner, A.; Tu, Y.; Raitano, A.; Sawyers, C.; Lichtenstein, A. Interleukin-6-Induced Inhibition of Multiple Myeloma Cell Apoptosis: the Support for the Hypothesis That Protection Is Mediated Via Inhibition of JNK/SAPK Pathway. **Blood**. 92: 241-251, 1998.
- Xu, R., Yu, Y., Zheng, S., Zhao, X., Dong, Q., He, Z., Liang, Y., Lu, Q., Fang, Y., Gan, X., Xu, X., Zhang, S., Dong, Q., Zhang, X., Feng, S. Overexpression of Shp2 tyrosine phosphatase is implicated in leukemogenesis in adult human leukemia. **Blood**. 106:3142-3149, 2005.
- Yamamoto, K., Abe, S., Nakagawa, Y., Suzuki, K., Hasegawa, M., Inoue, M., Kurata, M., Hirokawa, K., Kitagawa, M. Expression of IAP family proteins in myelodysplastic syndromes transforming to overt leukemia. **Leukemia Research**. 28: 1203-1211, 2004.
- Zhang, S. Q., Tsiaras, W. G., Araki, T., Wen, G., Minichiello, L., Klein, R., et al. Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2. **Mol Cell Biol**, 22(12): 4062-4072, 2002.
- Zhao, W., Kitidis, C., Fleming, M.D., Lodish, H.F., Ghaffari. Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway **Blood**. 107:907-915, 2006.

ANEXOS

Anexo I



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas, SP
☎ (0__19) 3788-8936
fax (0__19) 3788-8925
✉ cep@hepar.fam.unicamp.br

CEP, 19/11/02
(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 458/2002

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS GENES HUMANOS RELACIONADOS AOS GENES DAS PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO DE ESPECTRINA"
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sara Teresinha Olalla Saad
INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 21/10/2002

II - OBJETIVOS

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

Anexo I (continuação)

III - SUMÁRIO

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

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

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

V - PARECER DO CEP

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

Anexo I (continuação)

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

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

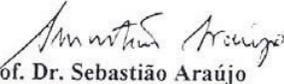
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também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

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

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

VII - DATA DA REUNIÃO

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


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

Anexo II



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

PARECER Nº 183/2003

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

Registro CEP: 458/2002

Processo nº 25000.149169/2002-39

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

Pesquisador Responsável : Dr. Sara Terezinha Olalla Saad

Instituição: Faculdade de Ciências Médicas / UNICAMP

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

Descrição do Estudo:

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

Considerações

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

Anexo II (continuação)

Cont. Parecer CONEP 183/2003

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

Entretanto, solicita-se que :

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

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

Situação : Projeto aprovado com recomendação

Brasília, 05 de fevereiro de 2003


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS MS

Anexo III



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

PARECER Nº 1906/2002

Registro CONEP: 7010 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 454/2002

Processo nº 25000.149204/2002-49

Projeto de Pesquisa: "Caracterização da expressão gênica de plasmócitos em pacientes com mieloma múltiplo".

Pesquisador Responsável: Dr.ª. Manoela Marques Ortega

Instituição: Faculdade de Ciências Médicas / UNICAMP

Área Temática Especial: Genética Humana

OBJETIVOS

- Determinar o perfil da expressão gênica de plasmócitos da Medula Óssea de paciente com Mieloma Múltiplo (MM) ao diagnóstico, por meio da comparação com o perfil de expressão gênica de plasmócitos da MO de um indivíduo normal, pela técnica SAGE
- Validar os resultados obtidos pela técnica SAGE para genes diferentemente expressos e de interesse, em um grupo de pacientes com MM, com a quantificação da expressão destes genes por meio da reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR) e com a quantificação das proteínas por eles codificadas por meio do método de Western blot.

Serão avaliados do ponto de vista clínico e laboratorial, 10 pacientes com MM secretores de imunoglobulina do tipo IgG, ao diagnóstico, atendidos no Ambulatório de Onco-hematologia do Hemocentro da UNICAMP.

Um indivíduo normal, doador de MO, atuará como controle para todas as técnicas utilizadas no estudo.

Aspectos do MM, como etiologia e fisiopatologia que ainda estão por ser determinados com exatidão, justificam busca de maiores conhecimentos sobre a doença.

Ao se proceder à análise do protocolo em questão, considerou-se que:

A estrutura do protocolo adequada. O estudo molecular será realizado em amostras de MO obtidas por ocasião da coleta de MO para o estudo citológico necessário à confirmação diagnóstica da doença em pacientes, e por ocasião da doação de MO no controle. Não será coletado nenhum material extra.

De acordo com a pesquisadora, "embora pareça evidente que a desregulação de oncogenes, genes supressores tumorais e de genes comprometidos com a angiogênese, ocorra na MM, é possível que outros genes com a expressão aumentada ou diminuída, ainda não descritos, desempenhem papéis tão ou mais prioritários na origem ou progressão da doença".

O Termo de Consentimento é claro, elaborado conforme o estabelecido pela resolução 196/96

O orçamento é apresentado, e informa que o projeto está sendo encaminhado à FAPESP para solicitação de bolsa de doutorado e de auxílio pesquisa

O parecer do CEP: Bem fundamentado e elaborado, aprova sem restrições o estudo proposto

Anexo III (continuação)

Cont. Parecer CONEP nº 1906/2002

As informações enviadas atendem, de modo geral, aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96, e complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Recomenda-se que seja disponibilizado o nome da pesquisadora no termo de consentimento e não apenas da orientadora

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta – se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, com a recomendação explicitada acima, a ser acompanhada pelo CEP.

Situação : Projeto aprovado com recomendação

Brasília, 12 de dezembro de 2002.



WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

APÊNDICES

Apêndice I

Artigo Publicado

Characterisation of a new splice variant of MASK-BP3ARF and MASK humangenes, and their expression patterns during haematopoietic cell differentiation. Adriana da Silva Santos Duarte, Fabíola Traina, Patricia M. Bergamo Favaro, Daniela Sanchez Bassères, Iara Campos de Carvalho, Samuel de Souza Medina, Fernando Ferreira Costa, Sara Teresinha Olalla Saad. *Gene*. 2005, 363: 113-122

Characterisation of a new splice variant of *MASK-BP3^{ARF}* and *MASK* human genes, and their expression patterns during haematopoietic cell differentiation

Adriana da Silva Santos Duarte^a, Fabíola Traina^a, Patricia M. Bergamo Favaro^a,
Daniela Sanchez Bassères^a, Iara Campos de Carvalho^a, Samuel de Souza Medina^a,
Fernando Ferreira Costa^{a,b}, Sara Teresinha Olalla Saad^{a,b,*}

^a Centro de Hematologia e Hemoterapia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP 13083-970, Brazil

^b Departamento de Clínica Médica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP 13083-970, Brazil

Received 19 December 2003; received in revised form 5 January 2005; accepted 11 August 2005

Received by F. Salvatore

Abstract

In this study we report the characterisation of a new splice variant, here denominated splice variant 4 (accession number AF258557) of the human Multiple Ankyrin repeats Single KH domain (hMASK) (accession number AF521882) and the hMASK-4E-Binding Protein 3 Alternative Reading Frame (hMASK-BP3^{ARF}) (accession number AF521883), containing a number of ANK-repeat motifs. Ankyrin (ANK) repeat-containing proteins carry out a wide variety of biological activities and are involved in processes, such as cell differentiation and transcriptional regulation. The present study reports the computer analysis of these splice variant cDNAs and their broad mRNA expression in different normal human tissues and cancer cell lines. An upregulation of the splice variant mRNAs expression was observed after HL-60 and erythroblast differentiation. The upregulation of *splice variant 4* mRNA was considerably higher than those of the other variants, during erythroid differentiation. © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Ankyrin repeat domain; Alternative splicing; Haematopoietic cell differentiation

1. Introduction

MASK protein (Multiple Ankyrin repeats Single KH domain) was first described in *Drosophila melanogaster* and was shown to be crucial for photoreceptor differentiation, cell survival and proliferation (Smith et al., 2002). The Ankyrin

(ANK)-repeat is one of the most common protein sequence motifs, which leads to its own variation in overall domain size by simple sequence duplication or deletion. Thus, ANK-repeat proteins do not bind selectively to a single class of protein target. Rather, the diversity of biological roles of ANK-repeat proteins is paralleled by the diversity of unrelated proteins with which they interact (Sedgwick and Smerdon, 1999). Functions of these proteins vary widely and include, for example, proteins that control cell differentiation and transcriptional factors (Michaely and Bennett, 1993). The K homology (KH) domain, which is present in hMASK and hMASK-BP3^{ARF}, was first identified in the human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. This domain possesses approximately 70 amino acids and is present in a wide variety of fairly diverse nucleic acid-binding proteins (Gibson et al., 1993; Siomi et al., 1993). The function of the KH domain in hMASK-BP3^{ARF} and hMASK is still uncertain.

Herein, we report the characterisation of a new splice variant, denominated splice variant 4 (accession number AF258557) of

Abbreviations: ANK, ankyrin; KH, K homology domain; ATRA, all-*trans*-retinoic acid; EST, expressed sequence tag; NCBI, National Center for Biotechnology Information; BLAST, basic local alignment search tool; hMASK, human Multiple Ankyrin repeats Single KH domain; hMASK-BP3^{ARF}, human Multiple Ankyrin repeats Single KH domain-4E-BP3 Alternative Reading Frame; EIF4EBP3, Eukaryotic Initiation Factor 4E-Binding-Protein 3; 4E-BP3, 4E-Binding Protein 3; RACE, Rapid amplification of cDNA ends; RTK, receptor tyrosine kinase; MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinase.

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

E-mail address: sara@unicamp.br (S.T.O. Saad).

hMASK (accession number AF521882) and hMASK-BP3^{ARF} (accession number AF521883) (Poulin et al., 2003), containing a number of ANK-repeat motifs. The present study reports the computer analysis of these splice variant cDNAs and their expression in different normal human tissues and cancer cell lines. Furthermore, we report the mRNA expression of these splice variants during haematopoietic cell differentiation.

2. Materials and methods

2.1. Computational analysis

In order to identify new potential cytoskeletal proteins as a part of our functional genomics project, we searched the ORESTES database (available at <http://www.ludwig.com.br>) using keyword search against all expressed sequence tags (ESTs) classified as potential paralogs. Among other ESTs, *RC3-CT0255-200100-024-c05* (GenBank Accession No. AW854359) was selected and further analysed through similarity searches against different databases available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI), using the BLAST search algorithm (available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Prosite database searches were performed at <http://www.expasy.cbr.nrc.ca/tools>, using the InterProScan search tool. We also used the sim4 software (downloaded from <http://globin.cse.psu.edu>) to compare all splice variant cDNAs with their genomic DNA regions to obtain their exon–intron structures. Internal donor sites were predicted by NetGene2 Server (www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2). Polyadenylation signals were predicted by the software program *Polyadq* (Tabaska and Zhang, 1999) (http://rulai.cshl.org/tools/polyadq/polyadq_form.html) and *Erpin* (Legendre and Gautheret, 2003) (<http://tagc.univ-mrs.fr/erpin/>).

2.2. Subjects

Mononuclear cells from peripheral blood and bone marrow of normal controls were obtained by Ficoll–Hypaque gradient separation for RNA extraction. Human tissues were obtained from autopsy. The National Ethical Committee has approved the study.

2.3. Cell lines

Human cancer cell lines were obtained from ATCC, Philadelphia, PA.

2.4. PCR and sequencing

The in silico inclusion of new sequences to the transcript of splice variant 4 was confirmed experimentally using PCR of K562 cell line cDNA. The cDNA was obtained by reverse transcription of K562 cell line poly(A)+ mRNA using Superscript II (Invitrogen Life technologies). Primers were designed using the GeneRunner software (available at <http://www.generunner.com>) and their sequences are available upon request. A schematic representation of the location of the primers in relation to the transcript sequence is depicted in Fig. 1A. Amplified products (Fig. 1B) were purified and sequenced in an ABI310 prism automated sequencer. The chromatograms obtained were assembled using the Phred/Phrap/Consed software package (<http://www.phrap.org>).

2.5. Rapid amplification of cDNA ends (RACE)

The 3' RACE was performed according to the 3' RACE System (Life Technologies) protocol. In this case reverse transcription was carried out using the 3' RACE adapter primer

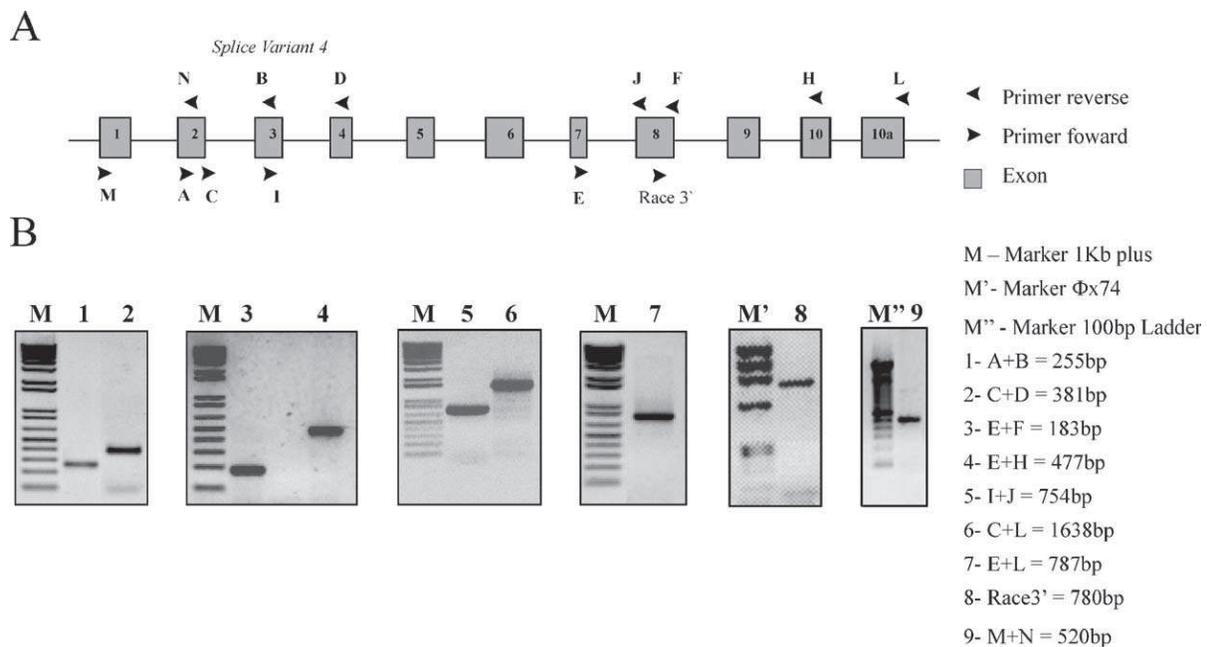


Fig. 1. (A) Schematic representation of the set of primers designed to confirm the splice variant 4 cDNA sequence and to obtain the 3' end sequences by RACE. Letters were used to designate the primers. (B) Amplified products obtained from the combination of the set of primers described above.

(supplied in the kit). RACE-PCR and nested PCR were performed with designed primers (Fig. 1).

2.6. Northern blotting

Two different probes were amplified from human brain cDNA or K562 cells cDNA, labelled with [α - 32 P]dATP, according to the Megaprime Labeling Kit (Amersham) protocol and used for hybridisation to poly(A)⁺ mRNA isolated from different normal and human cancer tissues from Clontech, CA, USA, and also from others human cancer cell lines. The probes were: (1) a 782 bp probe spanning a common region of the splice variant 4, splice variant 5, the hMASK and the hMASK-BP3^{ARF} mRNAs (from exon 7 to 10A); (2) a 963 bp probe from 5971 to 6933 bp, exon 29 and 30, spanning a specific region of hMASK and the hMASK-BP3^{ARF} mRNAs. Fig. 2A shows the localization of each probe.

2.7. HL-60 cell culture

HL-60 cells (ATCC) were cultivated in RPMI Medium (Life Technologies) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) (Life Technologies) at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ with extra humidity. The cells were treated with 10⁻⁶ M all-trans-retinoic acid (ATRA). Cells were harvested on days 0 and 6 after addition of ATRA and the corresponding total RNAs were isolated according to the Trizol Reagent Protocol (Life Technologies).

2.8. Two-phase stem cell culture

Peripheral blood mononuclear cells from control blood donors were separated by centrifugation in a Ficoll–Hypaque gradient and cultured for 1 week in α minimal essential medium supplemented with 30% FBS (Life Technologies) at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ with extra humidity. The non-adherent cells were harvested and re-cultured in α medium containing 30% FBS, 1% bovine serum albumin, 10⁻⁵ mmol/L 2-mercaptoethanol, 1.5 mmol/L glutamine, 10⁻⁶ mol/L dexamethasone, and 2 U/ml recombinant erythropoietin. The secondary cultures were incubated at 37 °C in an extra-humid sealed incubator in an atmosphere of 5% O₂, 5% CO₂, and 90% N₂ (Fibach et al., 1989). Cells were harvested on days 0, 7, 9 and 12 after induction of erythroid differentiation with erythropoietin and the corresponding RNAs were isolated according to the Trizol Reagent Protocol (Life Technologies).

2.9. Characterisation of cell differentiation

Cell maturation was evaluated on the basis of cellular morphology and changes in cell surface antigen. Briefly, cytospin slides stained with Leishman were analysed for cell morphology by means of light microscopy. Analysis of cell surface antigen was performed by flow cytometry with a FACS-calibur (Becton-Dickinson, CA, USA). For myeloid differentiation, 5 × 10⁵ HL-60 cells were collected, washed and stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mAb for CD14 and phy-

coerythrin (PE)-conjugated mAb for CD15. These aliquots were mixed gently and incubated for 20 min at 4 °C in the dark, washed and resuspended in staining buffer (PBS-BSA). Data from 10,000 events were acquired and the mAb binding was measured by flow cytometry relative to isotype-matched control antibodies. Analysis of cell surface antigens for erythroid differentiation was performed by dual staining using a FITC-conjugated anti-transferrin receptor and PE-conjugated anti-glycophorin A for 30 min at 4 °C in the dark, as previously described (Santos Duarte Ada et al., 2002).

2.10. Reverse transcription

One μ g RNA samples were incubated with 1 U DNaseI (Life Technologies) for 15 min at room temperature and EDTA was added to a final concentration of 2 mM to stop the reaction. The enzyme was subsequently inactivated for 10 min at 65 °C. The DNaseI-treated RNA samples were reverse transcribed with 200U SuperScript II (Life Technologies) for 50 min at 42 °C. Two U RNaseH (Life Technologies) were subsequently added and the samples were incubated at 37 °C for 20 min. The cDNA samples were quantified using the UV spectrophotometer, GeneQuant (Pharmacia).

2.11. Real-time quantitative PCR

Real-time detection of amplification was performed in an ABI 5700 Sequence Detector System (Applied Biosystems) using SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). Fifteen ng of each cDNA sample were used in the reaction using the following primers: (1) 600 nM of β -actin control forward and reverse primers; (2) 400 nM of splice variant 5 forward and reverse primer (FW: 5'-ATTTAGACAAGCAGGAGGACATGAAGAC-3'; RW: 5'-CTTGCAGCTTTCATCAAAGGTGTTCC-3'); (3) 1200 nM of splice variant 4 forward and reverse primers (FW: 5'-ATACGCATGTTGCAGATGTTTACTT-3'; RW: 5'-GGCCACCCTCACCTGATG-3'); (4) 400 nM of hMASK cDNAs forward and reverse primers (FW: 5'-CCTGCTTGGAACCCTCTGATAAA-3'; RW: 5'-CGTGCCAGGCCAAATCTG-3'); (5) 1200 nM of hMASK-BP3^{ARF} cDNAs forward and reverse primers (FW: 5'-CGATGGTGGCCTCTCCTAAC-3'; RW: 5'-CTTGCACCTCCAGCAGGAACCT-3'). A negative control, no template controls, were also included for each primer pair. The dissociation protocol was performed at the end of each run to check for non-specific amplification. Four replicas were run on the same plate for each sample.

2.12. PCRs for detection of AK074173 based on the presence or absence of exon 10A

In order to confirm the authenticity of AK074173, two specific primers were designed in exon 10 to 11 of hMASK-BP3^{ARF} and hMASK cDNA, which includes the 57 nt region of exon 10A from splice variant 5: FW: 5'-GGAGACACAGCCTTAACCTATGCTTG-3'; RW: 5'-GCACCTTTGCTAATAAGAACTGCACAG-3'. K-562 cDNA was used in the PCR reaction. PCR reaction using K562 cDNA and specific primers to splice

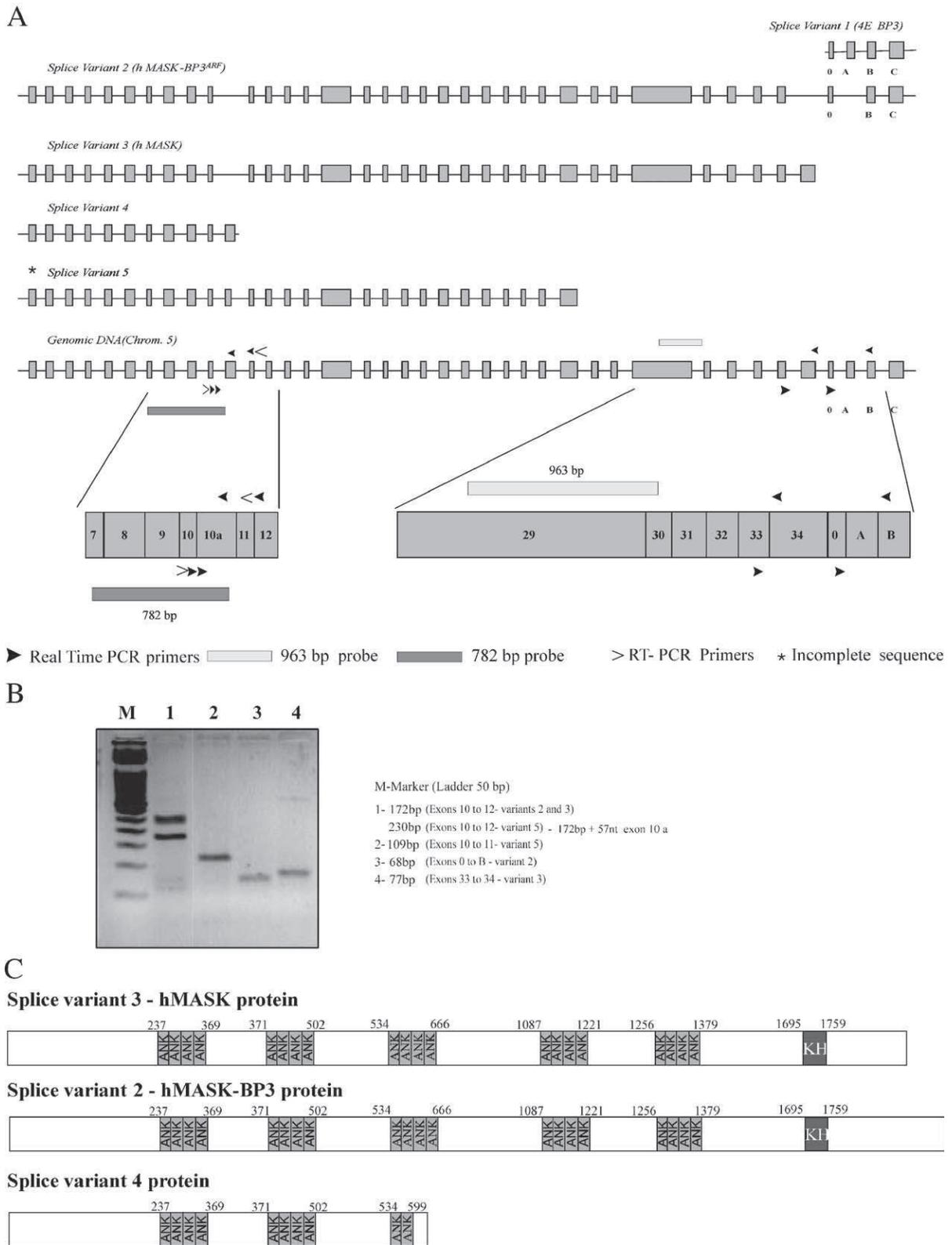


Fig. 2. (A) Schematic view of the gene in chromosome 5 (band 5q31.3) and of the mRNA of splice variant 1 (4E-BP3) (GenBank Accession No. AC005214), splice variant 2 (*hMASK-BP3^{ARF}*) (GenBank Accession No. AF521883), splice variant 3 (*hMASK*) (GenBank Accession No. AF521882), splice variant 4 (GenBank Accession No. AF258557) and splice variant 5 (GenBank Accession No. AK074173). Boxes represent exons. Arrows represent the primers used for the Real Time PCR or Reverse Transcription PCR (RT-PCR). Bars represent the probes used for the Northern Blotting assay. (B) Identification of isoforms by RT-PCR. (C) Schematic presentation of hMASK protein, hMASK-BP3^{ARF} protein and splice variant 4 protein. Boxes indicate protein domains; Ankyrin domain is represented by ANK, K homology domain is represented by KH. The position of the first and last amino acid in each domain is shown.

variant 5 (exon 10A to exon 12) (FW: 5'-ATTTAGACAAGC-AGGAGGACATGAAGAC-3'; RW: 5'-CTTGCACTTTCA-TCAAAGGTGTTTC-3'); hMASK (exon 33 to 34) (FW: 5'-CCTGCTTGGAAACCCTCTGATAAA-3'; RW: 5'-CGTGCCAGGCCAAATCTG-3') and hMASK-BP3^{ARF} (exon 0 to B) (FW: 5'-CGATGGTGGCCTCTCCTAAC-3'; RW: 5'-CTTGCACTCCAGCAGGAACCTT-3') were also performed and revealed the specific bands of each isoform (Fig. 2B); these primers were also used in the real time PCR reaction, as described above.

3. Results

3.1. Identification of splice variant 4 and 5 of hMASK and hMASK-BP3^{ARF}

In a search of the ORESTES database, generated from the Human Cancer Genome Project (Dias Neto et al., 2000), for ESTs similar to known cytoskeletal proteins (or proteins related to them), the EST RC3-CT0255-200100-024-c05 (GenBank

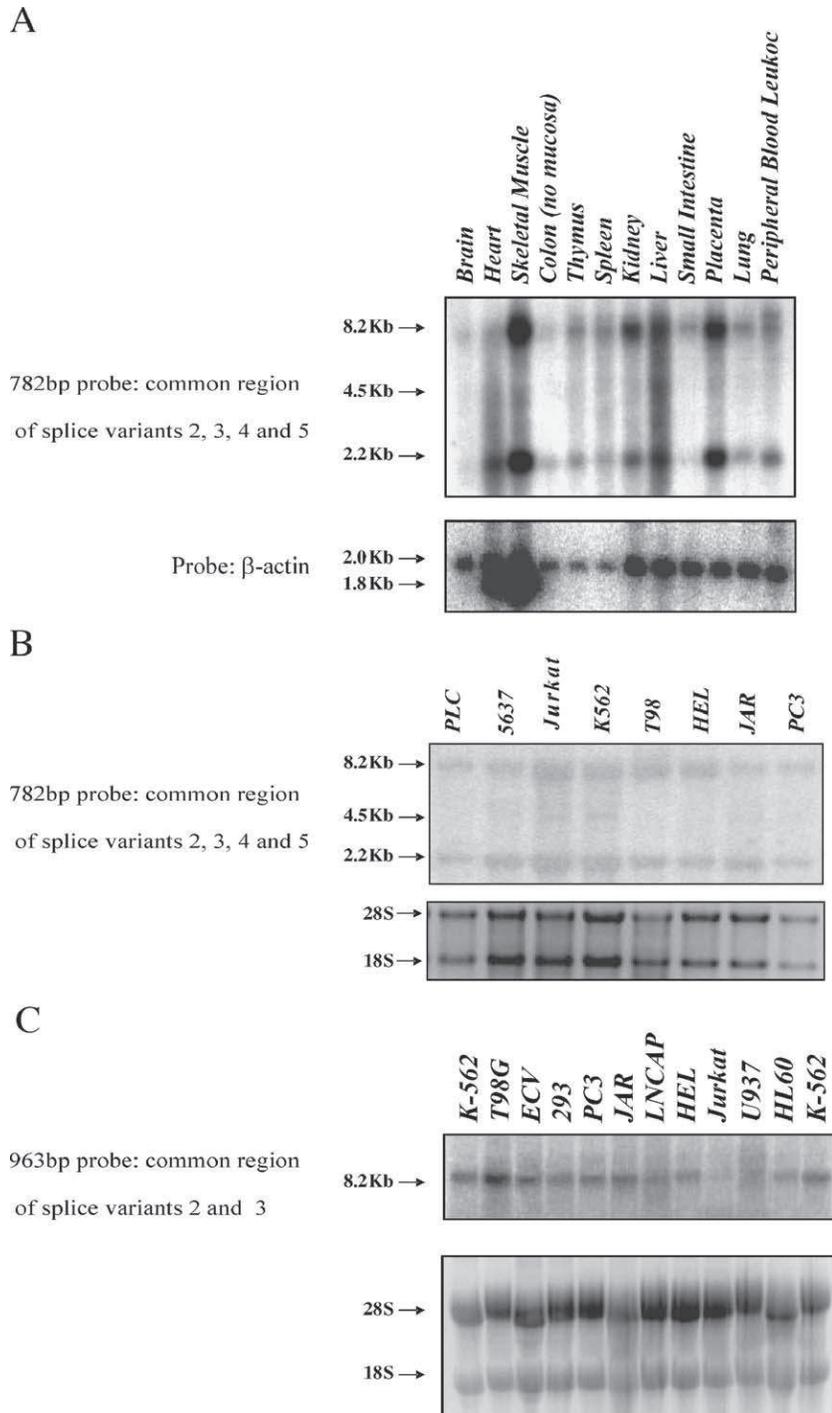


Fig. 3. (A, B) Northern blot analysis using the 782 bp probe spanning a common region of splice variant 2 (*hMASK-BP3^{ARF}*), 3 (*hMASK*), 4 and 5 in normal human tissues and in human cancer cell lines. (C) Northern blot analysis using the 963 bp probe spanning a common region of splice variant 2 and 3.

Accession No. AW854359) was found. This EST (499 bp) was isolated from human colon tumour, and was observed to be similar to ANK-repeat proteins. In an attempt to obtain the full-length sequence of this partial cDNA, similarity searches against the human genome database at NCBI were performed. The EST sequence was similar to four cDNA sequences deposited in the GenBank database (accession number AF521883, AF521882, AF258557 and AK074173). According to a previous report (Poulin et al., 2003), the AF521883 is referred to as splice variant 2 and encodes the hMASK-BP3^{ARF} protein; AF521882 sequence is referred to as splice variant 3 and encodes the hMASK protein.

Primers were designed according to the sequence AF258557, and PCR and sequencing methods validated our finding. Rapid amplification of cDNA ends (RACE) was also performed to obtain the 3' end sequences. Using this approach, the whole coding sequence was confirmed (Fig. 1) and we now propose that the AF258557 sequence be referred to as splice variant 4.

The AK074173 sequence we propose to be referred to as splice variant 5. In order to confirm the authenticity of AK074173, a PCR reaction was performed using specific primers, designed in exon 10 to 11 of hMASK-BP3^{ARF} and hMASK cDNA and revealed two bands: one of 172 bp corresponding to the amplification of hMASK-BP3^{ARF} and hMASK cDNA, and other band of 229 bp, corresponding to the amplification of splice variant 5 (172 bp plus the 57 nt of exon 10A) (Fig. 2B). The whole coding sequence of AK074173 was not obtained and was not the issue of this study.

Splice variant 1 has already been defined as the *Eukaryotic Initiation Factor 4E-Binding-Protein 3 (EIF4EBP3)* gene (accession number AC005214), which codes for the 4E-binding protein 3 (4E-BP3), a member of the eukaryotic Initiation Factor 4F-binding protein family of translational repressors (Poulin et al., 2003). 4E-BP3 protein does not contain ANK-repeat motifs, and will not be the subject of this study.

3.2. Computer analysis of the four splice variant genes coding for ANK-repeat proteins

Computer-generated genomic analysis revealed that the isoforms that code for the four ANK-repeat proteins present identity with one contig on the long arm of chromosome 5 (band 5q31.3): NT_029289.10. An alternative 3' splicing generates the splice variant 3, 4 and 5. The full-length cDNA of *splice variant 4* is approximately 2.2 kb and sim4 comparison (Florea et al., 1998) of the chromosome 5 suggests that the cDNA is composed of 11 exons, with a poly (A+) signal in the 10A exon. The cDNA for hMASK, splice variant 3, is approximately 8.1 kb, and lacks the 10A exon, containing the poly(A+) signal, generating 34 exons. The cDNA for hMASK-BP3^{ARF}, splice variant 2, results from read-through transcription of *MASK* exons, followed by alternative splicing at an intermediate exon (exon 0) and fusion with the two last exons of the *EIF4EBP3* cDNA (exons B and C), generating 36 exons (Fig. 2A), approximately 8.2 kb (Poulin et al., 2003). It is important to point out that the complete cDNA sequence of AK074173,

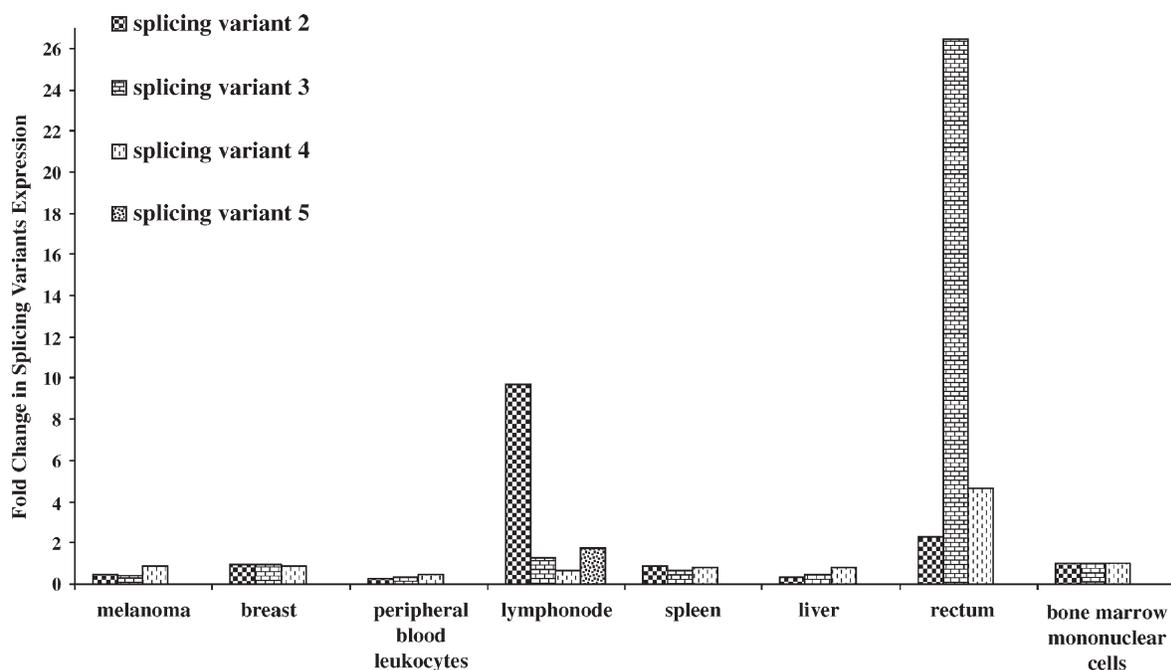


Fig. 4. Real time PCR was performed on total RNA extracted from a panel of human tissues. The expression levels of splice variant 2 (*hMASK-BP3^{ARF}*), 3 (*hMASK*), 4 and 5 mRNAs were quantified and normalized to the levels of β -actin present in each sample. The expression levels of each splice variant were compared to those of the splice variants in the bone marrow, used as the standard sample. The analysis was performed with transcript-specific primer pairs as described under "Materials and methods" and depicted in Fig. 2A.

with start and stop codon, here denominated splice variant 5, has not been deposited in the database yet. However, its authenticity was here confirmed by PCR (Fig. 2A and B). AK074173 has only 57 bp of exon 10A, and spliced to exon 11 (Fig. 2A). Sim4 comparison (Florea et al., 1998) of chromosome 5 suggests that the AK074173 is composed of 27 exons, including only 57 bp of the exon 10A, and could be detected by Northern Blot as a band of 4.5 kb.

The splice variant 4 mRNA codes for a 627 amino acid protein. The polypeptide contains 10 ANK-repeats motifs organised into two 4-repeat and two single-repeat domains. Splice variant 3 encodes a predicted 2542 amino acid protein, which is comprised of 20 ANK-repeats organised into five 4-repeat domains and a KH domain at the C-terminal portion. This polypeptide is highly similar to the *Drosophila melanogaster* protein MASK. The *hMASK-BP3^{ARF}* mRNA encodes a predicted 2617 amino acid protein. Its first 2523 residues are identical to those of hMASK, and they encompass the two blocks of ankyrin repeats as well as the KH domain. The last 94 amino acids result from the translation of exon 0, and an alternative reading frame of exons B and C (Poulin et al., 2003). The four splice variant proteins share the first 10 ANK-repeat motifs (Fig. 2C).

3.3. Expression of *hMASK-BP3^{ARF}*, *hMASK*, splice variant 4 and 5 mRNAs in human tissues and cell lines

Northern blot analysis using the 782 bp probe of poly(A)⁺ RNA isolated from a panel of different human normal tissues revealed two mRNA bands of approximately 2.2 and 8.2 kb (Fig. 3A), which correspond to the splice variant 4 mRNA, *hMASK-BP3^{ARF}* and *hMASK* mRNAs, respectively. Expression of the splice variant 4 mRNA, *hMASK-BP3^{ARF}* and *hMASK* mRNAs was detected in different human normal tissues: brain, heart, skeletal muscle, colon, thymus, spleen, kidney, liver, small intestine, placenta, lung and peripheral blood leukocytes. Wide expression was observed among cancer cell lines: PLC, 5637, Jurkat, K-562, T98G, HEL, JAR and PC3 (Fig. 3B). In most tissues and cell lines, the expression of isoform 4 (2.2 kb) was higher than the other isoforms (8.2 kb). A very subtle band of 4.5 kb was observed only in heart, skeletal muscle, liver, K-562, Jurkat and HEL cell lines (Fig. 3A and B). We may speculate that the 4.5 kb band corresponds to the splice variant 5 isoform, as predicted by sim4 comparison (Florea et al., 1998) of chromosome 5. Northern blot analysis using the 963 bp probe, located in the 3' end, revealed one mRNA band of approximately 8.2 kb (Fig. 3C), which corresponds to the *hMASK-BP3^{ARF}* and *hMASK* mRNAs, in cancer cell lines.

The expression of a specific region of *hMASK-BP3^{ARF}*, *hMASK* mRNAs, splice variant 4 and 5 mRNA was analysed by Real-time PCR of different human tissues: melanoma, breast, peripheral blood leukocytes, lymphonode, spleen, kidney, liver, intestine, and bone marrow mononuclear cells. Splice variant 5 was expressed only in lymphonode. Therefore, the *hMASK-BP3^{ARF}*, *hMASK* and

splice variant 4 mRNAs were expressed in all tissues here studied (Fig. 4).

3.4. *hMASK-BP3^{ARF}*, *hMASK* and splice variant 4 and 5 mRNAs are upregulated during cell differentiation

In an attempt to verify if these ANK repeat splice variants are implicated in cell differentiation, the expression of a specific region of *hMASK-BP3^{ARF}*, *hMASK* mRNAs, splice variant 4 and 5 mRNA were analysed, using the haematopoietic system as a model. Real-time PCR of HL-60 cells was performed after induction of myeloid differentiation with ATRA, an anti-tumour and differentiation-inducing agent. Six days after induction of HL-60 cell differentiation with ATRA, a five fold upregulation of isoform 4 and, approximately three-fold upregulation of the other isoform mRNA expressions was verified (Fig. 5).

Real-time PCR of haematopoietic stem cells after induction of erythroid differentiation with erythropoietin was also performed. After 12 days of differentiation, we observed seven-fold increase in the expressions of splice variant 4 mRNA and a

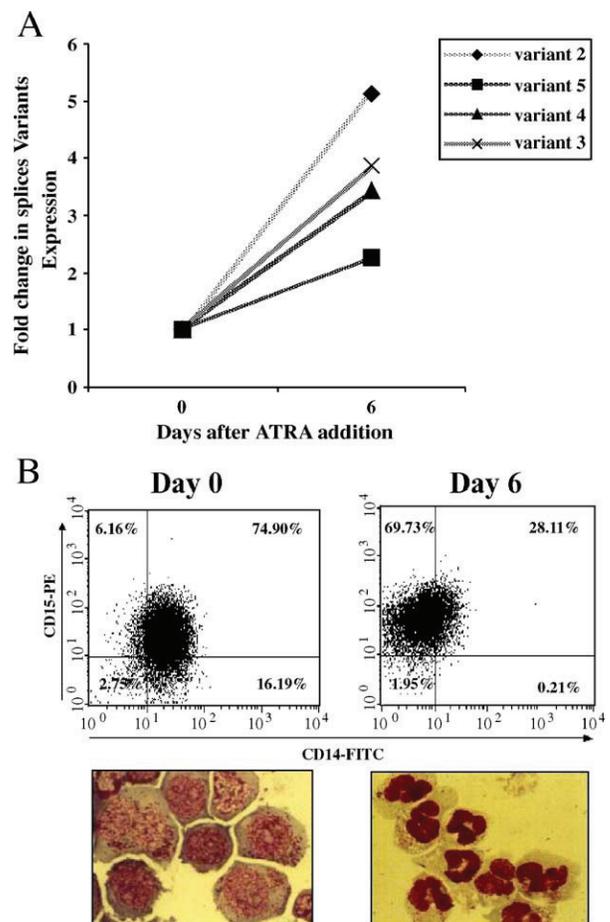


Fig. 5. (A) Real Time PCR detection of the expression of splice variant 2 (*hMASK-BP3^{ARF}*), 3 (*hMASK*), 4 and 5 mRNAs during HL-60 cells differentiation at the day 0 and 6 after 10^{-6} M ATRA addition. Each value represents the mean \pm SD of 4 independent experiments. (B) Characterisation of cell differentiation on the basis of cellular morphology and changes in cell surface antigen (flow cytometry expression of CD14-FITC and CD15-PE) during ATRA-induced differentiation of HL-60 cells.

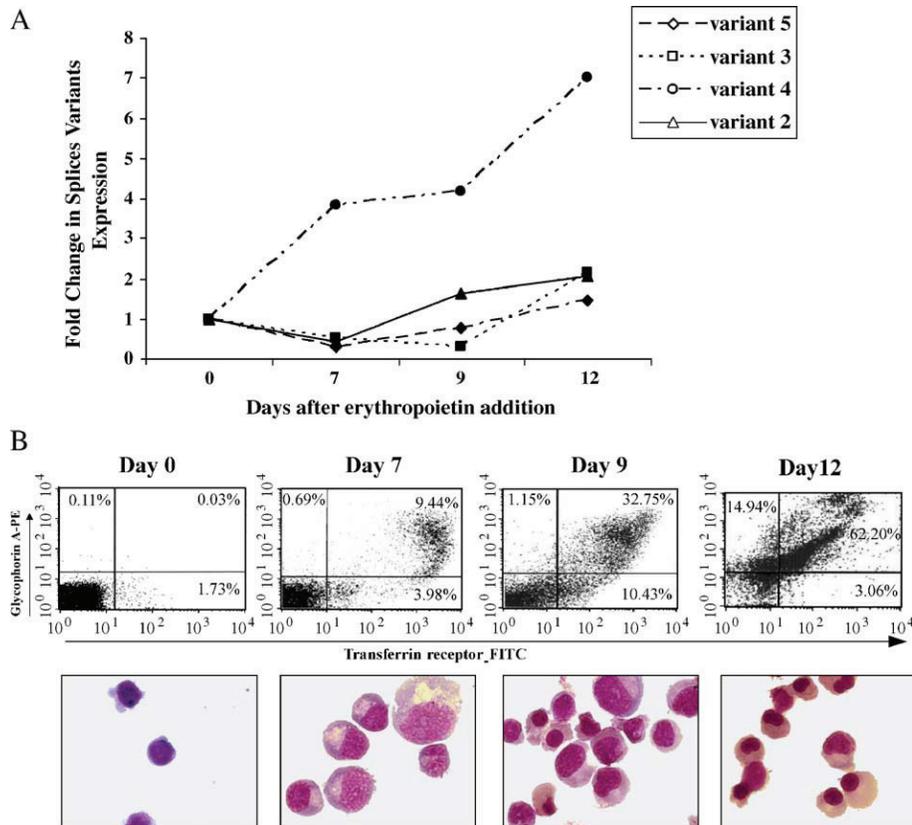


Fig. 6. (A) Real Time PCR detection of the expression of splice variant 2 (*hMASK-BP3^{ARF}*), 3 (*hMASK*), 4 and 5 mRNAs during erythroid differentiation of haematopoietic stem cells at 0, 7, 9 and 12 days after 2 U/ml recombinant erythropoietin addition. Each value represents the mean \pm SD of 4 independent experiments. (C) Characterisation of cell differentiation on the basis of cellular morphology and changes in cell surface antigen (flow cytometry expression of transferrin receptor-FITC and glycophorin-PE) during erythropoietin-induced differentiation of haematopoietic stem cells.

two-fold increase of the *hMASK-BP3^{ARF}*, *hMASK* and splice variant 5 mRNAs (Fig. 6).

4. Discussion

We report the characterisation of a new splice variant, here denominated splice variant 4 of the *hMASK-BP3^{ARF}* and the *hMASK*, containing a number of ANK-repeat motifs. These isoforms present a broad expression in human normal tissues and cancer cell lines. *hMASK-BP3^{ARF}* is a gene fusion of *hMASK* with the two last exons of the *4E-BP3* gene (Poulin et al., 2003). *hMASK* gene is upstream of *4E-BP3* and located in chromosome 5, band 5q31.3. An alternative 3' splicing in exon 10A generates the splice variant 4 and AK074173, here denominated splice variant 5. The complete cDNA sequence of AK074173 has not been deposited in the database, including start and stop codon. Its authenticity was here confirmed by PCR.

Gene expression can be modulated by the use of different promoters, by alternative splicing of pre-mRNAs, and by the use of different poly (A) sites. All of these events ultimately yield regulatory and coding RNAs with the potential to produce proteins with specific roles or activities, depending on tissue type, developmental stage or pathology. The structure of the genes encoding the splice variant 4 and 5 are similar up to

nucleotide 1954, located in exon 10A. In fact, NetGene2 Server predicts that there is an internal donor site located exactly in this position (exon 10A, 1954nt of splice variant 4), suggesting that splice variant 5 was generated by an alternative splicing of pre-mRNA. Prediction of Polyadenylation signals in human sequences by Polyadq (Tabaska and Zhang, 1999) and Erpin (Legendre and Gautheret, 2003) identified a polyadenylation signal at the end of exon 10A, 18 nucleotides upstream from the poly(A) tail described for splice variant 4, which may explain the generation of the splice variant 4.

Northern blot analysis using a probe spanning a common region of the splice variant 4, splice variant 5, the *hMASK* and the *hMASK-BP3^{ARF}* mRNAs (from exon 7 to 10A) revealed a very subtle band of 4.5 kb, probably corresponding to splice variant 5, only in heart, skeletal muscle, liver, K-562, Jurkat and HEL cell lines, suggesting that the splice variant 5 has a very low expression in some tissues here studied. However, as this isoform has not been completely sequenced, it is impossible to display its full structure. On the other hand, Northern blot analysis revealed that the splice variant 4, *hMASK* and *hMASK-BP3^{ARF}* mRNAs have a wide expression, in different human normal tissues and cancer cell lines here studied. These results are in agreement with the real time PCR results.

ANK-repeat proteins carry out a wide variety of biological activities and have been detected in organisms ranging from

viruses to humans. The motif has now been recognised over 400 proteins (Michaely and Bennett, 1995), including cyclin-dependent kinase inhibitors, transcriptional regulators, cytoskeletal organisers, developmental regulators and toxins (Bork, 1993; Michaely and Bennett, 1995). These molecules are present in the nucleus, cytoplasm and the extracellular milieu. The number of repeats within any one protein is highly variable (Sedgwick and Smerdon, 1999). Some ANK-repeat proteins, such as splice variant 4, consist solely of ANK repeats. Other proteins, such as hMASK-BP3^{ARF} and hMASK, are multi-domain molecules in which ANK repeats are combined with other unrelated structural modules. A general biological function of ANK repeats as a site for protein–protein interaction has been suggested (Sedgwick and Smerdon, 1999). However, the ultimate function of ANK repeat-mediated protein–protein interaction is certainly diverse. Thus, the identification of proteins targeted by hMASK-BP3^{ARF}, hMASK and splice variant 4 encoded protein will contribute to the full understanding of the biological function of these proteins.

To gain some insight into the biological function of the four splice variants, we investigated the expression of their mRNAs, using the haematopoietic system as a model. An upregulation of the four isoforms mRNA expression was observed after HL-60 and erythroblast differentiation. The upregulation of splice variant 4 mRNA was considerably higher than the upregulation of the other variants, during erythroid differentiation. This upregulation of variant 4 expression must be due to a change in splicing versus polyadenylation involving RNA expression processing signals in exon 10A, since there is an internal donor site and a polyadenylation signal in exon 10A. Alternative splicing is one of the most important mechanisms to generate a large number of mRNA and protein isoforms from the surprisingly low number of human genes and is a key mechanism to generate the complex proteome of multicellular organisms (Stamm et al., 2005). It is possible that our gene is transcribed into various mRNA species that arise from alternative splicing events and that have not yet been discovered. We may speculate that these ANK repeat proteins could be an universal module, mediating protein–protein interactions during haematopoietic cell differentiation, as occurs with many other conserved domains.

In *Drosophila*, MASK seems to interact with members of the RTK (receptor tyrosine kinase) signalling pathway. Loss of MASK increases programmed cell death, reduces cell proliferation, inhibits photoreceptor differentiation, affects RTK dependent processes and does not affect MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) activation (Poulin et al., 2003). However, studies of MASK function in *Drosophila* should be interpreted carefully before being extrapolated to humans, as the exact mechanisms by which MASK mediates RTK signalling has not yet been determined in *Drosophila*. Our findings corroborate the hypothesis that MASK is a protein involved in cell differentiation, but if this occurs due to interactions between MASK and RTKs proteins is yet unknown. Further studies are necessary to define the function of MASK in humans.

It should be pointed out that the genes are mapped at chromosome 5q31, where genetic alterations often occur and

have been implicated in haematological malignancies (Brezinova et al., 2000; Knutsen et al., 2003). In addition, the prevalence of alternative splicing as a mechanism for regulation of gene expression makes it a likely target for alterations leading to human disease (Cooper and Mattox, 1997).

Although the function of the three ANK-repeat proteins remains to be elucidated, it is possible that they play a role in the differentiation of haematopoietic cells. Future studies to describe the isolated functions of these three ANK-repeat proteins should be performed to better understand their roles in cell differentiation.

Acknowledgements

We thank Dr. Nicola Conran and Raquel Foglio for English revision and Dulcinea Martins Albuquerque for helping with figures. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), and Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- Bork, P., 1993. Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? *Proteins* 17, 363–374.
- Brezinova, J., Zemanova, Z., Cermak, J., Michalova, K., 2000. Fluorescence in situ hybridization confirmation of 5q deletions in patients with hematological malignancies. *Cancer Genet. Cytogenet.* 117, 45–49.
- Cooper, T.A., Mattox, W., 1997. The regulation of splice-site selection, and its role in human disease. *Am. J. Hum. Genet.* 61, 259–266.
- Dias Neto, E., et al., 2000. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 3491–3496.
- Fibach, E., Manor, D., Oppenheim, A., Rachmilewitz, E.A., 1989. Proliferation and maturation of human erythroid progenitors in liquid culture. *Blood* 73, 100–103.
- Florea, L., Hartzell, G., Zhang, Z., Rubin, G.M., Miller, W., 1998. A computer program for aligning a cDNA sequence with a genomic DNA sequence. *Genome Res.* 8, 967–974.
- Gibson, T.J., Thompson, J.D., Heringa, J., 1993. The KH domain occurs in a diverse set of RNA-binding proteins that include the antiterminator NusA and is probably involved in binding to nucleic acid. *FEBS Lett.* 324, 361–366.
- Knutsen, T., et al., 2003. Cytogenetic, spectral karyotyping, fluorescence in situ hybridization, and comparative genomic hybridization characterization of two new secondary leukemia cell lines with 5q deletions, and MYC and MLL amplification. *Genes Chromosomes Cancer* 37, 270–281.
- Legendre, M., Gautheret, D., 2003. Sequence determinants in human polyadenylation site selection. *BMC Genomics* 4, 7.
- Michaely, P., Bennett, V., 1993. The membrane-binding domain of ankyrin contains four independently folded subdomains, each comprised of six ankyrin repeats. *J. Biol. Chem.* 268, 22703–22709.
- Michaely, P., Bennett, V., 1995. Mechanism for binding site diversity on ankyrin. Comparison of binding sites on ankyrin for neurofascin and the Cl⁻/HCO₃⁻ anion exchanger. *J. Biol. Chem.* 270, 31298–31302.
- Poulin, F., Brueschke, A., Sonenberg, N., 2003. Gene fusion and overlapping reading frames in the mammalian genes for 4E-BP3 and MASK. *J. Biol. Chem.* 278, 52290–52297.
- Santos Duarte Ada, S., Sales, T.S., Mengel, J.O., Costa, F.F., Saad, S.T., 2002. Progesterone upregulates GATA-1 on erythroid progenitors cells in liquid culture. *Blood Cells Mol. Diseases* 29, 213–224.

- Sedgwick, S.G., Smerdon, S.J., 1999. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem. Sci.* 24, 311–316.
- Siomi, H., Matunis, M.J., Michael, W.M., Dreyfuss, G., 1993. The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res.* 21, 1193–1198.
- Smith, R.K., Carroll, P.M., Allard, J.D., Simon, M.A., 2002. MASK, a large ankyrin repeat and KH domain-containing protein involved in *Drosophila* receptor tyrosine kinase signaling. *Development* 129, 71–82.
- Stamm, S., et al., 2005. Function of alternative splicing. *Gene* 344, 1–20.
- Tabaska, J.E., Zhang, M.Q., 1999. Detection of polyadenylation signals in human DNA sequences. *Gene* 231, 77–86.

Apêndice II

Artigo Publicado

ANKHD1, Ankyrin Repeat and KH Domain Containing 1, is overexpressed in acute leukemias and is associated with SHP2 in K562 cells. Fabíola Traina, Patricia M.B. Favaro, Samuel de Souza Medina, Adriana da Silva Santos Duarte, Sheila Maria Brochado Winnschofer, Fernando F. Costa, Sara T.O. Saad. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2006 September; 1762(9): 828-834.

ANKHD1, ankyrin repeat and KH domain containing 1, is overexpressed in acute leukemias and is associated with SHP2 in K562 cells

Fabiola Traina, Patricia M.B. Favaro, Samuel de Souza Medina, Adriana da Silva Santos Duarte, Sheila Maria Brochado Winnischofer, Fernando F. Costa, Sara T.O. Saad *

The Hematology and Hemotherapy Center, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Department of Internal Medicine, SP, Brazil

Received 18 May 2006; received in revised form 5 July 2006; accepted 27 July 2006

Available online 31 July 2006

Abstract

In the present study, increased levels of *ANKHD1* mRNA and protein expression in leukemia cell lines are reported, as compared with normal hematopoietic cells. Furthermore, a higher expression of *ANKHD1* mRNA was detected in primary acute leukemia samples than in normal hematopoietic cells ($P=0.002$). *ANKHD1* was detected in the cytosolic and membrane fraction of cells and was co-immunoprecipitated with SHP2 in protein extracts of K562 and LNCaP cell lines. These findings suggest a role for *ANKHD1* as a scaffolding protein that may be associated with the abnormal phenotype of leukemia cells.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *ANKHD1*; MASK; Ankyrin repeat; SHP2 phosphatase; Acute leukemia

1. Introduction

Ankyrin-repeat-containing proteins regulate multiple cellular functions including transcriptional and cell-cycle regulation, ion channel, cell survival and cell signaling and participate in protein–protein interactions via their repeat motifs [1–4]. Multiple ankyrin repeat and single KH domain protein, MASK, was first identified in *Drosophila melanogaster* through a genetic screen designed to identify proteins that interact with the protein–tyrosine phosphatase Corskew (CSW), homolog to SH2-containing protein–tyrosine phosphatase (SHP2) in humans [5]. The phenotypic characterization of MASK in *Drosophila* suggests that it is a novel protein involved in receptor tyrosine kinase signaling (RTKs) and its activity is required for cell differentiation, cell survival and cell proliferation in *Drosophila* eyes [5]. In humans, an orthologous protein of *Drosophila* MASK, *ANKHD1* (Ankyrin Repeat and

KH Domain Containing 1), previously named hMASK, was first identified in LNCaP, a prostate cancer cell line, and described by Poulin et al. [6]. However, protein expression patterns or protein interactions of *ANKHD1* have not yet been described.

The nonreceptor protein–tyrosine phosphatase SHP2, encoded by the *PTPN11* gene, is a signal-enhancing component of growth factor, cytokine and extracellular matrix receptor signaling and plays an important role in regulating cell proliferation, differentiation and migration [7,8]. Recent studies implicate SHP2 in human disease, including Noonan syndrome [9], sporadic juvenile myelomonocytic leukemia, childhood myelodysplastic syndrome, B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (ALL), pediatric and adult acute myeloid leukemia (AML) [10–13] and some solid tumors [14]. More recently, SHP2 has been shown to be overexpressed in primary leukemia cells and in leukemia cell lines, and suppression of SHP2 expression induces apoptosis and growth inhibition in leukemia clonogenic cells [15].

Since MASK was first isolated through a genetic screen designed to identify proteins that interact with CSW/SHP2, the characterization of *ANKHD1* expression in humans and

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

E-mail address: sara@unicamp.br (S.T.O. Saad).

its interaction with SHP2 would be of interest. The present study was aimed to evaluate the expression of *ANKHD1* mRNA and protein in normal tissues, normal hematopoietic cells, leukemia cell lines and primary acute leukemia samples. In addition, the association of *ANKHD1* with SHP2 was studied in leukemia cell lines and the prostate cancer cell line, LNCaP.

2. Materials and Methods

2.1. Primary leukemia samples

A total of 38 adult cases (patient age range 18–83 years, median 47 years) diagnosed with acute leukemia at the Hematology and Hemotherapy Center of the State University of Campinas were studied, including 7 ALL, 1 biphenotypic acute leukemia and 30 AML (1 M0, 5 M1, 6 M2, 3 M3, 10 M4, 3 M5, 1 M6, 1 M7) based on the French-American-British (FAB) classification. Primary leukemia cell samples from bone marrow aspirate were obtained from patients before any treatment. The National Ethical Committee Board approved the study and informed-written consent was obtained from all patients. Normal hematopoietic cells ($n=11$), including bone marrows ($n=7$) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ($n=4$), were obtained from healthy donors. After removing erythrocytes by hemolysis, remaining cells were submitted to protein or RNA extraction.

2.2. Human leukemia cell lines

A panel of human leukemia cell lines was used which included KG-1, HEL, K562, NB4, HL-60, Jurkat, MOLT4, Raji, Daudi and Namalwa. A prostate cancer cell line, LNCaP, was used as a positive control. All cell lines were obtained from ATCC, Philadelphia, PA. Cells were cultured in RPMI containing 10% fetal calf serum and glutamine with addition of penicillin/streptomycin and amphotericin B and were maintained at 37 °C, 5% CO₂. For experiments, cells were seeded at a density of 3×10^5 cells/ml, cultured around 7 days and collected at an exponential phase of growth.

2.3. Protein analysis by immunoblotting

Equal amounts of protein were used for total extracts or for immunoprecipitation with specific antibodies followed by SDS-PAGE and Western blot analysis with the indicated antibodies and ECL Western Blotting Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, UK) as described [16]. Antibody anti-*ANKHD1* was raised in a rabbit against a synthetic peptide

(CHPMHQQLSDPSTFSQ) comprising amino acids 2423–2437 from *ANKHD1* exon 32, and was manufactured by Sigma-Aldrich (MO, USA). Dr. Francis Poullin (Department of Genome Sciences, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA) kindly provided an additional antibody against *ANKHD1* (RC2335) [6]. Monoclonal antibody against phosphotyrosine (SC-508) and polyclonal antibodies anti-SHP2 (sc-280), anti-actin (sc1616), anti-histone deacetylase (sc11419) and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Rabbit polyclonal normal IgG (sc-2027) (Santa Cruz, CA, USA) was used as a control for immunoprecipitation.

2.4. Laser confocal analysis

Cells were washed with PBS and fixed with paraformaldehyde containing 4% sucrose. The primary antibody used was anti-*ANKHD1*. After washing, the slides were labeled with Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit antibody (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) for 2 h. Following this procedure, K562 and Jurkat cells were incubated with TRITC-conjugated phalloidin (Sigma-Aldrich, MO, USA) at room temperature and coverslips with ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) were applied; PBMC were washed with $2 \times$ SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M sodium citrate, pH 7.0), incubated with 100 µg/mL DNase–RNase in $2 \times$ SSC for 20 min at 37 °C, washed with $2 \times$ SSC and incubated with Propidium Iodide (PI) (Molecular Probes), which binds to DNA, for 5 min at room temperature. Coverslips were applied with Vectashield (Vector Labs, CA, USA). Positive immunoreactivity was visualized by laser confocal scanning (Zeiss LM510). In the absence of primary antibodies, application of secondary antibodies (negative controls) failed to produce any significant staining.

2.5. Subcellular fractionation

Jurkat cells were washed twice and the pellet was resuspended in hypotonic buffer containing 10 mM HEPES (pH 7.9), 1.4 mM MgCl₂ and 10 mM KCl and allowed to swell on ice for 10 min. Cells were then lysed on ice by vigorous homogenization by 10 passages of the cell suspension through a 26.5-gauge needle. The extracts were centrifuged at $500 \times g$ for 10 min at 4 °C. The supernatant was used as a cytosolic and membrane fraction. The pellet was washed twice with a hypotonic buffer containing 20 mM HEPES (pH 7.9), 25% Glycerol, 1.5 mM MgCl₂, 20 mM KCl and 0.2 mM EDTA and resuspended in hypertonic buffer containing 20 mM HEPES (pH 7.9), 25% Glycerol, 1.5 mM MgCl₂, 1 M KCl and 0.2 mM EDTA. The homogenate was incubated on ice for 30 min at 4 °C and centrifuged at $14,000 \times g$ for 15 min at 4 °C. Supernatant was used as the nuclear fraction. Equal amounts of proteins were used for Western blot analysis.

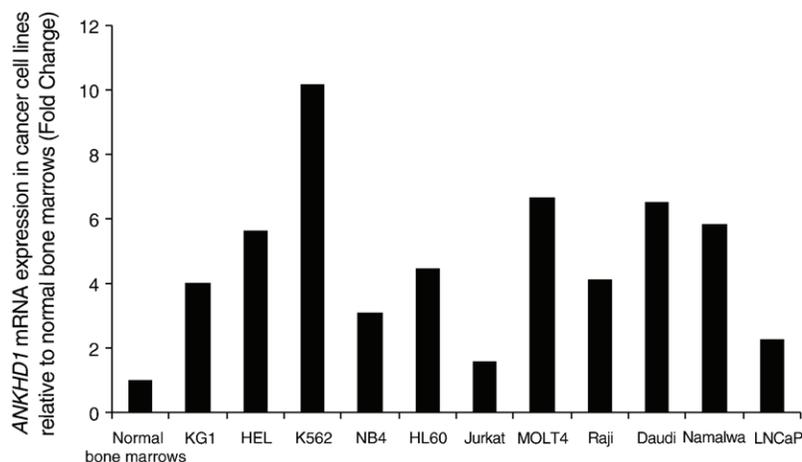


Fig. 1. Increased *ANKHD1* mRNA expression in leukemia cell lines. Real-time quantitative RT-PCR was performed on cDNA from a panel of human leukemia cell lines and the LNCaP cell line. Increased levels of *ANKHD1* mRNA were detected in all subtypes of leukemia cell lines, as compared with normal hematopoietic cells.

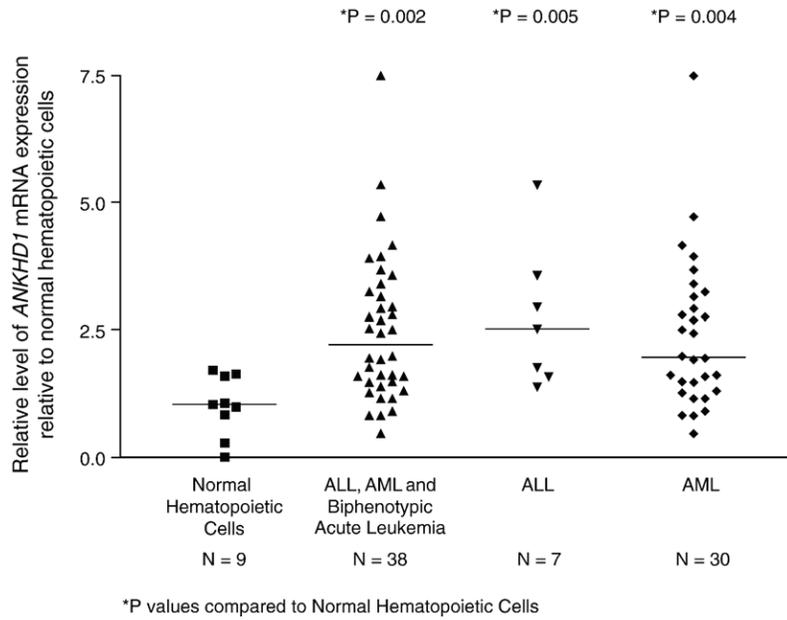


Fig. 2. Increased *ANKHD1* mRNA expression in primary leukemia cells. Real-time quantitative RT-PCR was performed on cDNA from fresh leukemia cell samples from patients at diagnosis or from normal hematopoietic cells. Horizontal lines represent medians. *ANKHD1* mRNA expression was significantly higher in all primary acute leukemias samples ($P=0.002$), acute myeloid leukemias (AML) ($P=0.004$) and acute lymphoblastic leukemias (ALL) ($P=0.005$) when compared with normal hematopoietic cells.

2.6. Real-time quantitative RT-PCR

Reverse transcription, primer sequences and real-time quantitative RT-PCR was performed as previously described [17]. Briefly, real-time detection

of amplification was performed in an ABI 5700 Sequence Detector System (Applied Biosystems) using SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). Four replicates were run on the same plate for each sample. β -Actin expression was used as an endogenous control and a pool of 3 normal bone

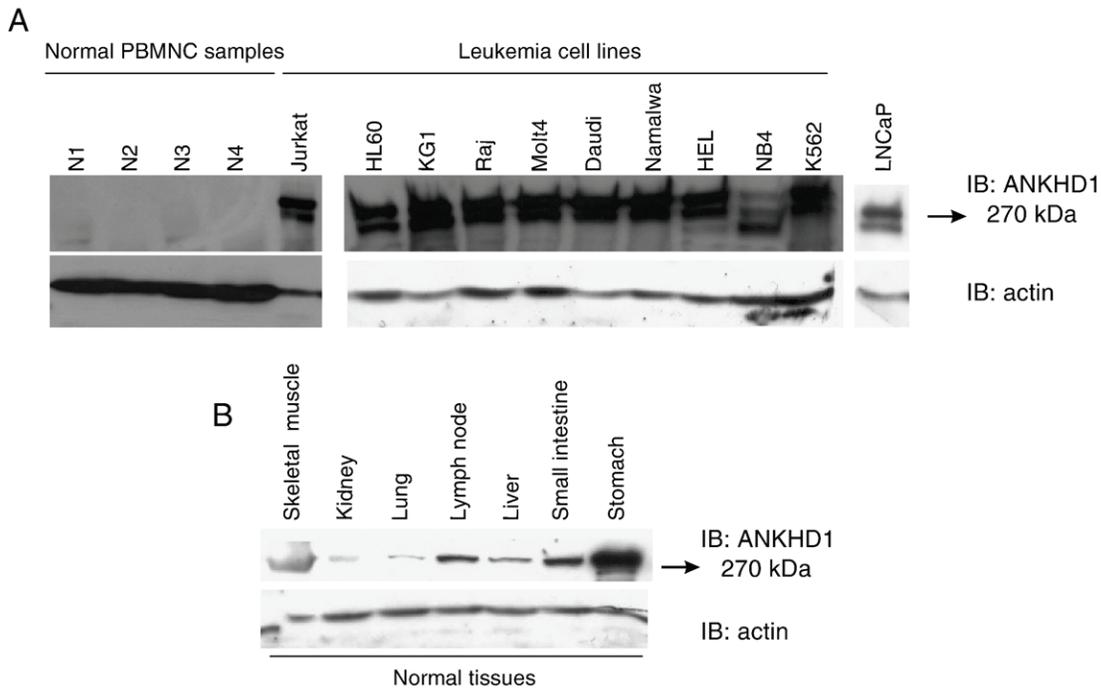


Fig. 3. Analysis of the ANKHD1 protein expression. Western blot analysis of peripheral blood mononuclear cells (PBMNC) from 4 healthy donors (N1 to N4), human cancer cell lines (A) and various human normal tissues (B) for the expression of the ANKHD1 protein. Total tissue or cell extracts were blotted with antibodies against ANKHD1 (270 kDa) or actin (42 kDa), as a control for equal sample loading, and developed with the ECL Western Blotting Analysis System.

marrows was used as the Calibrator. The relative quantification value of *ANKHD1* gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ [18].

2.7. Statistical analysis

The relative level of *ANKHD1* mRNA expression was compared between normal hematopoietic cells, all primary acute leukemia samples, primary AML samples and primary ALL samples using a Mann–Whitney *U* test. A *P* value of ≤ 0.05 was considered to indicate statistical significance.

3. Results

3.1. *ANKHD1* mRNA is highly expressed in leukemia cells

Real-time RT-PCR demonstrated increased levels of *ANKHD1* mRNA in all leukemia cell lines studied; KG-1, HEL, K562, NB4, HL-60 Jurkat, MOLT4, Raji, Daudi and Namalwa (up to 10-fold increase), as compared with normal bone marrow cells (Fig. 1).

ANKHD1 mRNA expression was significantly higher in primary acute leukemia samples when compared with normal hematopoietic cells (medians: 2.21 versus 1.05, $P=0.002$), and in ALL (medians: 2.53 versus 1.05, $P=0.005$) and AML (medians: 1.97 versus 1.05, $P=0.004$) when compared with normal hematopoietic cells. No significant difference in *ANKHD1*

mRNA expression was observed in the comparison of AML versus ALL (Fig. 2). Among the AML samples, *ANKHD1* mRNA expression tended to be higher in the subtypes AML M1 and AML M2; however, there was no statistical significance among the subtypes of AML; neither among the subtypes of ALL.

3.2. *ANKHD1* protein is highly expressed in leukemia cells

Immunoblot analysis detected a very low expression of ANKHD1 in PBMNC of normal donors. Conversely, a high expression of the protein was detected in the human leukemia cell lines (Fig. 3A); the expression of ANKHD1 was characterized with 2 bands of approximately 270-kDa in the immunoblot of leukemia cells, and the expression of ANKHD1 in LNCaP was used as a positive control, as previously described [6].

A broad expression of ANKHD1 was observed in all normal human tissues here studied, with a high expression in stomach, small intestine and lymph node and a low expression in liver, spleen, lung, kidney and skeletal muscle (Fig. 3B). Only 1 band of approximately 270 kDa, corresponding to ANKHD1, was detected in normal human tissues.

Immunoblotting analysis of leukemia cell lines with anti-phosphotyrosine antibody revealed that ANKHD1 was not phosphorylated at tyrosine (data not shown).

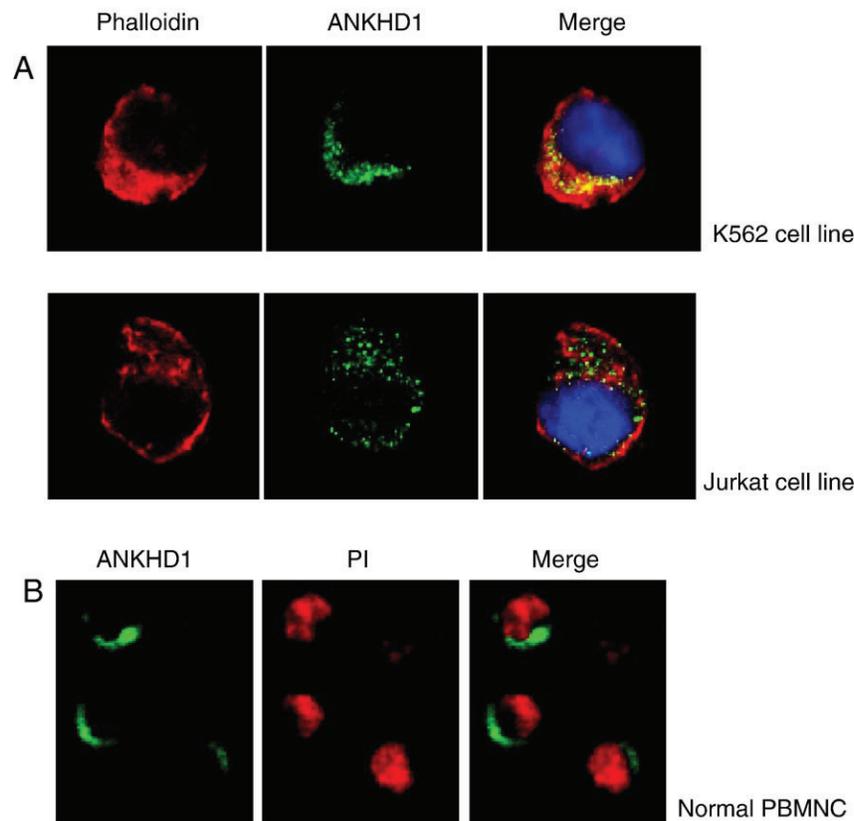


Fig. 4. Laser confocal analysis. K562 and Jurkat cells (A) were fixed and permeabilized and ANKHD1 was visualized by Alexa 488-conjugated anti-ANKHD1 antibody (green fluorescence). Phalloidin was used to visualize the actin (red fluorescence) and DAPI to mark the nuclei (blue fluorescence), as detailed in Materials and methods. Positive immunoreactivity was visualized by laser confocal scanning (Zeiss LM510). In the red, green and blue overlay (merge) the yellow signal indicates regions of red/green overlap. Normal peripheral blood mononuclear cells (PBMNC) (B) were fixed, permeabilized and ANKHD1 was visualized by Alexa 488 conjugated anti-ANKHD1 antibody (green fluorescence). Propidium iodide (PI) was used to visualize the nuclei (red fluorescence). Positive immunoreactivity was visualized by laser confocal scanning (Zeiss LM510).

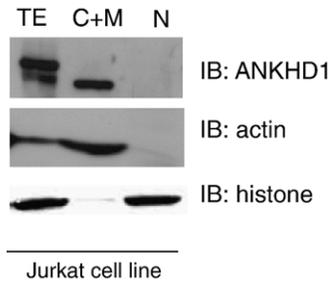


Fig. 5. Subcellular localization of ANKHD1 in the Jurkat cell line. Jurkat cells were lysed in hypotonic buffer and lysates were used to prepare total cellular protein extract (TE), cytosolic and membrane (C+M) and nucleus (N) fractions. An aliquot of each fraction (100 μ g total proteins) was subjected to immunoblot analysis for ANKHD1. Anti-actin and anti-histone were used as the controls of subcellular fractions.

3.3. Subcellular localization of ANKHD1

Laser confocal analysis of K562 and Jurkat cell lines (Fig. 4A) and PBMNC (Fig. 4B) showed that ANKHD1 is located in the cytoplasm of leukemia and normal hematopoietic cells. This cytoplasmic localization of ANKHD1 was further examined by immunoblotting performed with anti-ANKHD1 antibody and tissue fractions of Jurkat cell line (Fig. 5).

3.4. Association of ANKHD1 and SHP2 in cancer cell lines

Immunoprecipitation analysis was carried out using anti-ANKHD1 antibody. ANKHD1 was co-immunoprecipitated with SHP2 in protein extracts of K562 and LNCaP cell lines (Fig. 6, upper panels). To double-check this interaction, we performed the reverse assay; SHP2 was co-immunoprecipitated with ANKHD1 in the protein extracts of K562 and LNCaP cell lines (Fig. 6, middle panels), indicating that ANKHD1 protein associates with SHP2 *in vivo*. As a negative control for all assays, cell lysates were immunoprecipitated with rabbit polyclonal IgG and immunoblotted with anti-SHP2 or anti-ANKHD1, no band was observed; total extracts were used as a positive control for the immunoblot (Fig. 6, bottom panels).

ANKHD1 was not found to be associated with SHP2 in KG1, HL60, Daudi and Jurkat cell lines, even though all leukemia cell line studies presented a high level of SHP2 protein expression (Fig. 7).

4. Discussion

We, herein, report increased levels of *ANKHD1* mRNA and protein expression in leukemia cell lines, as compared with normal hematopoietic cells, and a higher expression of *ANKHD1* mRNA in primary acute leukemia samples, as compared with normal hematopoietic cells. Furthermore, Western blot analysis demonstrated a broad expression of ANKHD1 in normal human tissues. ANKHD1 is an orthologous protein of *Drosophila* MASK, suggesting that ANKHD1 belongs to a protein family conserved through evolution. In *Drosophila*, *Mask* was identified through a genetic screen to identify potential targets of CSW, the

Drosophila homologue of SHP2 [5]. In this study, the association of ANKHD1 with SHP2 was identified by immunoprecipitation in K562 and LNCaP cell lines. We also demonstrated that ANKHD1 is located in the cytoplasm of the cells, similar to the subcellular localization of SHP2 in leukemia cells [15], indicating that these proteins share subcellular compartments. Moreover, the expression pattern of ANKHD1 was found to be similar to that of SHP2, which is overexpressed in acute leukemia cell lines and primary leukemia cells [15].

In *Drosophila*, *Mask* was characterized as a novel protein involved in RTKs [5]. Our findings that ANKHD1 is not phosphorylated in tyrosine suggest that ANKHD1 may function as an adaptor protein, since SHP2 binds directly to some RTKs or to one or more scaffolding adapter proteins [8,19]. Protein–protein interactions are crucial for all biological processes. The generation of accurate cellular protein interaction networks is an ongoing process, in which the data produced by the study of new proteins contributes in a complementary manner.

SHP2 is a widely expressed protein–tyrosine phosphatase that seems to play a positive role in the activation of MAP kinase in response to growth factors [20,21]. Rongzhen Xu and colleagues [15] demonstrated that overexpression and constitutive activation of SHP2 protein is a common phenotype in various types of human leukemia and are closely associated with

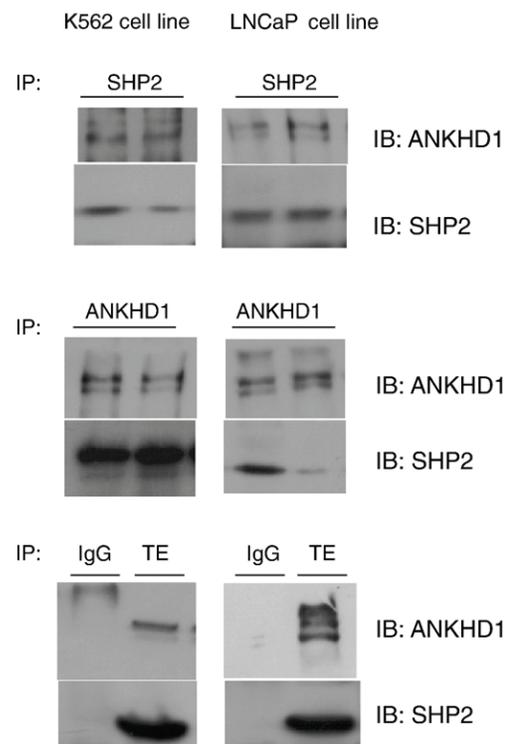


Fig. 6. ANKHD1 is a substrate of SHP2 protein. Lysates from K562 or LNCaP cells containing equal amounts of protein were immunoprecipitated (IP) in duplicate with anti-SHP2 antibodies (upper panel), anti-ANKHD1 antibodies (middle panel) or normal rabbit IgG (bottom panel) and immunoblotted (IB) with anti-ANKHD1 antibodies or anti-SHP2 antibodies. K562 and LNCaP total cell extract (TE) were used as a positive control for the immunoblotting with anti-ANKHD1 or anti-SHP2 (bottom panel). Western blots were developed with the ECL Western Blotting Analysis System.

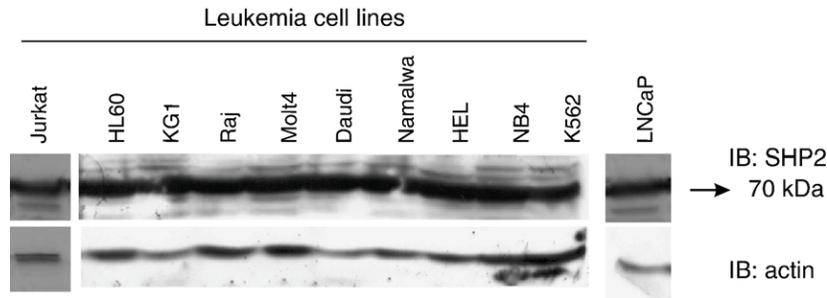


Fig. 7. High SHP2 protein expression in human cancer cell lines. Western blot analysis of human cancer cell lines for the expression of the SHP2 protein. Cell extracts were blotted with antibodies against SHP2 (70 kDa) or actin (42 kDa), as a control for equal sample loading, and developed with the ECL Western Blotting Analysis System.

the proliferative capacity of leukemia blasts. Therefore, overexpression of SHP2 might not be sufficient for the development of leukemia, and other factors may be required for leukemogenesis [15]. In this context, the finding that ANKHD1 is associated with SHP2 in K562 and LNCaP cells, and that *ANKHD1* mRNA is overexpressed in primary leukemia cells compared to normal hematopoietic cells suggests that ANKHD1 may be an adaptor protein and that its association with SHP2 may be required for leukemogenesis and the development of other cancers. However, the finding that ANKHD1 is not associated with SHP2 in KG1, HL60, Daudi and Jurkat cell lines, even though all leukemia cell line studies presented a high level of SHP2 protein expression, gives rise to the hypothesis that the association between ANKHD1 and SHP2 may be tissue specific and may play a different role in different cells. Another possible explanation for the different pattern of association may be the presence of variants of ANKHD1 and/or SHP2 within these cell lines. Besides, *PTPN11* mutations can also lead to SHP2 variants with altered susceptibility to activation and modified substrate selectivity [22].

The previous findings that ANKHD1 interacts with GRINL1A [23], which has been recently identified as a cancer/testis antigen expressed in bone marrow and peripheral blood from AML patients, but not in normal donor samples [24], as well as the high expression of ANKHD1 in acute leukemia, described in our study, corroborate our hypothesis that ANKHD1 protein may be involved in leukemogenesis. The identification of new disease-specific targets for AML immunotherapy expands treatment options and increases our chances of successfully treating this heterogeneous disease and lowering the unacceptably high mortality rate.

Ankyrin repeat proteins carry out a wide variety of biological activities and have been detected in organisms ranging from viruses to humans [4]. Two new variants of ANKHD1, Vpr-binding ankyrin repeat proteins (VAPR-L and VAPR-S), may possess an antiapoptotic effect and protect cells during normal cell proliferation in HeLa and NT2 cells [25]. Like other ankyrin repeat proteins, ANKHD1, through its association with SHP2, may have a role in regulating cell proliferation; however, the exact role of ANKHD1 in acute leukemias is not yet fully understood and requires further studies.

ANKHD1 has a ubiquitous expression in normal human tissues and has a varied higher expression in acute leukemias.

The presence of multiple ankyrin repeats suggests a role for ANKHD1 as a scaffolding protein, bringing together many signaling molecules. Our findings are the first to describe the expression of ANKHD1 in different human tissues and to characterize the association of ANKHD1 with SHP2. The identification of proteins that interact with ANKHD1 and that might direct ANKHD1 to various signal transduction pathways is essential to clarify the role of ANKHD1 in the signaling pathways in general. The higher expression of ANKHD1 in acute leukemia may be associated with the abnormal phenotype of the leukemia cell and may be a molecular target for a rational therapy for leukemia in the near future.

Acknowledgments

We thank Dr. Nicola Conran for English revision. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), and the Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- [1] V. Bennett, L. Chen, Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites, *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 (2001) 61–67.
- [2] P. Bork, Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? *Proteins* 17 (1993) 363–374.
- [3] A.M. Rubtsov, O.D. Lopina, Ankyrins, *FEBS Lett.* 482 (2000) 1–5.
- [4] S.G. Sedgwick, S.J. Smerdon, The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework, *Trends Biochem. Sci.* 24 (1999) 311–316.
- [5] R.K. Smith, P.M. Carroll, J.D. Allard, M.A. Simon, MASK, a large ankyrin repeat and KH domain-containing protein involved in *Drosophila* receptor tyrosine kinase signaling, *Development* 129 (2002) 71–82.
- [6] F. Poulin, A. Brueschke, N. Sonenberg, Gene fusion and overlapping reading frames in the mammalian genes for 4E-BP3 and MASK, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 52290–52297.
- [7] G.S. Feng, Shp-2 tyrosine phosphatase: signaling one cell or many, *Exp. Cell. Res.* 253 (1999) 47–54.
- [8] B.G. Neel, H. Gu, L. Pao, The ‘Shp’ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling, *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003) 284–293.
- [9] M. Tartaglia, E.L. Mehler, R. Goldberg, G. Zampino, H.G. Brunner, H. Kremer, I. van der Burg, A.H. Crosby, A. Ion, S. Jeffery, K. Kalidas, M.A.

- Patton, R.S. Kucherlapati, B.D. Gelb, Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome, *Nat. Genet.* 29 (2001) 465–468.
- [10] M.L. Loh, S. Vattikuti, S. Schubert, M.G. Reynolds, E. Carlson, K.H. Lieu, J.W. Cheng, C.M. Lee, D. Stokoe, J.M. Bonifas, N.P. Curtiss, J. Gotlib, S. Meshinchi, M.M. Le Beau, P.D. Emanuel, K.M. Shannon, Mutations in PTPN11 implicate the SHP-2 phosphatase in leukemogenesis, *Blood* 103 (2004) 2325–2331.
- [11] M. Tartaglia, C.M. Niemeyer, K.M. Shannon, M.L. Loh, SHP-2 and myeloid malignancies, *Curr. Opin. Hematol.* 11 (2004) 44–50.
- [12] M. Tartaglia, S. Martinelli, G. Cazzaniga, V. Cordeddu, I. Iavarone, M. Spinelli, C. Palmi, C. Carta, A. Pession, M. Arico, G. Masera, G. Basso, M. Sorcini, B.D. Gelb, A. Biondi, Genetic evidence for lineage-related and differentiation stage-related contribution of somatic PTPN11 mutations to leukemogenesis in childhood acute leukemia, *Blood* 104 (2004) 307–313.
- [13] M. Tartaglia, C.M. Niemeyer, A. Fragale, X. Song, J. Buechner, A. Jung, K. Hahlen, H. Hasle, J.D. Licht, B.D. Gelb, Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia, *Nat. Genet.* 34 (2003) 148–150.
- [14] M. Bentires-Alj, J.G. Paez, F.S. David, H. Keilhack, B. Halmos, K. Naoki, J.M. Maris, A. Richardson, A. Bardelli, D.J. Sugarbaker, W.G. Richards, J. Du, L. Girard, J.D. Minna, M.L. Loh, D.E. Fisher, V.E. Velculescu, B. Vogelstein, M. Meyerson, W.R. Sellers, B.G. Neel, Activating mutations of the Noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 gene in human solid tumors and adult acute myelogenous leukemia, *Cancer Res.* 64 (2004) 8816–8820.
- [15] R. Xu, Y. Yu, S. Zheng, X. Zhao, Q. Dong, Z. He, Y. Liang, Q. Lu, Y. Fang, X. Gan, X. Xu, S. Zhang, X. Zhang, G.S. Feng, Overexpression of Shp2 tyrosine phosphatase is implicated in leukemogenesis in adult human leukemia, *Blood* 106 (2005) 3142–3149.
- [16] F. Traina, J.B. Carnevali, M.J. Saad, F.F. Costa, S.T. Saad, BCR-ABL binds to IRS-1 and IRS-1 phosphorylation is inhibited by imatinib in K562 cells, *FEBS Lett.* 535 (2003) 17–22.
- [17] S. Santos Duarte Ada, F. Traina, P.M. Favaro, D.S. Basseres, I.C. de Carvalho, S. de Medina, F.F. Costa, S.T. Saad, Characterisation of a new splice variant of MASK-BP3(ARF) and MASK human genes, and their expression patterns during haematopoietic cell differentiation, *Gene* 363 (2005) 113–122.
- [18] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method, *Methods* 25 (2001) 402–408.
- [19] T. Pawson, J.D. Scott, Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins, *Science* 278 (1997) 2075–2080.
- [20] J.M. Cunnick, S. Meng, Y. Ren, C. Despons, H.G. Wang, J.Y. Djeu, J. Wu, Regulation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway by SHP2, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 9498–9504.
- [21] Z.Q. Shi, D.H. Yu, M. Park, M. Marshall, G.S. Feng, Molecular mechanism for the Shp-2 tyrosine phosphatase function in promoting growth factor stimulation of Erk activity, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 1526–1536.
- [22] A. Ostman, C. Hellberg, F.D. Bohmer, Protein-tyrosine phosphatases and cancer, *Nat. Rev., Cancer* 6 (2006) 307–320.
- [23] U. Stelzl, U. Worm, M. Lalowski, C. Haenig, F.H. Brembeck, H. Goehler, M. Stroedicke, M. Zenkner, A. Schoenherr, S. Koeppen, J. Timm, S. Mintzlaff, C. Abraham, N. Bock, S. Kietzmann, A. Goedde, E. Toksoz, A. Droge, S. Krobitsch, B. Korn, W. Birchmeier, H. Lehrach, E.E. Wanker, A human protein–protein interaction network: a resource for annotating the proteome, *Cell* 122 (2005) 957–968.
- [24] B.A. Guinn, E.A. Bland, U. Lodi, A.P. Liggins, K. Tobal, S. Petters, J.W. Wells, A.H. Banham, G.J. Mufti, Humoral detection of leukaemia-associated antigens in presentation acute myeloid leukaemia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335 (2005) 1293–1304.
- [25] M.C. Miles, M.L. Janket, E.D. Wheeler, A. Chattopadhyay, B. Majumder, J. Dericco, E.A. Schafer, V. Ayyavoo, Molecular and functional characterization of a novel splice variant of ANKHD1 that lacks the KH domain and its role in cell survival and apoptosis, *FEBS J.* 272 (2005) 4091–4102.

Apêndice III

Dados clínicos dos pacientes com diagnóstico de síndrome mielodisplásica

<i>Nome</i>	Sexo	Idade (anos)	FAB	Hb coleta	Cariótipo	%BI-MO
<i>AM</i>	M	60	AR	8,1	46, XY	3
<i>SAS</i>	F	40	AR	7,6	46, XX	4,4
<i>DGM</i>	F	55	AR	7,8	46, XX	0
<i>MACN</i>	F	54	AR	13,2	46, XX	0
<i>MNMS</i>	F	33	AR	13,2	46, XX	1,5
<i>VB</i>	M	49	AR	14,5	46, XY/46,XY + 45,X - Y	1
<i>WCG</i>	F	67	AR	8,6	46, XX	2
<i>VLG</i>	F	41	AR	12,3	46,XX	0
<i>ACA</i>	F	70	AR	8,5	46,XX	1
<i>HS</i>	M	53	AR	13,8	46,XY	1,5
<i>OC</i>	M	87	AR	10,0	45X, -Y	0
<i>MSO</i>	F	72	AR	11,7	46, XX	1,5
<i>MG</i>	M	64	AR	12,1	46, XY	3
<i>BPB</i>	M	73	ARSA	8,9	46,XY	1,5
<i>MMA</i>	F	74	ARSA	7,2	46,XX	2,5
<i>BPC</i>	M	74	ARSA	12,5	46, XY	1,5
<i>DMV</i>	F	63	AREB	11,9	46,XX	5
<i>MAC</i>	M	38	AREB	8	46, XY	12,5
<i>BIL</i>	F	59	AREB	12,9	46,XX	10
<i>RGA</i>	M	69	AREB	9,6	46, XY	5
<i>IMRS</i>	F	79	AREB	9	46,XY 5q-	11
<i>WP</i>	M	70	AREB	9,4	46, XY	6,5
<i>GG</i>	M	78	AREB	9,3	45, XY -7	6
<i>MAGP</i>	F	65	AREBt	8,0	complexo	23
<i>TCC</i>	F	68	AREBt	8,8	45XX, -7	27
<i>EAS</i>	M	50	AREBt	8	47, XY +8	23
<i>AP</i>	M	70	AREBt	10,4	46, XY	22,2
<i>WVS</i>	M	68	AREB	8,8	46, XY +8	12
<i>GP</i>	M	61	AREB	10	46, XY	6,5
<i>DMV</i>	F	55	AR	5,4	46, XX	3
<i>MFO</i>	M	62	ARSA	9,7	46,XY	3
<i>AJG</i>	M	56	ARSA	7,5	46,XY	0
<i>AT</i>	M	69	ARSA	10,5	46,XY	1

Apêndice IV

Tabela com os dados clínicos detalhados dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda.

Iniciais	Hemoglobina g/dl	sexo	idade ao diagnóstico	Cariótipo	Diagnóstico (FAB)	% Blastos na MO
ES	10,9	F	40	46, XY	LMA-M0	90
MAHS	7	F	34	46, XX	LMA-M1	87
MMM	8	M	35	ausente mitose	LMA-M1	90
NTS	4,8	F	76	47, XX, +21	LMA-M1	88,5
CBM	10,2	F	41	46, XX	LMA-M1	88,5
CR	8,3	M	45	0 mitose	LMA-M1	94
VO	8,0	F	53	46, XY	LMA-M2	79
JOX	6,6	M	49	45, X-Y, t(8;21)(q22;q22)	LMA-M2	70
DFS	9,5	M	24	46, XY	LMA-M2	87
AC	8,0	M	70	47, XY, +11	LMA-M2	59
PBC	8,7	F	81	45, XX, t(4;6)(q35;q22), del(5q), del(10p), t(15;17), -18, del(22q)	LMA-M3	68
SDF	8,8	F	40	46, XX	LMA-M3	41
JLM	5,1	M	18	ausente mitose	LMA-M3	86
WM	9,0	M	57	46, XY	LMA-M4	92,5
ALSF	6,7	M	59	NR	LMA-M4	41
IXS	8,6	M	52	46, XY	LMA-M4	91
MCJ	9,7	F	83	46, XX	LMA-M4	28
PTS	7,9	M	66	47, XY, der(11)t(1;11)(q22;p15)	LMA-M4	73
HBA	8,1	F	67	ausente mitose	LMA-M4	87
JCA	9,7	M	43	46, XY	LMA-M4	77
JJ	8,6	M	61	ausente mitose	LMA-M5B	87
ELB	8,0	M	42	46, XY	LMA-M6	35
EMC	5,3	M	47	46, XY	LMA-M7	31
ARS	9,3	F	31	46, XX	LLA - pré B	77
ANLM	7,7	M	20	ausente mitose	LLA T	80
JAD	8,4	F	39	ausente mitose	LLA T	81,5
JP	12,6	M	56	46, XY	LLA-T	90
JAC	12,5	M	39	46, XY	Bifenotípica	94

Apêndice V

Tabela com os dados clínicos detalhados dos pacientes com diagnóstico de mieloma múltiplo

Nome	Sexo	Idade	Raça	Estágio	% CD138+
ABS	M	56	N	IIIB	96,74
AGB	M	66	N	IIIA	81,22
ABJ	M	64	C	IIIA	82,38
AA	F	55	C	IIIA	97,15
AZB	M	65	C	NA	78,50
AGF	M	79	C	IIIA	92,69
CHRA	F	47	C	IIA	94,51
EAR	M	41	N	IIIA	91,71
EAC	F	67	C	IA	81,41
EPS	F	60	C	IIIA	83,99
FVC	M	62	C	?B	99,49
FFT	M	55	C	IIIA	98
FBN	M	54	C	LP	99,49
GZM	M	68	C	IIA	96,02
GB	F	59	C	IIA	90,32
ICD	F	36	N	IIIA	92,90
ID	F	58	C	IIIA	92,50
SB	F	67	C	IIIA	90,76
ISSO	F	59	C	IIIA	90
IPM	F	54	C	IIIA	99
JBS	M	56	C	IIIB	95,72
JBLL	M	58	N	LP	89
JCCJ	M	47	C	IIIA	91,15
JNA	M	48	C	IIIA	85,87
JVF	M	44	N	NA	73,86
LVL	M	56	C	IIIA	97,63
LMC	F	58	C	IIIB	78,38
MMSS	F	52	C	IIIA	90,2
MAC	F	70	C	IIB	97
MDOA	F	50	C	IIIA	85,60
MT	M	57	A	IIIA	84,28
OMF	M	59	C	IIIB	84,74
PMC	M	51	C	IIIA	99,27
RCRF	F	45	N	IIIA	84,62
SRS	M	62	C	IIIA	38,24
SVA	M	65	C	IIIB	99,25