

DEIVID LUCAS DOS SANTOS MIGUELETI

**“A PROTEÍNA FEZ1 E A FORMAÇÃO DOS NÚCLEOS
MULTILOBULADOS”**

CAMPINAS

2012

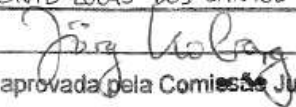


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DEIVID LUCAS DOS SANTOS MIGUELETI

**“A PROTEÍNA FEZ1 E A FORMAÇÃO DOS NÚCLEOS
MULTILOBULADOS”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) DEIVID LUCAS DOS SANTOS MIGUELETI  e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética Animal
e Evolução.

Orientador(a): Prof. Dr. Jörg Kobarg

CAMPINAS

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

M588p Migueleti, Deivid Lucas dos Santos, 1988-
A proteína FEZ1 e a formação dos núcleos
multilobulados / Deivid Lucas dos Santos Migueleti. –
Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Jörg Kobarg.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fasciculação. 2. Núcleos multilobulados. 3.
Citoesqueleto. 4. Transporte protéico. 5. Leucemia
mielóide aguda. I. Kobarg, Jörg. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: FEZ1 and formation of the flower-like nuclei

Palavras-chave em Inglês:

Fasciculation

Flower-like nuclei

Cytoskeleton

Protein transport

Acute myeloid leukemia

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Jörg Kobarg [Orientador]

Déborah Schechtman

Claudio Chrysostomo Werneck

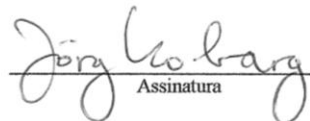
Data da defesa: 04-06-2012

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 04 de junho de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jörg Kobarg (Orientador)


Assinatura

Profª. Dra. Déborah Schechtman


Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck


Assinatura

Profª. Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira

Assinatura

Prof. Dr. Renato Vicentini

Assinatura

Sumário

Agradecimentos.....	vi
Lista de abreviações e siglas	xi
Resumo.....	xiv
Abstract	xv
1. Introdução	1
1.1. O PAPEL DE FEZ1 NO DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO E NA ESQUIZOFRENIA.	1
1.2. A ASSOCIAÇÃO DE FEZ1 COM PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO E RESISTÊNCIA A VÍRUS.	4
1.3. ESTRUTURA, DIMERIZAÇÃO, TRANSPORTE E NÚCLEOS MULTILOBULADOS: OS ESTUDOS DO GRUPO.	6
1.4. FEZ1 E AS LEUCEMIAS: ALGUMA RELAÇÃO?	11
2. Objetivos	15
2.1. OBJETIVO GERAL.	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	15
3. Metodologia	17
3.1. ANÁLISES IN SILICO DE LEUCEMIAS.	17
3.2. COLETA DE PBMCs DE PACIENTES COM LEUCEMIA.	18
3.3. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E REAL-TIME PCR.	19
3.4. CULTURA DE CÉLULAS E LINHAGENS PERMANENTES.	20
3.5. TRANSFEÇÕES, IMUNOFLUORESCÊNCIAS E ENSAIOS DE VIABILIDADE.	21
<i>Transfecções.</i>	21
<i>Imunofluorescências.</i>	22
<i>Ensaio de viabilidade e proliferação.</i>	23
3.6. IMUNOPRECIPITAÇÃO E ESPECTROMETRIA DE MASSAS.	23
4. Resultados e discussão	27
4.1. EXPRESSÃO DE FEZ1 EM LEUCEMIAS.	27
4.2. ENSAIOS CELULARES: AS CONSEQUÊNCIAS DA EXPRESSÃO DE FEZ1 PARA A CÉLULA.	40
4.3. O NÚCLEO “FLOWER-LIKE” NO CONTEXTO DAS INTERAÇÕES DE FEZ1.	47
5. Conclusões e perspectivas	55
6. Referências	58
7. Anexos.....	66
7.1. ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO.	66
7.2. FIGURAS SUPLEMENTARES DO ARTIGO.	77
7.3. OUTROS ANEXOS.	82

*Aos meus pais que me apoiaram e aos mestres que me
incutiram o gosto pela ciência dedico este trabalho.*

Agradecimentos

Às agências de fomento FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro neste e em outros trabalhos ao longo de minha formação.

Às instituições que possibilitaram esse trabalho: o Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) e a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), através do seu Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPG-GBM).

Ao prof. Dr. Jörg Kobarg, por me aceitar como seu aluno de mestrado, pela sua compreensão de todas as dificuldades enfrentadas e pela orientação sempre aberta ao diálogo e cheia de entusiasmo.

Aos membros da banca de qualificação, profa. Dra. Carmen Veríssima e prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro, pelas sugestões e críticas feitas ao projeto. Aos membros da pré-banca e da banca de defesa, prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck, profa. Dra. Deborah Schechtman, prof. Dr. Renato Vicentini e Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira, pela disposição em avaliar e melhorar esse trabalho.

Aos “ex” orientadores, prof. Dr. Ângelo Cortelazzo e Dr. Nilson Zanchin, em especial a este, por me conduzir nos primeiros caminhos da biologia molecular. Agradeço especialmente também à tutora Dra. Juliana Smetana, pela amizade e por toda a ajuda (sempre!) e esforço de colaboração que resultou na publicação de nosso artigo (!).

A todos os técnicos do LNBio, Givanil Garrido, Thaís Dombroski, Bianca Pauletti, Sami Yokoo, Jackeline Zanella, Caroline Bondarik, Jaqueline Silva, Andréia Meza, Celisa Tonoli, Renata Rocha, Lilian Pino, Wanderley Pedroso, Marina Pereira Dias, Alessandra Girasole e Gabriela Reis sempre muito atenciosos e responsáveis por manter nosso laboratório sempre funcionando. Em especial às técnicas Adriana Alves, Elaine Teixeira e Tereza Lima pela paciência e zelo com que me passaram os ensinamentos de bancada que me iniciaram no ramo da biologia molecular.

Aos pesquisadores Dr. Rômulo Tadeu D. Oliveira e Dra. Maria Heloísa S. L. Blotta (FCM-UNICAMP) por gentilmente cederem as células THP-1. À pesquisadora Dra. Carmen

Lima (FCM-UNICAMP) pelo estabelecimento da colaboração no projeto clínico com leucemias e à Dra. Mônica e à Liliane, ambas do Laboratório de Rotinas Hematológicas do Hemocentro da UNICAMP, pelo auxílio no repasse do sangue de pacientes. A todos os pacientes que concordaram em ceder seu sangue para essa pesquisa.

Ao prof. Dr. Daniel Lanza, pelas dicas e informações essenciais à concepção do projeto que resultou nesse trabalho, bem como pela disposição em ajudar sempre que contatado.

Ao amigo Dr. Fernando Simabuco, pelos protocolos, dicas, sugestões, discussões, pelo auxílio inestimável na obtenção das linhagens celulares do sistema Flp-In e nos experimentos de imunoprecipitação; pela disposição para ajudar sempre que solicitado.

À Dra. Adriana Paes Leme e a toda equipe técnica do Laboratório de Espectrometria de Massas do LNBio, em especial às técnicas Bianca, Romênia e Sami, pela colaboração e ajuda no experimento de imunoprecipitação e espectrometria de massas.

Aos amigos Lucas Leite Cunha e Daniel Maragno Trindade, pela grande ajuda com as análises de *Real Time PCR* e aos amigos Ângelo Albertoni, Kaliandra Gonçalves e Rafael Canevarollo pela inestimável ajuda com os ensaios de viabilidade.

À Maria Eugênia, pela amizade e também por me ajudar em todos os momentos em que precisei, além das “puxadas de orelha” para que sempre mantivesse as minhas coisas e as de uso comum arrumadas e servindo ao (essencial!) bom funcionamento do nosso grupo.

A todos os amigos do “grupo do Nilson”, Beatriz (Bia), Carlos (Paier), Karoline, Kellen, Luis Gustavo (Guga), Fernando Simabuco, Juliana Smetana, Mariana Fioravanti, Melissa Fessel, Priscila Giuseppe, Thais Vaz e Thiago Seraphim, com quem dividi ótimos momentos.

Aos amigos do “grupo do Jörg” (LMA), Ângela, Kaliandra, Daniel Saito, Daniel M.T., Edmárcia, Bárbara Godoy, Eduardo, Fernanda, Manuela, Gabriela, Germanna, Gustavo Bressan, Gustavo Camacho, Jéssica, Marcel, Mayra, Marcos Toty, Priscila Ferreira, Priscila Zenatti, Talita, Vanessa e Diogo pelas conversas, trocas de conhecimentos, colaborações, comemorações, cafés-da-manhã e momentos que ajudaram a constituir amizades valiosas. Em especial à Ariane e ao Marcos Alborghetti (o “FEZ team”) pelas discussões de experimentos, colaborações, pela disposição em ajudar em todos os momentos, além da grande amizade!

Aos “amigos da Cultura de Células”, em especial, Ângela, Ariane, Daniel Saito, Daniel M.T., Annelize, Fernando, Fernanda e Germanna, com quem vivi momentos “épicos”, de grande infortúnio e de grandes felicidades na sala de cultura!

Aos *bro's* e grandes figuras Daniel Saito e Eduardo Moraes, pelas conversas, divagações, reflexões e conselhos que resultaram numa amizade que levarei pela vida toda!

Aos demais amigos do LNBio, Andrey, Carla, Joice, Aline Sampaio, Camila Santos, Vanessa Pegos, Nádia, Aline dos Santos, Alisson, Isabelle, Bárbara, Hozana, Jéssica Lóis, Kelven Ulisses, Gustavo Mercaldi, Marília Belloni, Mariana Zanetti, Frederico (Fred), Daniela Granato, Rebeca, Alexandre e Carolina Cassago, Leandro Assis, André, Tiago Antônio, Fabiana Forte, Adriana Soprano, Bruna, Yuri, Tatiana, Malu de Oliveira, Juliana Oliveira, Jorge Neves, Malu Caldas e Júlio César (Júlio SAXS), pelos encontros nos corredores, conversas e aprendizado que me proporcionaram ao longo de quase 4 anos.

A todos os meus amigos da UNICAMP, especialmente a Tatiane Oliveira (Tati), Gustavo, Bruna, Mariana (Nana), Marcela, Henrique, Luiz Filipe, Thaís Rirsch, Thaís Helena, Lorhan, Mário Barsottini (Patrick), Ana Gabriela, Luciano (Bigode), Júlia Bier, Ligia, Pedro Cruz e Lucas Leite Cunha, cuja convivência e companheirismo me fizeram crescer muito como pessoa! Aos demais amigos que fiz durante minha vida em Campinas (Raniere Noronha, Anderson Sant'Anna, Éder Júnior, Maico, Daniel), entre muitos outros amigos das repúblicas e do Centro Espírita GEAE-Barão Geraldo, dos quais terei sempre boas memórias.

A todos os bons e velhos amigos de “Franca city”, entre os quais Hugo Iouchan, Markus Diego, Israel e Lucas Chaves, pela grande amizade que persistiu, e persiste, apesar da distância. Aos novos amigos do Rio e do novo emprego, colegas de apartamento (Iuri e Márcio) e também aos biólogos e engenheiros de meio ambiente do Curso de Formação, pela cordialidade e ótima convivência nessa nova etapa de minha vida.

A meus pais, Primo César Migueleti e Meire T. dos Santos Migueleti, a quem dedico esse trabalho, por todo esforço e dedicação que empreenderam em minha formação e por compreenderem muitas vezes a necessidade de ir e estar cada vez mais distante na busca por meus sonhos. Aos meus irmãos Suéllen P. dos Santos Migueleti e Matheus C. dos Santos Migueleti pelo carinho e amizade e pelo exemplo que significam pra mim! A todos de minha família (tios, primos, avós), por todo o carinho que me dão e dos quais sinto muitas saudades!

À minha noiva e eterna namorada Luciana R. Carlos, a “Linda Lu”, por todo carinho, companheirismo e apoio dedicados ao longo desses três anos juntos, que muito me ajudaram a superar os momentos difíceis e me incentivaram a buscar novas possibilidades, nunca antes imaginadas.

Finalmente, agradeço a Deus, pela minha vida, pelas oportunidades que me proporcionou e por todas as possibilidades que ainda estão por vir!



Universal Press Syndicate

O importante é não parar nunca de questionar.

(Albert Einstein)

Lista de abreviações e siglas

6xHis ou His₆– cauda de 6 histidinas em proteínas recombinantes

ATLL – *Adult T-cell leukemia/lymphoma*

cDNA – complementary DNA

CDS – *Coding Sequence*

CLASP2 – *CLIP-associating Protein 2*

CLIPs – *Cytoplasmic Linker Proteins*

CMV – Citomegalovirus

COPA – *Cancer Outlier Profile Analysis*

DNA – *Desoxyribonucleic acid*

DISC1 – *Disrupted-in-Schizophrenia 1*

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – *Dimetilsulfóxido*

E4B/UFD2A – *ubiquitination factor E4B, UFD2a homolog*

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EGFP – *Enhanced Green Fluorescent Protein*

EGTA – *Ethylene glycol tetraacetic acid*

EMS – Etano Metil Sulfonato

ERBB2 – *v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*

FAB – *French-American-British Cooperative Group*

FEZ – *Fasciculation and Elongation protein Zygin/Zeta* (gene)

FEZ – *Fasciculation and Elongation protein Zygin/Zeta* (protein)

FRT – *Flp Recombination Target*

GAPDH – *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GEO – *Gene Expression Omnibus*

GFP – *Green Fluorescent Protein*

HIV – *Human Immunodeficiency Virus*

HSS – *Hank's Salt Solution*

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Correlation*

IP-MS – *Immunoprecipitation coupled to Mass Spectrometry*
 JCV – *John Cunningham Virus*
 JIP – *c-Jun N-terminal kinase-interacting protein 1*
 JNK – *Janus kinase*
 KHC – *Kinesin Heavy Chain*
 KLC – *Kinesin Light Chain*
 LLA – *Leucemia Linfoide Aguda*
 LMA – *Leucemia Mieloide Aguda*
 mRNA – *messenger RNA*
 MAGEL2 – *MAGE-like 2*
 MALDI-QToF – *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization onto Quadrupole Time of Flight*
 MAP – *Microtubule Associated Protein*
 MLL – *Myeloid/Lymphoid Leukemia / Mixed-Lineage Leukemia*
 MTOC – *Microtubule Organization Center*
 MTT – *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*
 MUNC18 – *Mammalian UNCoordinated-18 (STXBP1 - Syntaxin Binding Protein 1)*
 NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
 NDEL – *nudE-nuclear distribution E homolog (A. nidulans)-like*
 NDN – *Necdin*
 NEK – *NIMA-related Kinase*
 NGF – *Nerve Growth Factor*
 NIMA – *Never In Mitosis gene A*
 NOESY – *Nuclear Overhauser effect spectroscopy*
 NRD – *Nek Regulatory Domain*
 PBMCs – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*
 PBS – *Phosphate Buffered Saline*
 PCR – *Polimerase Chain Reaction*
 PKC ϵ – *Protein Kinase C Epsilon*
 PKC ζ – *Protein Kinase C Zeta*
 PMA – *phorbol 12-myristate 13-acetate*

qPCR – *quantitative PCR*

RMN – *Ressonância Magnética Nuclear*

RNA – *Ribonucleic acid*

RPMI-1640 – *Roswell Park Memorial Institute medium-1640*

SAXS – *Small Angle X-Ray Scattering*

SCOC/SCOCO – *Short Coiled-Coil protein*

TBS – *Tris-HCl Buffered Saline*

TRKs – *neurotrophic tyrosine kinase receptors*

UNC – *Uncoordinated*

UNC-51/ATG1 – *UNC-51 like / Autophagy-specific gene 1*

WHO – *World Health Organization*

Resumo

A proteína UNC-76 foi identificada como necessária para a fasciculação e alongação de axônios do verme *Caenorhabditis elegans* durante o desenvolvimento do sistema nervoso. A homóloga de mamíferos FEZ1 apresenta altos níveis de expressão em tecidos neuronais e camundongos *knockout* para o gene *FEZ1* apresentam desvios de comportamento que remetem a desordens neurológicas. O papel de FEZ1 no desenvolvimento do sistema nervoso parece residir na sua associação com elementos do citoesqueleto e vias de sinalização (*e.g.*, PKC ζ , E4B, DISC1) que conduzem o crescimento axonal e a polarização celular. Trabalhos do grupo mostram que FEZ1 é uma proteína multifuncional (*hub*), capaz de interagir com mais de 50 parceiros através de seus domínios *coiled-coil*. Além disso, a superexpressão de FEZ1 em células HEK293 provoca o aparecimento de núcleos multilobulados, um fenótipo comum em alguns tipos de leucemia. Nesse trabalho foi investigado o papel de FEZ1 nos mecanismos causadores dos núcleos multilobulados e as consequências funcionais de sua superexpressão na viabilidade celular, tentando extrapolar esse modelo para leucemias. Análises *in silico* de diversas leucemias mostraram que FEZ1 está superexpressa em LMAs e que isso pode se relacionar à ocorrência da fusão 11q23/*MLL*. A expressão de FEZ1 na linhagem leucêmica THP-1 foi detectada por *Western blotting*, mas, a expressão em PBMCs de pacientes ainda permanece sem provas empíricas. Para avaliar as consequências funcionais da superexpressão, uma linhagem com expressão estável e indutível foi obtida e utilizada em ensaios de proliferação e resistência a quimioterápicos. Porém, não foram observadas diferenças entre as linhagens expressando a fusão FLAG-FEZ1 e as que expressavam o FLAG *tag* apenas. Em um ensaio de IP-MS utilizando tais linhagens, foram identificadas proteínas cuja interação com FEZ1 pode ser modulada pela atividade de PKCs. Finalmente, a cotransfecção de FEZ1 inteira com *coiled-coils* C-terminais diminui a formação de núcleos multilobulados em quase 40%. A transfecção com o mutante FEZ1 *nocys* contendo 5 cisteínas mutadas não teve o mesmo efeito, mas, novos experimentos são necessários para determinar o potencial de sinergismo que esses dois componentes podem ter sobre a ocorrência desse fenômeno.

Abstract

The protein UNC-76 was identified as necessary for fasciculation and elongation of axons of the worm *Caenorhabditis elegans* during development of the nervous system. The mammalian homologue FEZ1 is mostly expressed in neuronal tissues and *FEZ1* knockout mice present behavior abnormalities that resemble neurological disorders. The role of FEZ1 in the development of the nervous system seems to lie in its association with cytoskeletal elements and signaling pathways (*e.g.*, PKC ζ , E4B, DISC1) regulating axon outgrowth and cell polarization. The studies of our group have shown that FEZ1 is a hub, able to interact with more than 50 partners through its coiled-coil domains. Furthermore, overexpression of FEZ1 in HEK293 cells causes the appearance of flower-like nuclei, a common phenotype to certain types of leukemia. In this work the role of FEZ1 in the mechanisms of flower-like nuclei formation and functional consequences of its overexpression on cell viability were investigated, attempting to extrapolate this model for leukemias. *In silico* analysis of several leukemias showed that FEZ1 is overexpressed in AML patients and that this may relate to the occurrence of 11q23/*MLL* genetic fusion. FEZ1 expression in leukemic THP-1 cells was detected by Western blotting, but the expression in PBMCs of leukemic patients still lacks empirical evidence. To assess the functional consequences of overexpression, cell lineage with stable and inducible expression of FEZ1 was obtained and used in proliferative assays. However, it was not observed any differences between lineages expressing FLAG-FEZ1 fusion protein or FLAG tag alone. IP-MS assay using these lineages identified proteins whose interaction with FEZ1 could be modulated by the activity of PKCs. Finally, cotransfection of C-terminal coiled-coils and FEZ1 full-length decreases flower-like nuclei formation to nearly 40%. Transfection with FEZ1nocys mutant containing five substituted cysteines did not play the same, but further experiments are needed to determine the potential synergism these two components may have on this phenomenon.

1. Introdução

1.1. O papel de FEZ1 no desenvolvimento do sistema nervoso e na esquizofrenia.

Os princípios genéticos que governam o desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso começaram a ser estudados na década de 70, quando o cientista Sidney Brenner estabeleceu uma série de mutantes do pequeno verme *Caenorhabditis elegans*. Em um dos trabalhos, Brenner caracterizou cerca de 300 mutantes obtidos pelo tratamento com o mutágeno EMS, muitos dos quais apresentavam defeitos no comportamento e morfologia. Dos 100 genes mutados identificados, 77 afetavam a locomoção. Alguns desses mutantes, devido à particularidade de sua movimentação, foram denominados *unc*, de *uncoordinated* ¹.

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, os axônios de neurônios nascentes se estendem através de uma série de ambientes extracelulares para atingir seus alvos. Muitos axônios se juntam a outros em feixes ou fascículos, em uma associação essencial para o desenvolvimento e estabelecimento do sistema nervoso, num processo denominado fasciculação ².

O refinamento dos estudos com os mutantes *unc* nas décadas subsequentes permitiu a identificação e divisão dos genes necessários à elongação axonal em fascículos em dois grupos ^{3,4}. O primeiro grupo (*unc-14*, *unc-33*, *unc-44*, *unc-51*, e *unc-73*) é importante para a elongação axonal ao longo de superfícies não neuronais e neuronais. O segundo grupo (*unc-34*, *unc-71*, e *unc-76*) é essencial para a elongação dos neurônios em fascículos, sugerindo que esses genes codificam proteínas necessárias à interação dos axônios com superfícies neuronais ^{2,3}. Mutações deste grupo de genes específicos apresentam dois tipos de defeitos: os axônios fasciculados frequentemente não atingem seu comprimento completo e muitos axônios que crescem em fascículos não ficam totalmente juntos ao longo do percurso ³.

Em mutantes *unc-76*, muitos dos axônios que não formam fascículos, ainda assim se estendem e crescem ao redor da parede do corpo não acompanhados por outros axônios, sugerindo que a proteína UNC-76 seja necessária especificamente para as interações axônio-axônio. Porém, enquanto os defeitos que larvas mutantes *unc-76*

apresentam sugerem uma função para UNC-76 durante o desenvolvimento do sistema nervoso, a sua persistência nos axônios de vermes adultos sugere um papel mais contínuo ^{2,3}.

A análise da sequência da proteína UNC-76 mostrou que essa apresenta similaridade com duas proteínas previamente identificadas em ratos. Um dos homólogos, a proteína Zeta-1, foi identificada em um *screening* duplo-híbrido utilizando-se o domínio regulatório C1 das proteínas quinase PKC ζ e ϵ (*Protein Kinase C*)⁵. Os homólogos FEZ1 e FEZ2 (*Fasciculation and Elongation Zeta-1*), chamados Zygin-1 e -2, respectivamente, também foram identificados como proteínas do cérebro de ratos que se ligam à proteína *Synaptotagmin* ².

Surpreendentemente, em experimentos de transformação de linhagens germinativas, o gene de FEZ1 humano foi capaz de complementar os defeitos causados pela mutação *unc-76* em *C. elegans*, indicando que tanto a função quanto a estrutura de FEZ1 foram conservadas ². De fato, UNC-76 guarda 35% de identidade (46% de similaridade) com FEZ1 em sua sequência polipeptídica e 34% de identidade (45% de similaridade) com FEZ2. FEZ1 e FEZ2 são 49% idênticas (56% similares). Algumas regiões do C-terminal chegam a apresentar até 68% de identidade, enquanto o N-terminal se mostra mais divergente, mas ainda assim mostra substancial similaridade ².

Esses estudos iniciais deram suporte à noção de que UNC-76, FEZ1 e FEZ2 constituem uma nova família de proteínas relacionadas, a família FEZ, e estudos adicionais trouxeram mais conhecimentos a respeito das funções de cada uma delas.

A análise da expressão de FEZ1 mostrou que seu transcrito é abundante no cérebro de ratos adultos e em todos os estágios do desenvolvimento embrionário ^{6,7}. Análises mais recentes mostram que FEZ1 é expressa predominantemente no sistema nervoso central de camundongos, com um pico de expressão aos 10 dias após o nascimento, condizente com o período de crescimento dos axônios (do dia 9.5 ao 12.5), e que declina continuamente até os 5 meses de idade ^{8,9}.

Foi demonstrado que FEZ1 interage e também é um substrato para PKC ζ . A co-expressão de FEZ1 e uma forma constitutivamente ativa de PKC ζ (caPKC ζ) em células PC12 eleva de ~18% (quando há expressão apenas de caPKC ζ) para ~48% a taxa de

diferenciação destas células em neurônios ⁵. A fosforilação por PKC ζ faz com que FEZ1 se desloque da membrana celular para o citoplasma e aumenta sua associação com a proteína E4B/UFD2A(*Ubiquitination factor E4B, UFD2a homolog*), promovendo a neuritogênese ^{5,10}.

Similarmente, a homóloga humana FEZ2, produto de outro gene, também parece atuar no desenvolvimento do sistema nervoso. Porém, sua expressão não fica restrita a um tecido ou tipo celular específico ⁷. Assim, as proteínas da família FEZ definiram uma nova classe de proteínas envolvidas no crescimento axonal e desenvolvimento do sistema nervoso ².

FEZ1 também interage com DISC1 (*Disrupted-in-Schizophrenia 1*), possivelmente um dos mais importantes fatores de susceptibilidade para esquizofrenia, distúrbio bipolar, depressão, autismo, entre outras desordens mentais ¹¹. Essa associação é regulada positivamente na diferenciação neuronal ^{8,12}. Em células PC12, por exemplo, FEZ1 e DISC1 colocalizam nos cones de crescimento e regulam o crescimento dos neuritos ¹². Em outro estudo recente, o *knockdown* de FEZ1 e DISC1 em células granulares do *girus dentatus* mostrou que essas proteínas atuam em sinergia na regulação do crescimento de dendritos e do tamanho do soma de neurônios nascentes no hipocampo de ratos adultos, em uma região implicada na patofisiologia da esquizofrenia e na qual a neurogênese continua ao longo da vida em todos os mamíferos ¹¹.

Além disso, uma série de trabalhos recentes vêm apontando evidências dessa associação. Um deles mostra que a associação de FEZ1 com *Synaptotagmin*, dependente de DISC1 e perdida quando da superexpressão de uma forma truncada desta, é recuperada pelo tratamento com lítio, um importante agente estabilizador de humor ¹³. Outro estudo recente mostra que o gene de FEZ1 é comumente induzido em uma linhagem de astrócito por tratamento com quatro drogas estabilizadoras de humor, dentre elas o lítio, ácido valpróico, carbamazepina e lamotrigina ¹⁴.

Vários estudos também têm tentado associar polimorfismos na sequência de FEZ1 e proteínas da via de sinalização de DISC1 à esquizofrenia, em algumas populações ¹⁵⁻¹⁸ e uma redução significativa do mRNA de FEZ1 foi observada no hipocampo e no córtex pré-frontal de cérebros de pacientes com a doença ¹⁹.

Porém, ao contrário do que se observa em *C. elegans*, cujos mutantes de *unc-76* apresentam defeitos severos de locomoção, os camundongos *knockout* de FEZ1 não apresentavam defeito motor algum. Mas, quando submetidos a uma análise comportamental, observou-se que apresentavam um fenótipo de hiperatividade e sensibilidade aumentada ao tratamento com psicoestimulantes ²⁰, suportando uma provável relação da disfunção de FEZ1 com a esquizofrenia.

Finalmente, estudos mostram a interação entre FEZ1 e as proteínas NDN (*necdin*) e MAGEL2 (*MAGE-like 2*), codificadas por dois de quatro genes inativados na síndrome de Prader-Willi, que, entre outros sintomas, apresenta desordens mentais ²¹.

1.2. A associação de FEZ1 com proteínas do citoesqueleto e resistência a vírus.

O fato de as proteínas da família FEZ (UNC-76/FEZ1/2) serem necessárias ao correto desenvolvimento do sistema nervoso levanta inúmeras questões. Um dos mecanismos mais comuns por trás do crescimento e polarização de neuritos em desenvolvimento (futuros dendritos e axônios) é o direcionamento de vesículas e proteínas específicas para suas pontas. Nesses casos, o transporte anterógrado (em oposição ao corpo celular) dependente da kinesina é especialmente importante e, sua associação com as proteínas da família FEZ tem sido destaque em vários trabalhos ²²⁻²⁶. Além disso, a supressão de FEZ1 por RNA de interferência impede a formação de axônios em neurônios hipocâmpais de embriões de rato e retarda o transporte anterógrado de mitocôndrias nos neuritos ²⁷.

Inúmeras evidências experimentais têm mostrado que UNC-76/FEZ1 seria uma proteína envolvida com o transporte através do citoesqueleto. UNC-76 colocaliza e é capaz de se associar à cauda da cadeia pesada da kinesina (KHC, *Kinesin Heavy Chain*), além de ser necessária ao transporte axonal em neurônios de *Drosophila melanogaster* ²³. Outra evidência interessante advinda dos trabalhos de Gindhart *et al.* (2003) é a observação de que larvas de *D. melanogaster* mutantes para UNC-76 apresentam características fenotípicas remanescentes daquelas de mutantes para o gene da KHC e KLC (*Kinesin Light Chain*). Isso também foi observado em *C. elegans* ^{2,23}.

As kinesinas compreendem uma grande família de proteínas motoras associadas aos microtúbulos, possuindo papel crucial no tráfego intracelular de vesículas, divisão celular e transdução de sinais. Como outras proteínas dessa família, as kinesinas contêm uma região denominada “cabeça” (motor), que hidroliza ATP e caminha ao longo dos microtúbulos, e uma “cauda” que liga cargas ^{25,28}. Quando não está transportando cargas, a Kinesina-1 é mantida inativa (não hidrolisa ATP), através da aquisição de uma conformação que permite a autoinibição da “cabeça” N-terminal (motor) pela cauda C-terminal. O modelo simples da ativação deste motor diz que a ligação de cargas à região C-terminal libera essa autoinibição ²⁸.

Nesse sentido, é interessante citar o trabalho de Blasius *et al.* (2007) mostrando que a ligação simultânea, mas não independente, de JIP1 (*c-Jun N-terminal kinase-interacting protein 1*) e FEZ1 à Kinesina-1 é suficiente para ativar esta para ligação aos microtúbulos e mobilidade ²². As proteínas JIP atuam como proteínas ancoradoras, no sentido de ligar a sinalização pela via da JNK (*Janus kinase*) e o transporte de vesículas à Kinesina-1 ²⁹.

Muitos trabalhos têm atribuído a UNC-76/FEZ1 um papel de proteína adaptadora para o transporte de outras proteínas ou cargas importantes para o desenvolvimento dos axônios e a formação de sinapses. Esse é o caso da proteína UNC-69, homóloga à proteína humana SCOCO (*Short Coiled-Coil Protein*). UNC-76 e UNC-69 colocalizam, agem na mesma via para controle e extensão dos axônios e regulam a organização pré-sináptica cooperativamente ^{25,26}. O transporte de vesículas contendo a proteína *Synaptotagmin* através do complexo UNC-76/Kinesin-1 depende da fosforilação da serina 143 de UNC-76 pela quinase UNC-51/ATG1 (*UNC-51 like/Autophagy-specific gene 1*), como pré-requisito para que se ligue à *Synaptotagmin*, em *D. melanogaster* ³⁰. Um trabalho recente mostra que a atuação de FEZ1 humana como adaptadora também pode ser regulada por fosforilação da serina 58, equivalente à serina 143 de UNC-76, e constitui uma alteração importante para a ligação e o transporte das proteínas *Syntaxin-1* e MUNC18 (*Mammalian UNCoordinated-18*) até as sinapses ³¹.

Outro aspecto interessante da associação de FEZ com o citoesqueleto é a sua capacidade de conferir resistência à infecção viral, quando superexpressa em células de

rato e humanas ³²⁻³⁴. A superexpressão de FEZ1 em células Rat2 (de rato) e 293T (humanas) resulta na resistência a infecção retroviral, com redução da formação de DNA circular, sugerindo um bloqueio da entrada deste no núcleo, o que possivelmente é mediado por elementos do citoesqueleto ³³. Em um trabalho mais recente, esse mesmo grupo descreve o papel de FEZ1, uma proteína tipicamente neuronal, na susceptibilidade diferencial das células do sistema nervoso à infecção pelo HIV-1 ³⁴.

Finalmente, em outro trabalho, Suzuki *et al.* (2005) mostra que a proteína auxiliar do poliomavírus humano JC (JCV), Agnoproteína, é capaz de interagir com FEZ1, além de competir pela associação com os microtúbulos. Nesse mesmo trabalho, os autores mostram que a superexpressão de FEZ1 suprime a expressão de proteínas do JCV, bem como o tráfego de partículas virais pela célula ³².

1.3. Estrutura, dimerização, transporte e núcleos multilobulados: os estudos do grupo.

O interesse do grupo em estudar a proteína FEZ1 surgiu quando esta foi capturada como presa em um duplo-híbrido utilizando a região regulatória da quinase NEK1 (*NIMA-related Kinase 1*) como isca ³⁵. As NEKs compreendem uma família de quinases evolutivamente conservadas e relacionadas estruturalmente à quinase NIMA (*Never in Mitosis, gene A*) de *Aspergillus nidulans*, atuante principalmente na transição G2/M do ciclo celular ³⁶.

Nesse trabalho inicial, foi possível mapear as regiões de *coiled-coil* do domínio regulatório de NEK1 (NRD, *Nek Regulatory Domain*) envolvidas na interação com FEZ1 e várias outras proteínas. Tanto FEZ1, quanto FEZ2 foram capazes de interagir com as construções NRD2 e 4, que incluem os domínios *coiled-coils* 3-4 e 1-4, respectivamente ³⁵.

É interessante notar que as proteínas quinases homólogas a NIMA possuem pouca identidade na região C-terminal, que constitui sua região regulatória e provavelmente determina sua especificidade por substratos ou interação com outras proteínas ³⁶. A possibilidade de FEZ1 ser um alvo de fosforilação por NEK1 foi confirmada teoricamente por predição de sítios de fosforilação ³⁵. Isso é interessante, visto que embora NEK1 mostre uma alta taxa de expressão em células germinativas, os efeitos

pleiotrópicos causados pela mutação do gene *nekl* em camundongos afetem também o sistema nervoso central, onde FEZ1 exerce suas funções mais bem estabelecidas ³⁷.

Interessantemente, FEZ1 já havia sido identificada como parceira de interação em vários *screenings* por duplo-híbrido, utilizando-se iscas independentes. Em um *screening*, realizado em nosso laboratório, utilizando FEZ1(221-392) como isca (inclui os *coiled-coils* do C-terminal), foram identificadas 16 proteínas diferentes capazes de interagir com essa construção, incluindo ela mesma, FEZ1, e sua homóloga FEZ2 ³⁸.

Muitas dessas interações confirmaram o papel de FEZ1 como uma proteína envolvida no desenvolvimento neuronal, crescimento axonal e organização dos microtúbulos/transporte celular. Entretanto, o fato de inúmeras outras proteínas nucleares terem sido identificadas, algumas envolvidas na regulação transcricional ou reorganização de cromatina, sugere que FEZ1 possa possuir funções regulatórias no núcleo³⁸.

É interessante notar que o fato de FEZ1 estabelecer muitas interações (mediadas principalmente por sua região *coiled-coil*), com proteínas as mais diversas possíveis (37 mais exatamente), a coloca na classe de proteínas *hub* (“nó”) ³⁸. Proteínas *hub* são capazes de interagir ou se ligar a um grande número de proteínas diferentes e constituem verdadeiros “nós” em redes de sinalização e interactoma; nelas, o fluxo de informação se ramifica ³⁹. Proteínas atuando com *hubs* têm uma chance três vezes maior de serem essenciais para a célula do que proteínas com um pequeno número de interações ⁴⁰.

A primeira isca identificada como interagindo com FEZ1 foi o domínio regulatório de PKC ζ e a fosforilação de FEZ1 por essa quinase já havia sido reportada como sendo responsável pela sua regulação ⁵. Nesse sentido, trabalhos do grupo têm trazido novos dados para entender esse tipo de regulação e o seu papel funcional, levando-se também em consideração a estrutura peculiar de FEZ1.

Estudos estruturais, por exemplo, mostraram que FEZ1 pertence à crescente classe das proteínas naturalmente desenhovadas ⁴¹. Predições feitas com a sequência de aminoácidos de FEZ1 utilizando-se 13 diferentes *softwares* indicam que esta apresenta basicamente duas regiões desestruturadas no N-terminal (entre os aminoácidos 1-69 e 110-229). Utilizando-se o *software* COILS, é possível identificar uma região, no C-

terminal, com grande probabilidade de formar *coiled-coils*, entre os resíduos 230-265 (96%) ⁴¹.

A forma naturalmente desenovelada de FEZ1 pôde ser confirmada por experimentos de dicroísmo circular (CD). Nesses, nota-se que os espectros tanto de 6xHis-FEZ1(1-392) quanto de 6xHis-FEZ1(1-227) possuem um mínimo em 205 nm, condizente com a noção de que proteínas desenoveladas são caracterizadas por apresentarem mínimo no seu espectro de CD próximo de 200 e 205 nm ⁴¹.

Além disso, experimentos de SAXS com 6xHis-FEZ1(1-392) e 6xHis-FEZ1(1-227) geraram informações quanto à forma, massa e dimensão dessas construções. Os dados indicam que ambas são moléculas diméricas em solução, com uma grande conformação aberta e alongada, confirmando não só os dados de CD, mas também os de Assman et al. (2006), de que FEZ1 é capaz de interagir consigo mesma formando dímeros. Experimentos de proteólise limitada com trombina e proteinase K também sugeriram que FEZ1 se comporta como uma proteína naturalmente desenovelada, com uma conformação aberta e flexível, susceptível a significativa proteólise em condições que não causam nenhuma clivagem no controle globular BSA ⁴¹.

Embora a fosforilação da região C-terminal de FEZ1 não provoque alterações perceptíveis em sua estrutura secundária (como observado por dicroísmo circular), nem altere sua capacidade de dimerização (que independe de seu domínio C-terminal), a fosforilação por PKC ζ impede a sua associação com a proteína CLASP2(1046-1251) (*CLIP-associating Protein 2*) ⁴¹. Isso é condizente com a hipótese de que FEZ1 sofre dimerização através de sua região N-terminal, deixando as regiões *coiled-coils* do C-terminal livres para estabelecer interações com outras proteínas ^{38,41,42}. Assim, se for assumido que os dois C-terminais do dímero FEZ1 estejam em oposição à região de dimerização (que envolve a região N-terminal), então as proteínas que interagem com FEZ1 poderiam se ligar aos C-terminais para transporte e FEZ1 funcionaria como uma proteína adaptadora dimérica e bivalente ⁴¹. Nesse caso, a região *coiled-coil* que constitui o C-terminal de FEZ1 funcionaria como um domínio de *docking* promíscuo para um grande número de proteínas “cargas”, muitas delas, interessante, também possuidoras de domínios *coiled-coils* ^{35,38}.

Vários dos estudos conduzidos em nosso grupo apontaram para o fato de que FEZ1, além de interagir com várias proteínas distintas, poderia também interagir consigo mesma, adotando uma configuração dimérica. Inicialmente, Assmann et al. (2006) identificaram FEZ1 como presa no duplo-híbrido conduzido utilizando-se FEZ1(221-392) como isca. Posteriormente, esse resultado foi confirmado em experimentos de SAXS e ensaios de interação *in vitro* ⁴¹.

Em outro trabalho recente de nosso grupo, foi demonstrado que FEZ1 endógena dimeriza através de seu N-terminal. Em análises realizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativa e desnaturante e também por espectrometria de massas descobriu-se que a dimerização ocorre através da formação de pontes dissulfeto no N-terminal e que a cisteína 133 estaria envolvida nesse processo ⁴³.

Dados espectroscópicos de FEZ1 gerados através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) também confirmam isso. O espectro ¹⁵N¹H-HSQC de FEZ1(92-194) apresenta um padrão característico de proteínas desestruturadas e experimentos desse tipo conduzidos com as formas reduzida e não-reduzida de FEZ1(92-194) permitiram confirmar que a dimerização ocorre pelo domínio N-terminal. Experimentos de correlação através do espaço como NOESY e de relaxação (também comparando dímero e monômero) apontaram os resíduos localizados “ao redor” da cisteína 133 (C133), como a região pela qual se dá a dimerização, bem como se dá sua orientação relativa paralela (pelos modelos de SAXS, imaginava-se uma orientação antiparalela entre os monômeros) (Alborghetti, comunicação pessoal).

Ainda no trabalho de Lanza et al. (2009), investigou-se o possível papel para a fosforilação de FEZ1 por PKC para sua dimerização e desempenho de suas funções, como a associação com outras proteínas. Interessantemente, como já foi citado, a fosforilação da região C-terminal de FEZ1 por PKCζ praticamente aboliu a interação com CLASP2(1046-1251) ⁴¹. A proteína CLASP2 foi descrita associada com CLIPs (*Cytoplasmic Linker Proteins*), proteínas localizadas principalmente nas extremidades *plus* (+) dos microtúbulos, onde atuam como fatores “anticatástrofe” ⁴⁴. Em estudo mais recente, Lanza et al. (2009) descrevem a colocalização de FEZ1 com a quinase NEK1 e

CLASP2(1192-1407) em células de mamíferos em uma região candidata ao centróssomo, mostrando que essas interações ocorrem através de regiões *coiled-coil* destas proteínas ⁴⁵.

Além disso, a interação física de FEZ1, CLASP2 e NEK1 com γ -tubulina endógena de células HEK293 e HeLa sugere um papel centróssomal conjunto a essas proteínas ⁴⁵. Esses resultados permitem afirmar que FEZ1 pode adotar uma conformação dimérica e assim interagir simultaneamente com NEK1 e CLASP2 através dos domínios *coiled-coils* de seu C-terminal.

Nesse mesmo trabalho, foi observado também que PKC fosforila CLASP2 *in vitro* e *in vivo* e que o tratamento com PMA (*Phorbol-12-myristate-13-acetate*), um ativador de PKC, inibe a colocalização de CLASP2 com FEZ1 na região candidata ao centróssomo ⁴⁵. Interessantemente, esse resultado é condizente com os dados anteriores que mostravam que a interação entre FEZ1 e CLASP2 seria regulada pela fosforilação por PKC ζ ⁴¹.

Esses dados em conjunto dão cada vez mais suporte à hipótese de que FEZ1 desempenha importantes funções para a manutenção e organização do citoesqueleto. Isso é suportado também pelo elegante estudo de Lanza et al. (2008), que relata as alterações que a superexpressão de FEZ1 causa em células HEK293. A superexpressão transiente da construção GFP-FEZ1(1-392) (mas não de GFP apenas), em células HEK293, causa o aparecimento de núcleos multilobulados em mais de 40% das células transfectadas, 64 horas após a transfecção (Figura 1). A formação dos núcleos multilobulados (ou “*flower-like*”) depende de microtúbulos intactos, uma vez que o tratamento com nocodazol (uma droga que impede a dinâmica de polimerização/despolimerização dos microtúbulos), 22 horas após a transfecção com o vetor da construção GFP-FEZ1(1-392), não só inibe, como também reverte, o aparecimento de núcleos multilobulados ⁴⁶.

Ademais, tanto GFP-FEZ1(1-392), quanto FEZ1 endógena colocalizam e interagem com α e γ -tubulina endógena na região organizadora dos microtúbulos (MTOC). A análise atenta dos núcleos multilobulados sugere que os lóbulos individuais

possam se conectar ao MTOC por forças atrativas, possivelmente mediadas pelos microtúbulos. Nesse modelo, as extremidades *plus* (+) e *minus* (–) dos microtúbulos estariam voltadas para o MTOC, formando *loops* capazes de contrair o núcleo (Figura 1). Interessantemente, FEZ1 exerce funções em ambas as extremidades, especialmente na extremidade *minus*, onde se associa a NEK1 e CLASP2 (centrossomo) ⁴⁵. Isso permitiu aos autores fazerem a especulação de que a superexpressão leva à formação dos *loops* e envolveria interações (ou dimerizações) “incorretas” entre populações de FEZ1 distintas, associadas aos microtúbulos, ou entre FEZ1 e proteínas tais como CLASP2, localizada na ponta do microtúbulo ⁴⁶.

É interessante reportar que o fenótipo de núcleos multilobulados já foi observado em células leucêmicas e que essa morfologia foi associada à resistência a drogas e também à capacidade dessas células de invadirem outros tecidos do corpo, como o sistema nervoso central ^{47–49}.

No trabalho de Lanza et al. (2008), ensaios de citometria de fluxo demonstraram que células superexpressando a fusão GFP-FEZ1 não apresentam arrasto no ciclo celular quando comparadas a células superexpressando GFP apenas. Porém, a viabilidade de tais células não foi investigada ⁴⁶.

1.4. FEZ1 e as leucemias: alguma relação?

O termo *leucemia* (literalmente “sangue branco”) se refere aos derivados malignos de várias linhagens de células hematopoiéticas que circulam livremente pelo sangue e que, com a proliferação descontrolada, levam ao desenvolvimento de desordens hematopoiéticas. Estas podem ser de variados tipos dependendo de qual linhagem ou precursor está se dividindo para gerar os blastos leucêmicos ^{50–53}.

A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é caracterizada por parada na diferenciação e proliferação descontrolada de precursores mieloides na medula óssea. Esse processo leva à insuficiência hematopoiética e, quando células indiferenciadas escapam da medula, há leucocitose significativa, com sequelas e ameaças à vida do paciente ⁵⁴. Essa é classificada em oito subtipos M0 a M7, segundo a classificação FAB, do *French-American-British Cooperative Group* ^{50–53}.

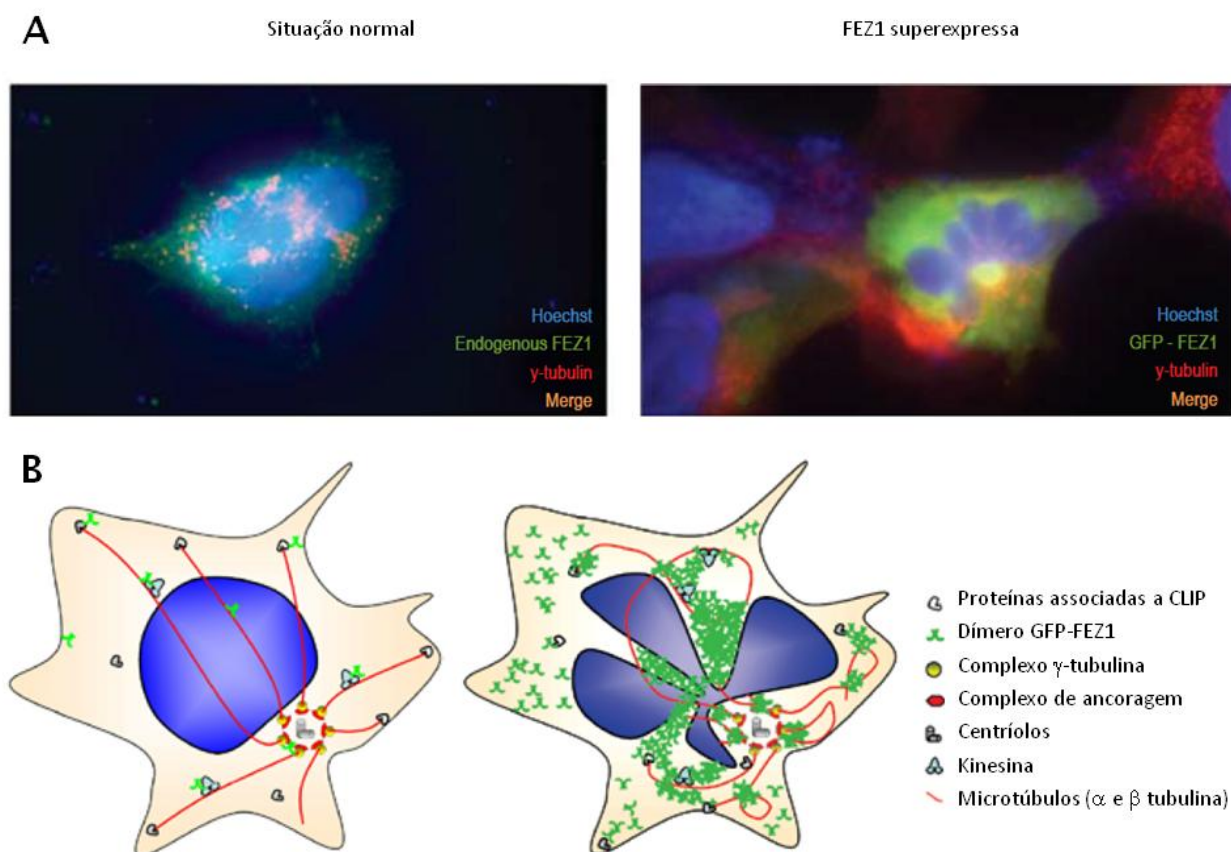


Figura 1: A formação dos núcleos multilobulados em células HEK293. **A.** Quando há superexpressão da fusão GFP-FEZ1 (verde), esta colocaliza com γ -tubulina (vermelho) na região do MTOC em células com núcleos multilobulados, ao passo que, numa situação normal, FEZ1 endógena (verde, à esquerda) aparece como uma proteína difusa no citoplasma. Em azul, os núcleos corados com DAPI. **B.** Representação hipotética de como se daria a formação dos núcleos multilobulados. Na situação normal, FEZ1 forma dímeros capazes de se associar a várias proteínas e exerce sua função normalmente no citoesqueleto. A superexpressão de GFP-FEZ1, no entanto, pode levar à formação de pontes artificiais entre os microtúbulos e, conseqüentemente de “laços” que envolveriam e constringiriam o núcleo, culminando com a formação dos núcleos multilobulados (modificado de Lanza et al. (2009)).

De forma geral, os pacientes com os subtipos M4 (leucemia mielomonocítica aguda) e M5 (leucemia monocítica aguda) apresentam leucocitose proeminente e maior acúmulo de blastos em sítios extramedulares como gengiva, pele, tubo digestivo e sistema nervoso central (neuroleucemia) ^{52,53}. Notavelmente, em um estudo de 1897

casos de LMA analisados citogeneticamente, foi visto que pacientes com LMA M4, M5a e M5b apresentaram uma forte correlação com a incidência de anormalidades citogenéticas associadas ao *locus* 11q23, como translocações-fusões do gene *MLL* (*Myeloid/Lymphoid or Mixed Lineage Leukemia*), quando comparados com outros subtipos FAB. As LMAs portadoras de anormalidades 11q23/*MLL*, como classificadas pela WHO, apresentam um pior prognóstico quando comparadas com LMAs portando outros tipos de rearranjo ⁵⁵. É importante ressaltar que o gene *FEZ1* em humanos está anotado na região 11q24.2 do genoma humano e, possivelmente, poderia ser “perturbado” por translocações vizinhas.

Além disso, células multilobuladas são frequentemente observadas em monócitos e promonócitos leucêmicos no sangue periférico e medula de pacientes com esses subtipos, sendo incomuns em outros subtipos da LMA ^{52,53}. A aquisição desse fenótipo já havia sido associada a outros tipos de leucemia, sendo mesmo um marcador fenotípico característico de células T malignas de leucemia aguda (ATLL) ⁴⁹. Interessantemente, a resistência a quimioterápicos de algumas linhagens leucêmicas linfocíticas tem sido associada a modificações do citoesqueleto e à alteração na expressão de proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs) ^{56,57}, algumas das quais levando até o aparecimento do fenótipo “*flower-like*” ⁴⁸.

Surpreendentemente, Huang et al. (1996) mostraram que as células de uma linhagem de Leucemia Linfóide Aguda (LLA), L₁₀₀ e L₁₀₀₀, selecionadas para resistência ao quimioterápico vincristina, exibem uma organização distinta dos microtúbulos e superexpressam MAPs específicas que culminam com a formação de núcleos multilobulados. As células L₁₀₀ e L₁₀₀₀ apresentam uma taxa de proliferação mais lenta do que a linhagem parental que lhes deu origem, L₀, mas não apresentam arrasto do ciclo celular. Além disso, os núcleos multilobulados desaparecem após o tratamento com colchicina, indicativo do papel dos microtúbulos na sua formação ⁴⁸.

Entretanto, os mecanismos moleculares subjacentes à formação do fenótipo de núcleos multilobulados em blastos de LMA ainda não foram elucidados. De alguma forma, portanto, pode ser que a ocorrência desse fenótipo em alguns subtipos de LMA possa ser decorrente da expressão ectópica de *FEZ1* e esteja também associada à

resistência a drogas antineoplásicas ou mesmo à capacidade de invasão dos blastos, principalmente de sítios imunoprivilegiados, como ocorre em LMA M4 e M5 ^{51,52}.

Assim, nesse trabalho, buscou-se investigar a possível ocorrência e o papel de FEZ1 na formação do fenótipo de núcleos multilobulados em blastos leucêmicos de pacientes com LMA. Esses estudos foram vinculados ao projeto clínico intitulado “Identificação de proteínas envolvidas em mecanismos de formação do fenótipo de núcleos multilobulados (*“flower-like”*) em células neoplásicas de leucemia mieloide aguda dos subtipos M4 e M5”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (CEP N°: 1109/2009).

2. Objetivos

2.1. *Objetivo geral.*

O objetivo deste estudo foi entender o papel da proteína FEZ1 nos mecanismos causadores e as consequências da formação do fenótipo de núcleos multilobulados (“*flower-like*”) na viabilidade celular, tentando extrapolar esse modelo para o entendimento desse fenômeno em leucemias.

2.2. *Objetivos específicos.*

- ✓ Investigar a existência de uma possível relação entre FEZ1 e leucemias através de análises da sua expressão gênica.
- ✓ Analisar a expressão de FEZ1 em linhagens leucêmicas.
- ✓ Obter um clone estável de FEZ1 e realizar ensaios funcionais para entender as consequências funcionais dos núcleos multilobulados para a célula em termos de proliferação e viabilidade. Analisar se FEZ1 promove resistência ou sensibilidade ao tratamento com quimioterápicos.
- ✓ Identificar parceiros de interação modulados pela atividade de PKCs e tentar estabelecer uma relação funcional entre estes e a multilobulação.
- ✓ Estudar como a dimerização e a estrutura de FEZ1 contribuem para a geração do fenótipo “*flower-like*” (núcleos multilobulados) em cultura de células de mamífero (HEK293).

3. Metodologia

3.1. Análises in silico de leucemias.

Com o objetivo de se ter uma ideia preliminar a respeito da expressão de FEZ1 em leucemias e mesmo em outros tipos de câncer, foram feitas análises em bases de dados públicos de expressão gênica como *GEO Profiles* (National Center for Biotechnology Information – NCBI) e *Oncomine*TM (Compendia Bioscience). Em ambas, podem ser feitas buscas por perfis específicos de expressão de genes de interesse, em condições normais, de doença ou de algum tipo de estresse. A base de dados *Oncomine*TM, porém, é dedicada a dados de microarranjos de DNA de estudos publicados sobre câncer.

As buscas foram feitas sempre se inserindo o parâmetro “*FEZ1* (gene)”. Na base de dados *Oncomine*TM, há a possibilidade de se trabalhar com vários “filtros” ao mesmo tempo, como “leukemia”, “11q23 translocation”, etc. Assim, foram feitas buscas por dados de leucemias e, quando possível, foi feito o agrupamento dos dados por tipos de leucemia (LMA ou LLA), subtipos de LMA (subtipos FAB) ou mesmo por translocações usuais em leucemia como as do gene 11q23/*MLL*.

Os dados gerados pela *Oncomine*TM são apresentados na forma de histogramas ou *box-plots* de distribuições de intensidades de expressão de amostras. Os dados dessa base passaram por um processo de normalização que inclui a transformação log2 e a centralização na mediana. Esse pré-processamento permite que a variação da expressão em diferentes amostras possa ser comparada e que, ao mesmo tempo, possam ser feitas inferências a partir da quantificação dessa variação (*fold-change*)^{58,59}. A medida de “fold change” é o meio mais comum de expressar diferenças biológicas. Além disso, quando se leva em conta apenas no valor do *p-value* para denotar diferenças entre grupos, esse pode ser bastante pequeno devido ao grande número de amostras e à baixa variabilidade entre elas, mesmo que a diferença de magnitude entre elas seja pequena⁵⁸.

3.2. Coleta de PBMCs de pacientes com leucemia.

Alíquotas de sangue de pacientes com suspeita de ou sabidamente acometidos por leucemias atendidos ao diagnóstico no Hemocentro da UNICAMP foram submetidas à centrifugação em Ficol-paque® para a separação das células mononucleares do sangue periférico. O sangue foi diluído em *Hank's Salt Solution* 1x (HSS1x – 0.137 M, NaCl 5.4 mM, KCl 0.25 mM Na₂HPO₄ 0.44 mM, KH₂PO₄ 1.3 mM, CaCl₂ 1.0 mM, MgSO₄ 4.2 mM NaHCO₃), aliqotado sobre Ficol-paque® e centrifugado a 400g durante 30' a 4 °C. A camada *buffy*, correspondente às células brancas ou PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*), foi coletada e estas então lavadas três vezes em HSS1x. O *pellet* resultante da última lavagem foi então acondicionado a -80 °C para posterior extração do RNA total. O procedimento de coleta das amostras está esquematizado na Figura 2.

Centrifugação de sangue sobre Ficoll-paque® (400g/30'/4°C).

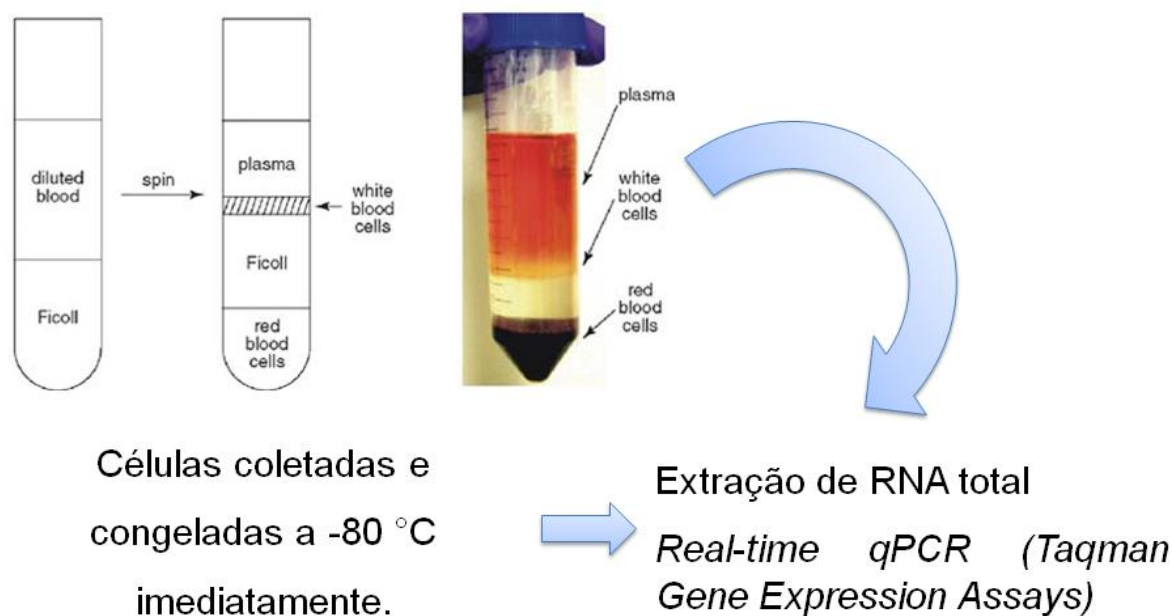


Figura 2: Estratégia de coleta e processamento das amostras de leucemia por centrifugação em gradiente de Ficoll™.

3.3. Extração de RNA total e Real-time PCR.

A extração do RNA total seria feita inicialmente com o reagente Trizol® (Invitrogen), de acordo com as indicações do fabricante. Porém, logo nas primeiras extrações, esse método não se mostrou satisfatório para amostras de RNA total que seriam posteriormente utilizadas para uma aplicação sensível a contaminantes, como o *Real-time qPCR*. Devido a esse fato, somado à qualidade heterogênea das amostras coletadas (nem todas muito boas ou com uma quantidade razoável de células), decidiu-se por fazer a extração utilizando um *kit* comercial *RNAeasy* (QIAGEN). Os procedimentos foram feitos seguindo as indicações do fabricante.

Resumidamente, as células foram lisadas com o tampão RLT contendo 1% de β -mercaptoetanol, com o auxílio de uma micropipeta. Para garantir a lise total, o extrato foi passado em uma coluna de homogeneização (QIAshredder), por centrifugação a 20000 g, durante 2 minutos. Ao extrato homogeneizado foi adicionado etanol 75 °G.L. próprio para RNA e a mistura resultante, após homogeneização, foi aplicada em uma coluna para precipitação do RNA total, por centrifugação a 8000 g durante 20 segundos. A coluna foi então lavada com o tampão RW1 em seguida com o tampão RPE por duas vezes. A eluição foi feita com água livre de RNase, sob centrifugação a 10000 g, por 1 minuto. As amostras de RNA total foram quantificadas e avaliadas quanto à sua integridade e pureza através de leitura dos valores de absorbância a 260 nm e das razões 260/280 nm e 260/230 nm.

Para avaliar os níveis de expressão do mRNA de FEZ1 no sangue de pacientes com LMA, foi utilizada a técnica de transcrição reversa seguida de PCR quantitativo em tempo-real (RT-qPCR). A síntese de cDNA foi feita a partir de 2 μ g de RNA total utilizando-se o *First-Strand cDNA Synthesis* (GE Healthcare). As amostras de cDNA foram utilizadas como molde nas reações de PCR quantitativo em tempo-real, segundo especificações do *TaqMan® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems). Utilizou-se o método da quantificação relativa, no qual a quantidade do produto de PCR do alvo é normalizada em relação a um gene constitutivamente expresso, no caso GAPDH.

As reações foram montadas utilizando-se 0.5 μ L do *TaqMan® Gene Expression Assay* (GAPDH ou FEZ1), 5 μ L do *TaqMan® Universal PCR Master Mix 2X with*

AmpErase® *UNG* (Applied Biosystems) e 4.5 µL de uma solução contendo água e o cDNA de interesse. Para efeitos práticos, assumiu-se que a transcrição reversa do RNA teve 100% de eficiência. As reações foram montadas em uma placa de 96 *wells* juntamente com os controles NTC (*No Template Control*) e a corrida realizada em um *Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR System*, conforme o programa padrão (*hold* de 50 °C, 2 min; *hold* de 95 °C, 10 min; e 40 ciclos de 95 °C, 15 seg e 60 °C, 1 min).

3.4. Cultura de células e linhagens permanentes.

Células HEK293 e células de crescimento em suspensão (Jurkat, K562 e THP-1) foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) e RPMI-1640, respectivamente, suplementados com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, a 37 °C sob uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂. As células Flp-In-293 (ou doravante denominada HEK293 Flp-In) foram cultivadas em meio DMEM nas mesmas condições descritas acima.

Os clones estáveis foram obtidos através do sistema Flp-in™ T-REx™ (Invitrogen). Esse sistema permite a rápida geração de clones estáveis e de expressão indutível através da célula hospedeira HEK293 Flp-In. Essa célula possui integrada ao seu genoma dois elementos que são (1) a sequência do repressor da tetraciclina (TetO₂) e (2) o sítio de recombinação da recombinase Flp de *Saccharomyces cerevisiae* (*Flp Recombination Target*, ou FRT) ⁶⁰.

No sistema T-REx® (Invitrogen), duas cópias da sequência do operador O₂ (TetO₂) foram inseridas no promotor CMV do pcDNA®5-FRT/TO a fim de permitir a expressão regulada do gene de interesse pela adição de tetraciclina ao meio. O repressor Tet é codificado pelo vetor pcDNA®6, de expressão constitutiva e que promove a resistência ao antibiótico blasticidina. A célula HEK293 Flp-In a expressa estavelmente ⁶⁰.

Além disso, as linhagens Flp-In expressam a fusão *lacZ-Zeocin*™ estavelmente e cada célula contém uma sequência única em seu genoma do sítio FRT, proveniente do vetor pFRT/*lacZeo*, como confirmado por *Southern blotting*. Como consequência, a célula se torna resistente ao antibiótico Zeocina® ⁶⁰.

A geração de uma linhagem Flp-In de interesse requer a cotransfecção com o vetor pcDNA[®]5-FRT, contendo o gene de interesse, e o plasmídeo de expressão da recombinase Flp, pOG44. A recombinase faz a inserção do gene de interesse ao genoma da célula no sítio FRT através de recombinação sítio-específica do DNA. A recombinação ocorre de tal maneira que a célula passa a ser sensível a Zeocina[®] e resistente ao antibiótico higromicina B, que pode ser então usada para selecionar os clones estáveis de interesse. Além disso, a sequência do gene de resistência à higromicina não possui códon ATG, vindo a utilizar o códon já presente no genoma da célula, de tal forma que apenas as células que tenham passado pela recombinação correta tornem-se resistentes e sobrevivam durante a seleção com higromicina. A Figura 3A ilustra a disposição dos elementos genéticos nas linhagens Flp-In, com destaque para o sítio de recombinação (FRT), o ATG essencial e a fusão *lacZ-ZeocinTM*, cuja expressão, constitutiva, é dirigida pelo promotor SV40. Na Figura 3B é mostrado como fica o cassete de expressão após a recombinação e como se dá o processo de indução ⁶⁰.

Assim, 24-48 horas após a cotransfecção com o vetor de transferência pcDNA[®]5-FRT-FLAG (versão modificada do vetor original contendo o FLAG *tag*), contendo ou não o gene de interesse (FEZ1 ou EGFP-FEZ1), e o vetor pOG44 (em uma relação de 1:9 (massa/massa)), as células foram replaqueadas numa razão 1:10, de forma que a confluência final fosse de ~40%. O processo de seleção dos clones foi feito com higromicina (100 µg/ml) e blasticidina (15 µg/ml) até que comesçassem a surgir colônias isoladas. Os clones foram coletados individualmente com auxílio de uma pipeta e amplificados individualmente. O teste de indução foi feito com concentrações de tetraciclina de até 500 ng/ml e os níveis de expressão determinados pela técnica de *Western blotting*.

3.5. Transfecções, imunofluorescências e ensaios de viabilidade.

Transfecções.

As transfecções transientes foram feitas pelo método da precipitação de DNA por fosfato de cálcio ou utilizando o reagente Lipofectamine (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, e monitoradas por microscopia de fluorescência invertida.

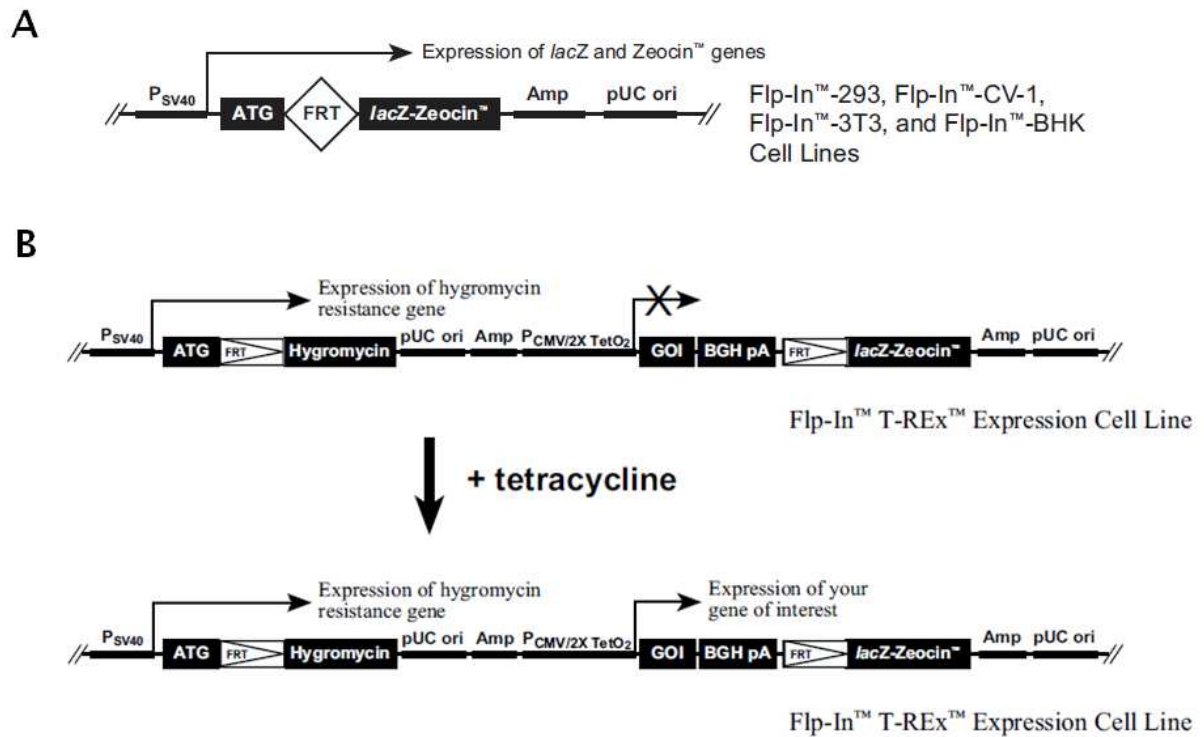


Figura 3: Princípios de funcionamento do sistema de expressão Flp-In™ T-REx™. **A.** Esquema do cassete de expressão inserido no genoma da linhagem hospedeira Flp-In™-293, denotando o sítio de recombinação homóloga (FRT) entreposto entre o códon inicial ATG e a fusão do gene *lacZ-Zeocin™*, cuja expressão (dirigida pelo promotor constitutivo SV40 – P_{SV40}) funciona como marcador de seleção da linhagem. **B.** Esquema do cassete de expressão após a recombinação homóloga e de como se dá a expressão regulada por tetraciclina. O gene de resistência à higromicina (*Hygromycin*) é inserido sob o controle do promotor SV40 e o gene de interesse (GOI), sob controle do promotor CMV/2X TetO₂ (P_{CMV/2X TetO2}), pode ser expresso com a adição de tetraciclina.

Imunofluorescências.

As células foram fixadas em uma solução contendo 4% (w/v) paraformaldeído, 25µM Taxol e 50 mM EGTA em estufa a 37 °C por 20 minutos, e então lavadas 3 vezes com PBS 1x (10 mM fosfato, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7.4) para remoção do excesso de fixador. As células foram permeabilizadas e bloqueadas em uma mistura de 0,2% (v/v) Triton X-100 e leite 3 % em PBS, por 1 hora, sob agitação branda, lavadas

mais 3 vezes com PBS 1x e então incubadas com Hoechst 33258 (2 µg/mL) em PBS 1x por 10 minutos, à temperatura ambiente. As células foram lavadas por 5 vezes, com PBS 1x e as lâminas montadas para visualização por microscopia de fluorescência. Os núcleos multilobulados das células transfectadas de três experimentos independentes foram contados em um microscópio de fluorescência da Nikon.

Ensaio de viabilidade e proliferação.

Células HEK293 Flp-In “vetor vazio” e FLAG-FEZ1 foram cultivadas em garrafas de 25 cm² de área até atingirem uma confluência de 40% e então induzidas (ou não) com a adição de tetraciclina na concentração final de 1000 ng/mL. Após 48 horas de indução, as células induzidas e as não-induzidas foram coletadas, contadas e plaqueadas em placas de 96 wells na quantidade de ~5000 células por well em meio de cultura completo (com tetraciclina no caso das células induzidas). Após 18-24 horas (tempo para as células aderirem ao fundo da placa), as células tiveram o meio complementado com meio contendo taxol (Paclitaxel, Sigma-Aldrich) ou vincristina (Sulfato de Vincristina), em diversas concentrações, por 48 horas. A medida de viabilidade foi obtida através do ensaio colorimétrico *Cell Titer 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega), uma variação do MTT. Os resultados estão apresentados em termos de absorbância a 492 nm. Para os ensaios de proliferação, as células foram plaqueadas da mesma maneira e o crescimento acompanhado ao longo de 5 dias através do mesmo ensaio.

3.6. Imunoprecipitação e espectrometria de massas.

Os clones estáveis de HEK293 Flp-In “vetor vazio” e FLAG-FEZ1 foram cultivadas em garrafas de 225 cm² até atingirem uma confluência de ~50%. O meio foi trocado e as células induzidas com tetraciclina (1000 ng/mL) durante 48 horas. Para o tratamento, as garrafas de células HEK293 Flp-in FLAG-FEZ1 foram divididas em dois grupos de 4 garrafas: (1) tratado com PMA (Merck) 1 µg/mL, durante 1 hora; e, (2) grupo controle, tratado com DMSO (Dimetilsulfóxido, Merck), por 1 hora. As 4 garrafas

de células HEK293 Flp-In “vetor vazio” também serviram como grupo controle e foram tratadas com DMSO, pelo mesmo tempo.

Para o ensaio de imunoprecipitação, as células foram então lavadas e ressuspensas em PBS 1x estéril, centrifugadas a 150 g por 5 minutos e ressuspensas em tampão de lise (50 mM Tris HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% TRITON X-100 (v/v)), complementado com coquetel de inibidores de proteases (*Complete Mini EDTA-free*, Roche). Após 15 minutos de lise em gelo, o lisado foi centrifugado a 12000 g por 10 minutos, a 4 °C, e o sobrenadante (fração solúvel) recuperado para a imunoprecipitação. Ao sobrenadante recuperado então foi adicionada a resina *ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel* (Sigma), previamente lavada com TBS 1x (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4), e incubado *overnight* sob agitação a 4 °C para a ligação dos complexos proteicos formados pela fusão FLAG-FEZ1 e suas proteínas parceiras. O sobrenadante (*flow-through*) foi recuperado e a resina de cada amostra lavada com TBS 1x gelado, por 3 vezes. A eluição dos complexos proteicos foi feita com 200 µL de solução de peptídeo FLAG à concentração de 300 ng/µL, sob agitação por 2 horas, a 4 °C ⁶¹. O eluído foi coletado e parte foi separada para análise quanto à expressão de FEZ1 por *Western blotting*. Foi procedida à digestão das amostras com tripsina (Promega) e análise usando o espectrômetro de massas MALDI-QToF Premier (Waters/Micromass). Os dados obtidos foram processados pelo programa *Mascot Distiller* e submetidos à busca no banco de dados MSDB através do *Mascot Server*. A Figura 4 apresenta o esquema geral do experimento.

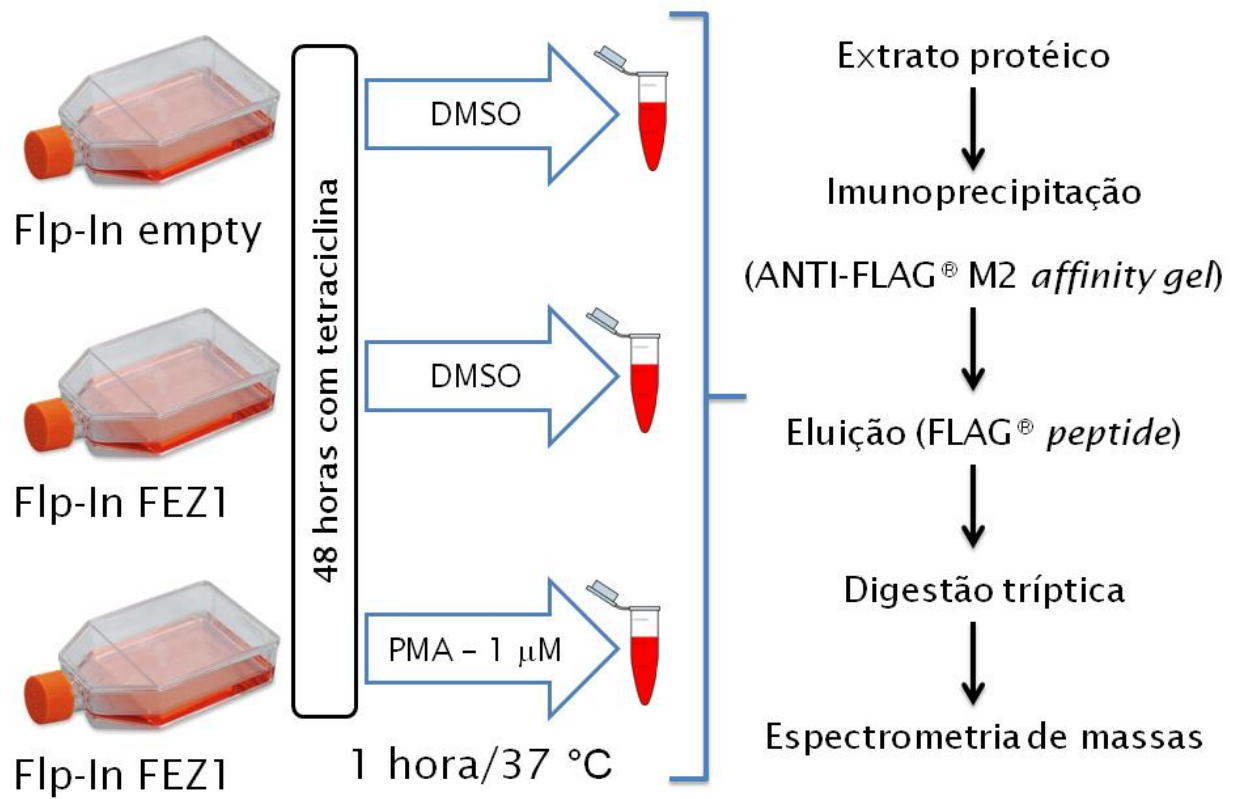


Figura 4: Ensaio de imunoprecipitação seguida de espectrometria de massas para identificação de interações de FEZ1.

4. Resultados e discussão

4.1. Expressão de FEZ1 em leucemias.

Desde as primeiras publicações e trabalhos sobre UNC-76 e as proteínas da família FEZ é afirmado que a expressão dessa família de proteínas admite um padrão. Com exceção do homólogo FEZ2, cuja expressão é ubíqua, FEZ1 e UNC-76 possuem expressão restrita a células neuronais ⁷. Isso pode ser inclusive constatado em uma rápida busca em bases de dados de expressão gênica. Porém, diante das hipóteses levantadas no projeto, foram realizadas buscas nas bases de dados *GEO Profiles* (NCBI) e *Oncomine*TM justamente com o objetivo de encontrar dados pré-existentis sobre a expressão de FEZ1 em outros tipos celulares, seja em condições normais ou de estresse.

Assim, numa busca preliminar na base de dados *GEO Profiles*, constatou-se que FEZ1 está mais expressa na linhagem THP-1 do que em outras duas linhagens de leucemia, KG-1 e U937 (Figura 5A). Interessantemente, THP-1 foi estabelecida como linhagem a partir do sangue periférico de um garoto de um ano de idade com LMA M5 (Leucemia Monocítica Aguda), em relapso. As células são hoje amplamente utilizadas em estudos de diferenciação, pois podem ser induzidas a se diferenciarem em macrófagos, produzindo lisossomos e adquirindo capacidade fagocítica ⁶².

Além disso, em trabalho recente, demonstrou-se que células de LMA provenientes de pacientes expressam os receptores de citocinas envolvidas no desenvolvimento de neurônios, como o fator de crescimento do nervo (*Nerve Growth Factor*, *NGF*), dentre outras neurotrofinas ⁶³. Os autores desse trabalho conseguiram estabelecer uma correlação clara entre a expressão dos receptores TRKs (TRKA, TRKB, TRKC, *Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptors*) e alguns subtipos FAB da classificação de leucemias mieloides agudas. O receptor TRKA, por exemplo, foi identificado como sendo expresso em 62% dos casos de leucemias mielomonocíticas e monocíticas, classificadas como LMA M4 e M5, enquanto apenas 10% das outras leucemias foram positivas para esse receptor. Esse padrão se repetiu nas análises da expressão dos receptores TRKB e TRKC, mostrando que a expressão desses receptores está intimamente ligada à diferenciação monocítica (LMA M4 e M5). Para corroborar

tais dados, esses autores também citam a constatação de que 98% das células THP-1 testadas por citometria de fluxo expressavam TRKA em suas membranas. Em outros experimentos, esses receptores se mostraram funcionais, suportando inclusive a sobrevivência e proliferação dessas células ⁶³.

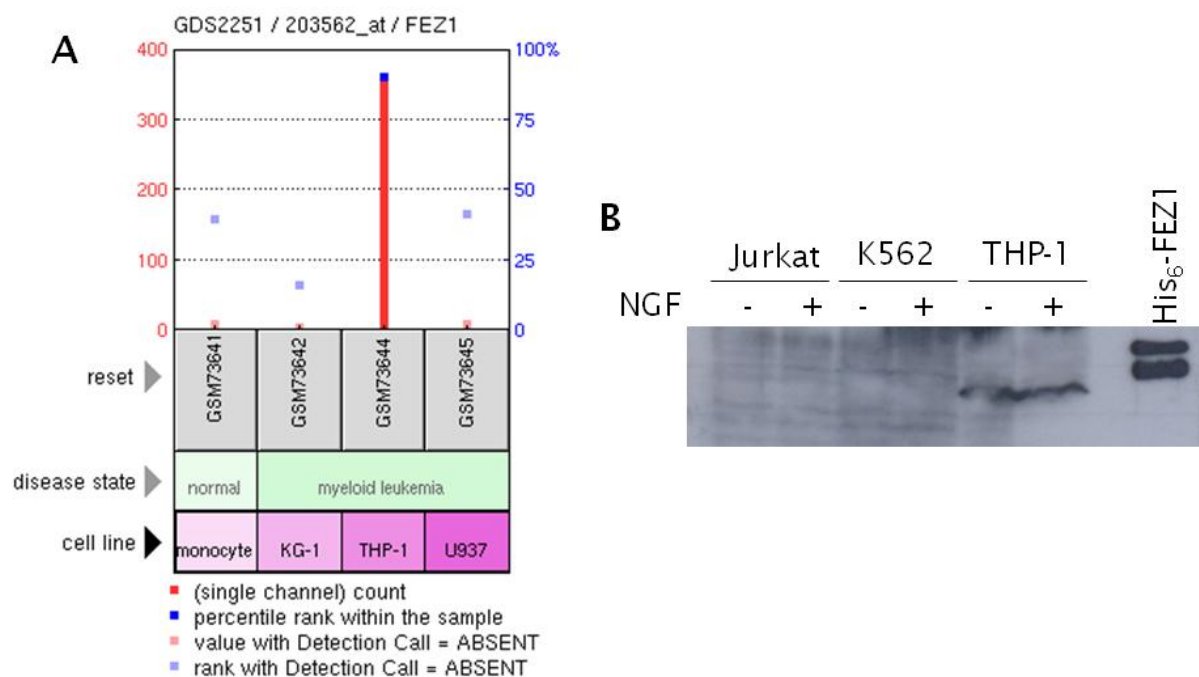


Figura 5: Ensaio de expressão de FEZ1 em linhagens de leucemia. **A.** Resultado de análise *in silico* na base de dados *GEO Profiles* do NCBI, mostrando a expressão de FEZ1 na linhagem de leucemia mieloide THP-1. **B.** *Western blotting* demonstrando a expressão de FEZ1 em THP-1, independente da adição de NGF (500 ng/mL de NGF, 24 horas, 2.5×10^6 células).

Os dados desse trabalho, juntamente com os dados de expressão da base de dados *GEO Profiles*, levantaram a possibilidade da expressão de FEZ1 nas células THP-1 ser uma consequência da sinalização por NGF. A indução da expressão de FEZ1 endógena por NGF já havia sido observada em células PC12 ⁶⁴, uma linhagem usualmente utilizada em estudos de diferenciação neuronal. Para testar tal hipótese, células THP-1 e de uma leucemia mieloide crônica (K562) e de uma leucemia linfóide aguda (Jurkat) foram cultivadas e tratadas com NGF por 24 horas. Seu extrato foi preparado e analisado por *Western blotting* utilizando um anticorpo policlonal anti-FEZ1, na

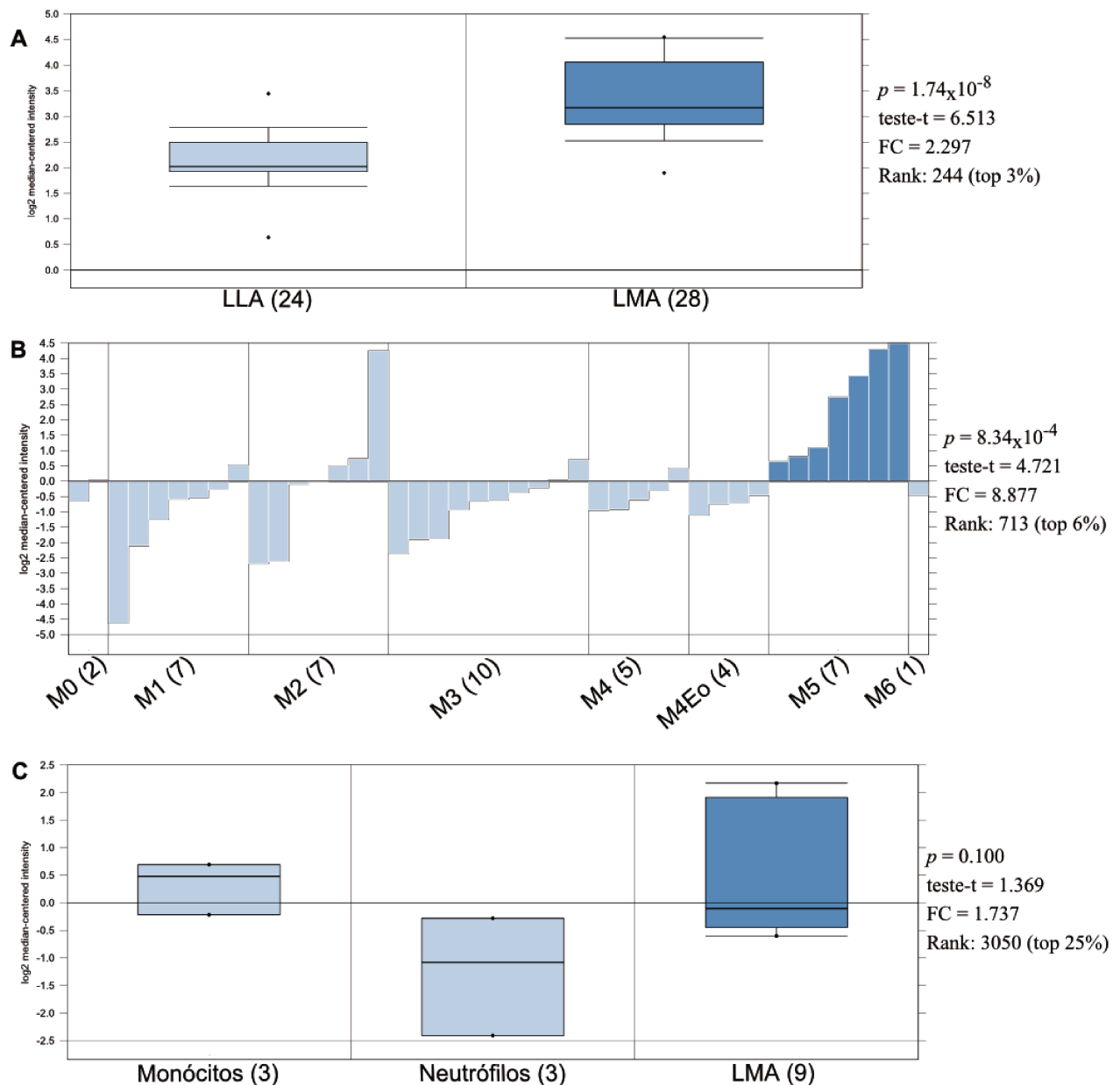
diluição 1:1000 (Proscience). Como pode ser visto na Figura 5B, somente as células THP-1 apresentaram uma banda na região que corresponde à altura de migração de FEZ1 (a fusão recombinante His₆-FEZ1 foi utilizada como controle e apresenta duas bandas devido a degradação da amostra). Aparentemente, a adição de NGF ao meio não altera os níveis de expressão, porém, esse resultado corrobora a expressão de FEZ1 em uma linhagem de leucemia, antecipando o que talvez pudesse ser observado nas análises de pacientes.

Também como forma de antecipar as análises com células de pacientes, foram feitas diversas análises na base de dados de *DNA microarrays Oncomine*TM, a respeito da expressão de FEZ1 não só em diversos tipos de leucemia, mas também em outros tipos de câncer e outras condições de interesse. Essa base se mostrou especialmente adequada para tais análises, tendo em vista que os dados podem ser agrupados (como por subtipo de câncer, tipo molecular, presença ou ausência de parâmetros, etc.), de tal forma que informações que antes estavam ocultas possam se tornar visíveis e as reais diferenças entre amostras aparentemente iguais possam ser exploradas para o desenvolvimento de uma estratégia de tratamento, por exemplo.

Outra vantagem é a análise de *Outliers* ou *Cancer Outlier Profile Analysis* (COPA). O câncer é um conjunto de diversas doenças heterogêneas. O câncer de mama, por exemplo, é um conjunto de diversas doenças com causas moleculares distintas e, em muitos casos, desconhecidas. Através da COPA, essas diversas variações de um mesmo tipo de câncer podem ser exploradas. Genes que podem ser a causa ou o “tendão de Aquiles” da doença em uma pequena população e que, por isso, não podem ser detectados pela análise comum de expressão diferencial, podem ser correlacionados a ela e testados como alvos específicos para essas subpopulações. A COPA é um método para dar *score* e ranquear genes baseados em sua alta super ou subexpressão em um pequeno conjunto de amostras de câncer. Por exemplo, o gene ERBB2 é altamente expresso em 25% dos casos de câncer de mama. ERBB2 possui um perfil de *Outlier*, um gene com alto COPA *score* e altas posições no *ranking* de mais expressos. Através da delimitação de percentis (75°, 90° e 95° percentil), diferentes *datasets* podem ser

comparados (“*Meta-analysis*”) ⁶⁵. Quando se diz que o gene FEZ1 possui perfil de *Outlier* quando analisado no 75º percentil, significa dizer que, em 25% daquele conjunto de amostras, sua expressão é significativa e pode possuir um sentido funcional do ponto de vista biológico ⁶⁵. A Figura 6 ilustra o perfil de expressão de FEZ1 obtido a partir da análise de leucemias mieloides de diferentes estudos independentes.

Como pode ser notado, nas análises de Armstrong et al. (2002), as leucemias de origem linfoide e mieloide podem ser diferenciadas pela expressão de FEZ1, sendo essa maior nas LMA (*p-value*: 1.74×10^{-8}) (Figura 6A). Essa diferença pode ser notada também quando se comparam os subtipos de LMA, como mostra a análise diferencial dos dados de Gutierrez et al. (2005), destacando as amostras de LMA M5, cuja expressão é maior do que nos outros subtipos (Figura 6B). A análise diferencial das leucemias de Stegmeier et al. (2004), por outro lado, mostra a expressão de FEZ1 como sendo maior nos casos de LMA frente a monócitos e neutrófilos diferenciados e não malignos (Figura 6C). Embora o *p-value* seja maior do que 0.05, esse resultado é representativo dos tipos de análise que podem ser feitas utilizando essa base de dados.



Oncomine (Compendia Bioscience, Ann Arbor, MI) foi usada para análise e visualizações

Figura 6: Análises *in silico* da expressão de FEZ1 em Leucemias Mieloides Agudas I. **A.** Armstrong *et al.* (2002). Análise diferencial da expressão de FEZ1 em LMA: LLA vs. LMA **B.** Gutierrez *et al.* (2005). Análise diferencial da expressão de FEZ1 em diversos subtipos de LMA, com destaque para LMA FAB M5. **C.** Stegmeier *et al.* (2004). Análise diferencial da expressão de FEZ1 em LMA. Comparação com amostras de monócitos e neutrófilos. Os números entre parênteses se referem à quantidade de amostras analisadas.

Os dados ainda podem ser agrupados de acordo com outros parâmetros, como pela sensibilidade ao tratamento com drogas. Na Figura 7, pode ser visto que, embora nos dois grupos de amostras a expressão de FEZ1 seja baixa (valores negativos de intensidade indicam que o gene é expresso em níveis abaixo da média de todos os genes analisados), existe uma diferença significativa entre eles. As células sensíveis à daunorubicina apresentam um nível de expressão de FEZ1 um pouco mais elevado do que o das células resistentes.

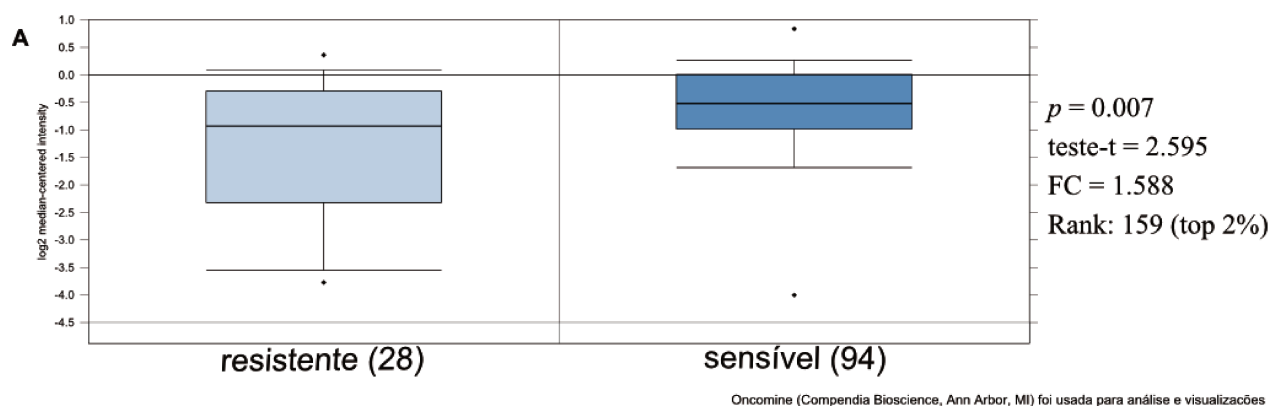
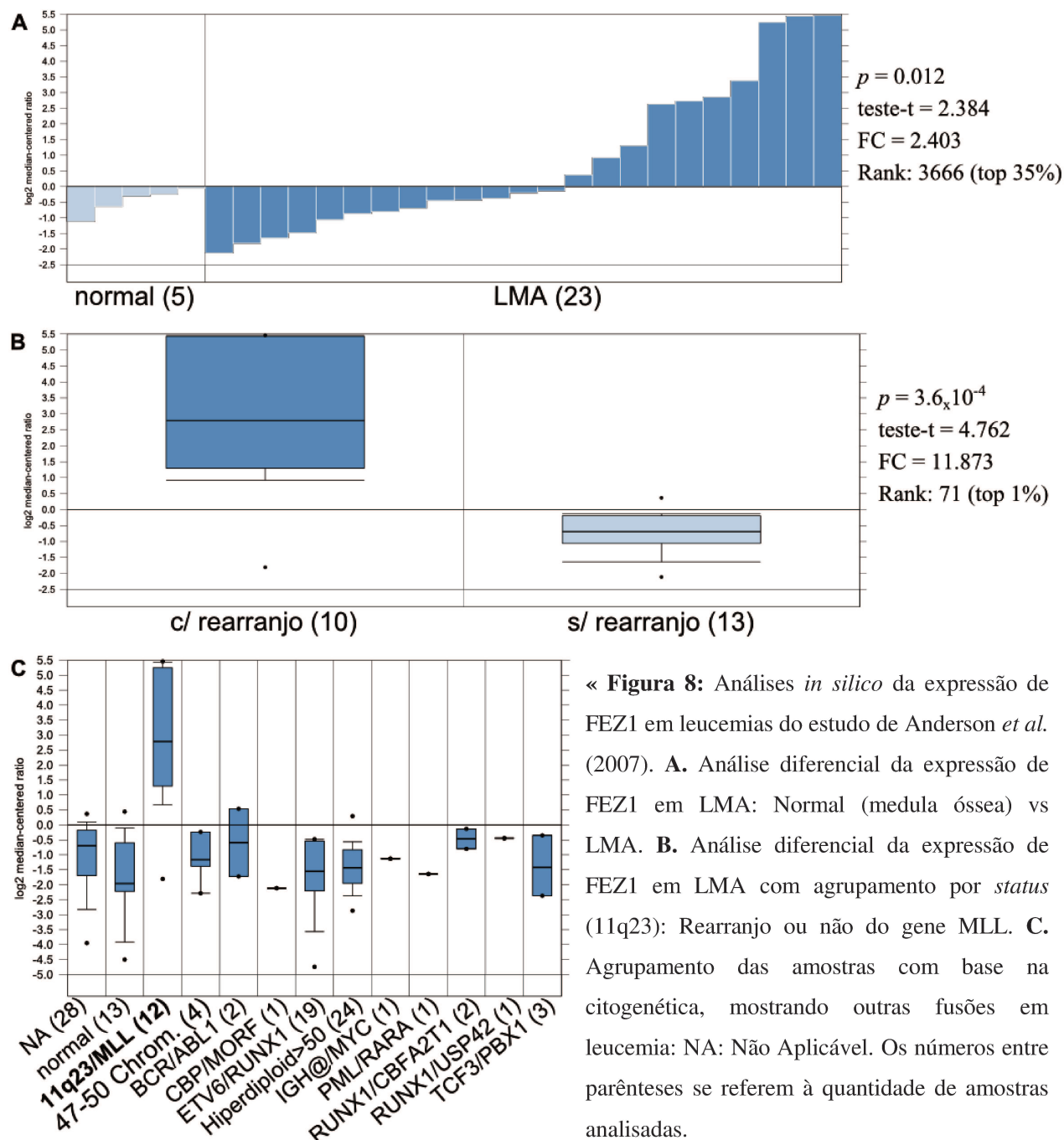


Figura 7: Análise diferencial da expressão de FEZ1 em linhagens primárias de leucemia, segundo a sensibilidade à droga Daunorubicina. Dados de Holleman *et al.* (2004). Os números entre parênteses se referem à quantidade de amostras analisadas.

As Figuras 8 e 9 são ilustrativas de como os dados de grandes populações podem mascarar a realidade sobre a expressão de um gene em situações específicas. Todos os dados são dos estudos de Anderson *et al.* (2007). Na Figura 8A, é mostrada a análise diferencial da expressão de FEZ1 em LMA em relação a um conjunto de amostras normais. As diferenças são significativas (*p-value*: 0.012). Porém, ao se fazer o mesmo tipo de análise e agrupando-se as amostras pelo *status* da região q23 do cromossomo 11, nota-se que há uma diferença muito maior: as amostras com rearranjo genético nessa região apresentam um nível de expressão significativamente maior do que o das amostras controle, como representado pelos valores *p-value*: 3.60×10^{-4} e *Fold change*: 11.873 (Figura 8B). Quando se analisam mais aprofundadamente as amostras,

agrupando-as pelo tipo detalhado de translocação (Figura 8C), e também quando faz-se uma análise de *Outliers* no 95° percentil (Figura 9A), isso ainda se mantém.



Oncomine (Compendia Bioscience, Ann Arbor, MI) foi usada para análise e visualizações

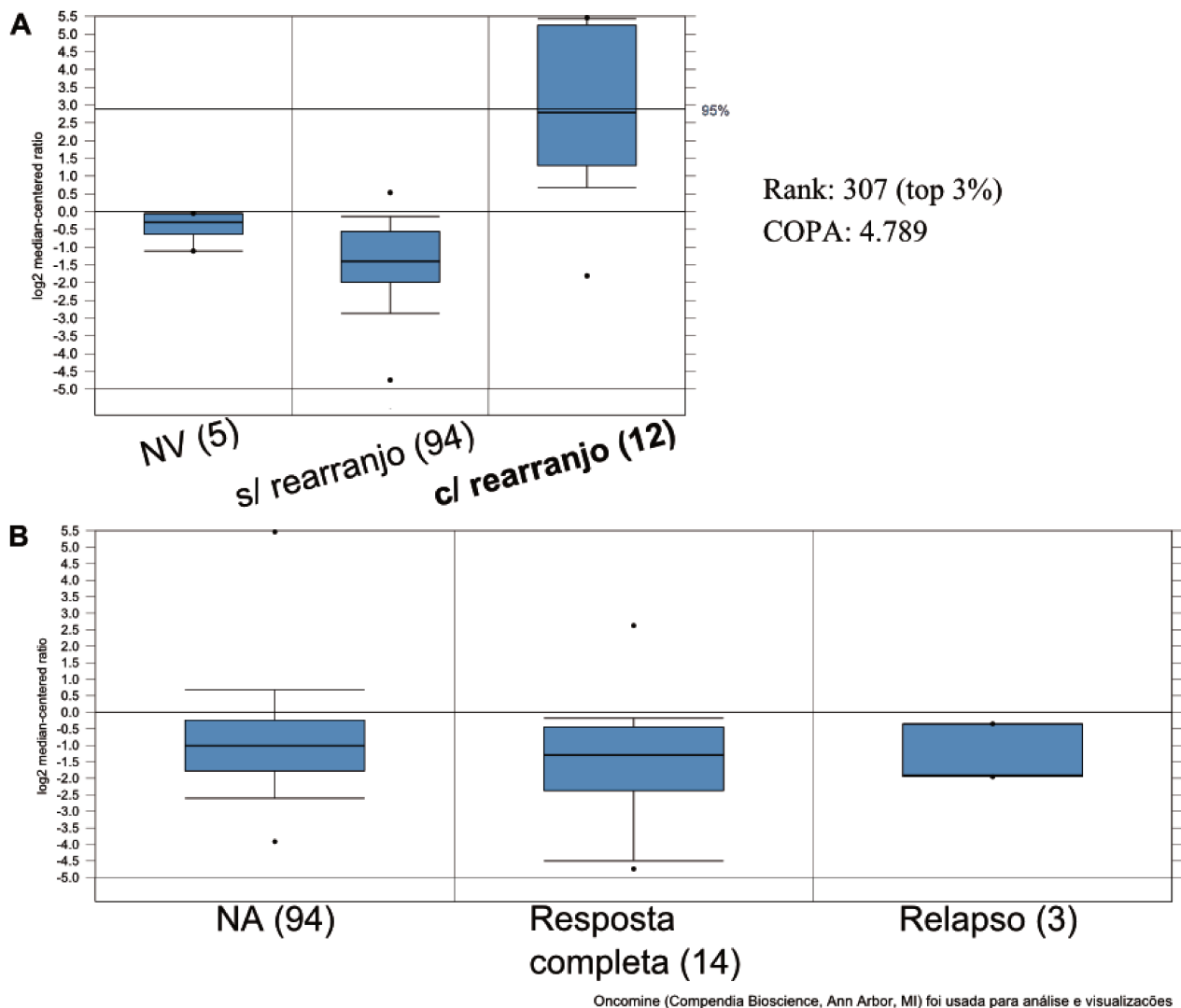


Figura 9: Detalhamento das análises da expressão de FEZ1 em leucemias no estudo de Anderson *et al.* (2007). **A.** Análise de *outliers* no 95º percentil com agrupamento das amostras com base na existência de rearranjo genético na região 11q23 em leucemias mieloides agudas. NV: *No value*. **B.** Detalhe da análise com agrupamento por decorrência do tratamento. NA: Não Aplicável. Os números entre parênteses se referem à quantidade de amostras analisadas.

Porém, ao se fazer uma análise com agrupamento das amostras por decorrência do tratamento, nota-se que a expressão de FEZ1 não varia com o tipo de resposta (Figura 9B). Na Figuras 10 e 11, são mostradas as análises de outros estudos envolvendo leucemias mieloides e linfoides, novamente denotando a possível relação entre a

ocorrência de rearranjos genéticos na região 11q23 do genoma e a expressão ectópica de FEZ1 em blastos leucêmicos.

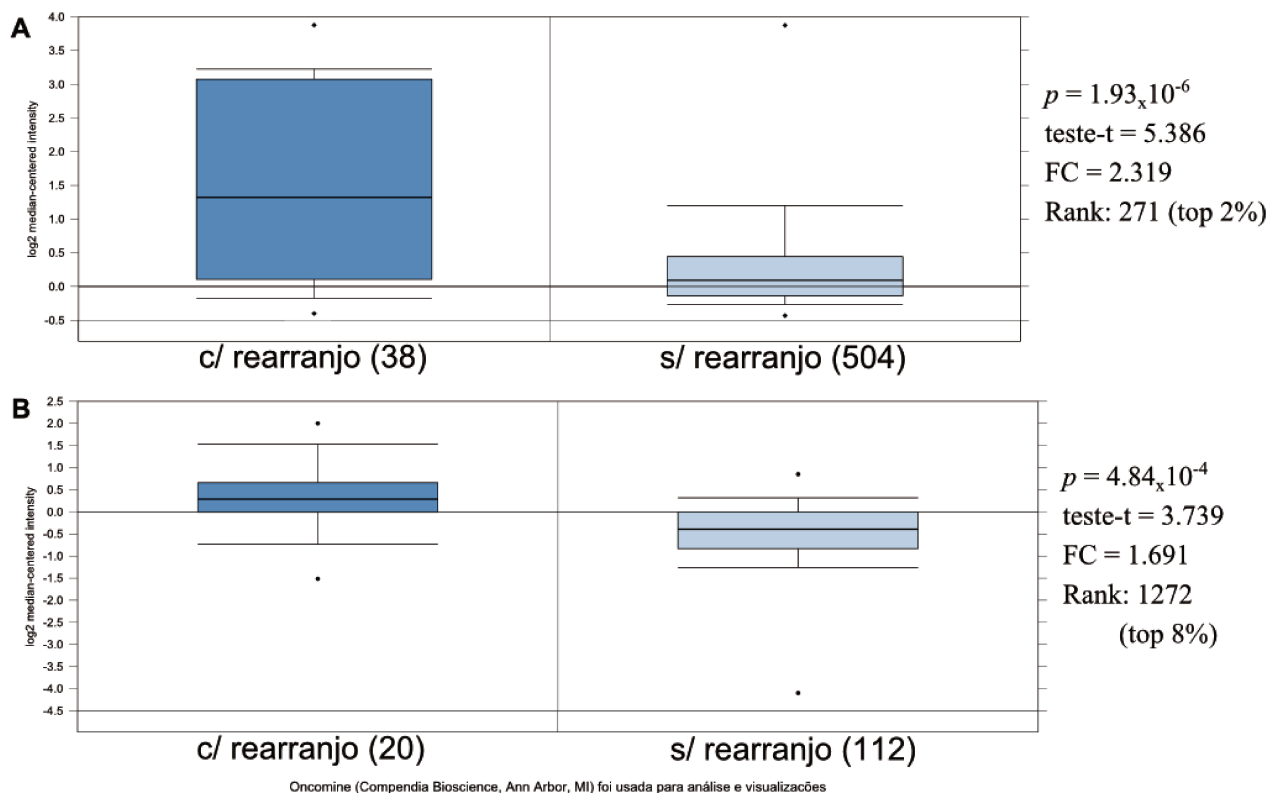
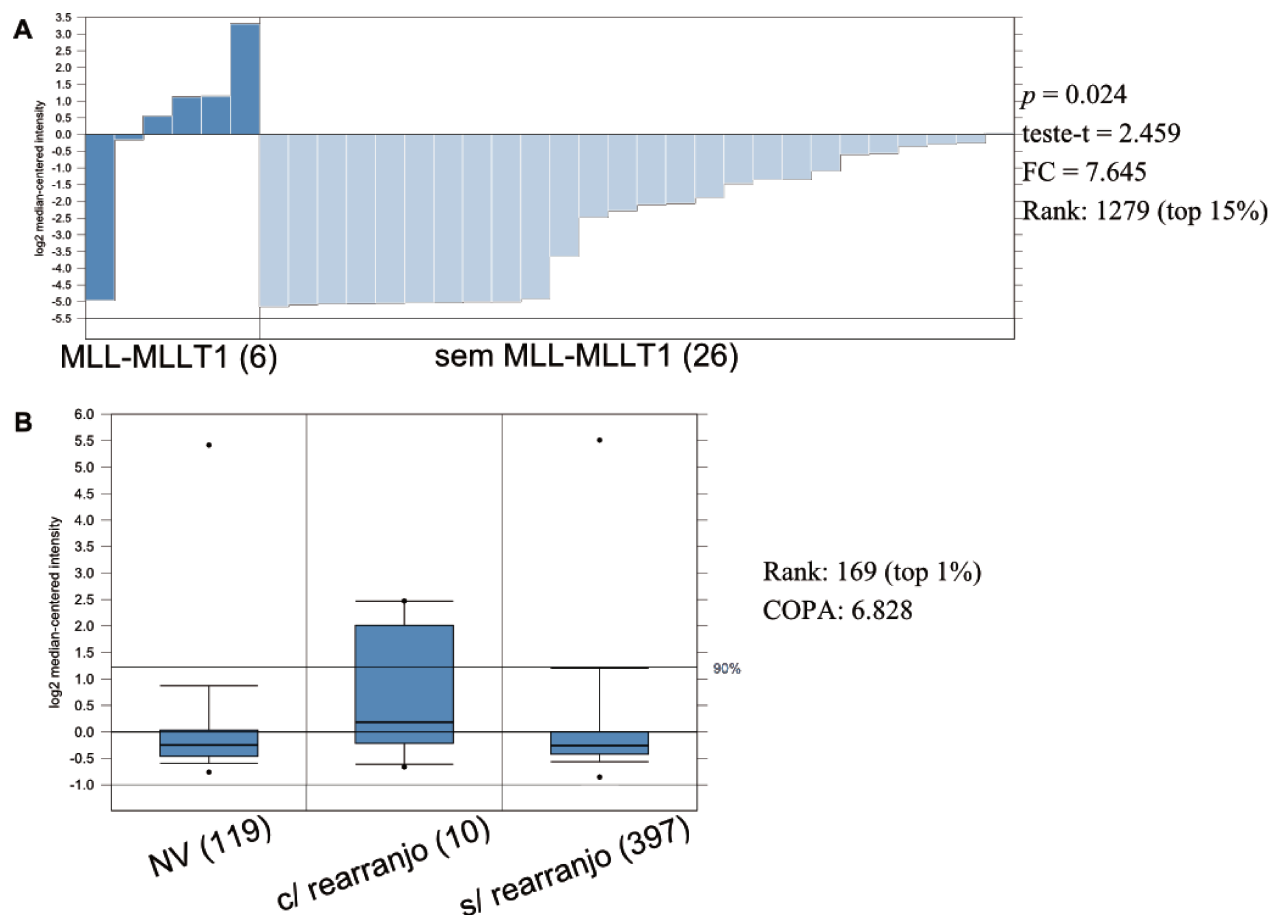


Figura 10: Análises *in silico* da expressão de FEZ1 em outras leucemias. **A.** Haferlach *et al.* (2010). Análise diferencial da expressão de FEZ1 em LMA com agrupamento por *status* (11q23). **B.** Ross *et al.* (2003). Análise diferencial da expressão de FEZ1 em Leucemia Linfóide Aguda (LLA), agrupada pelo *status* 11q23. Os números entre parênteses se referem à quantidade de amostras analisadas.

De fato, essa região genômica corresponde ao gene *MLL* (*Mixed-Lineage Leukemia*). O gene de FEZ1 está localizado muito próximo dessa região, mais especificamente na região 24 do mesmo braço (11q24.2). Fusões da proteína MLL, cujo produto constitui um fator de transcrição, estão associadas a diversos tipos de leucemia^{55,66}. Assim, a superexpressão de FEZ1 em células leucêmicas observada nessas análises poderia ser um efeito secundário da instabilidade genética, comum a diversos tipos de câncer, causada pelos rearranjos vizinhos. A Figura 12 ilustra o perfil da expressão de FEZ1 no 95º percentil ao longo de 11 *datasets* independentes, previamente

selecionados. Como pode ser visto, FEZ1 é, na média desses estudos, o 266º gene mais expresso, estando, na maioria dos estudos, entre os 1% mais expressos.



Oncomine (Compendia Bioscience, Ann Arbor, MI) foi usada para análise e visualizações

Figura 11: Análises *in silico* da expressão de FEZ1 em outras leucemias II. **A.** Tsutsumi *et al.* (2003). Análise diferencial da expressão de FEZ1 em LLA com agrupamento com base na fusão MLL-MLLT1. **B.** Wouters *et al.* (2009). Análise de *outliers* no 90º percentil em LMA agrupada por *status* da translocação 11q23. NV: *No value*. Os números entre parênteses se referem à quantidade de amostras analisadas.

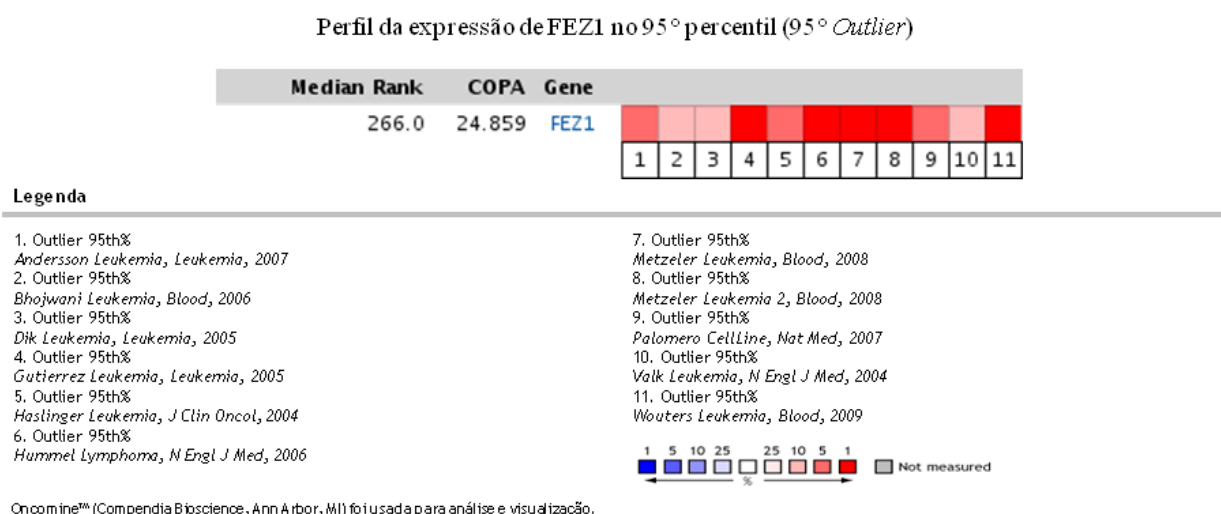


Figura 12: Análise de *outlier* para FEZ1 no 95° percentil. A expressão de FEZ1 foi comparada ao longo de diversos *datasets* independentes. O COPA score e o ranking médio de FEZ1 refletem a significância dessa superexpressão. Na Legenda é mostrada a origem dos *datasets*.

Após as análises *in silico* apontarem para o potencial de FEZ1 estar realmente expressa em células leucêmicas de pacientes, faltava ter esse resultado experimentalmente. Assim, PBMCs de pacientes com leucemia atendidos no Hemocentro da UNICAMP, coletadas ao longo de um ano conforme descrito, tiveram seus RNAs extraídos para serem analisados quanto à expressão de FEZ1, pela técnica de *Real-time qPCR*. Como as amostras eram pequenas e escassas, decidiu-se dar prioridade às análises no nível transcricional.

Assim, o primeiro passo para as análises por *Real-time qPCR* foi estabelecer a quantidade de cDNA a ser utilizada para cada amplificação, bem como determinar sua eficiência. Assim, construiu-se uma curva padrão com diferentes quantidades de cDNA (uma curva padrão, para quantificação absoluta) e, a partir da inclinação dessa curva, calculou-se a eficiência de amplificação (fórmula, Figura 13B) ^{67,68}.

Isso foi feito para 2 pacientes e também utilizando-se o cDNA feito a partir do RNA total de HEK superexpressando o mRNA de FEZ1 (Figura 13A). Como pode ser visto na tabela (Figura 13B), as eficiências das duas sondas não foram satisfatórias. Além disso, a partir desses dados, é possível construir uma curva de validação, em que

são comparadas as eficiências relativas de amplificação dos cDNAs para cada ponto da curva. A curva de validação deve possuir uma inclinação menor do que 0.1. Caso contrário, significa que as reações não têm eficiências iguais de amplificação, podendo levar a superestimativas quando da quantificação relativa (a expressão de FEZ1 em relação a GAPDH, nesse caso) ^{67,68}. Na Figura 13C, a inclinação da reta mostra que há variação das eficiências de amplificação para as duas sondas nos pontos da curva, dando inclinação maior à mesma.

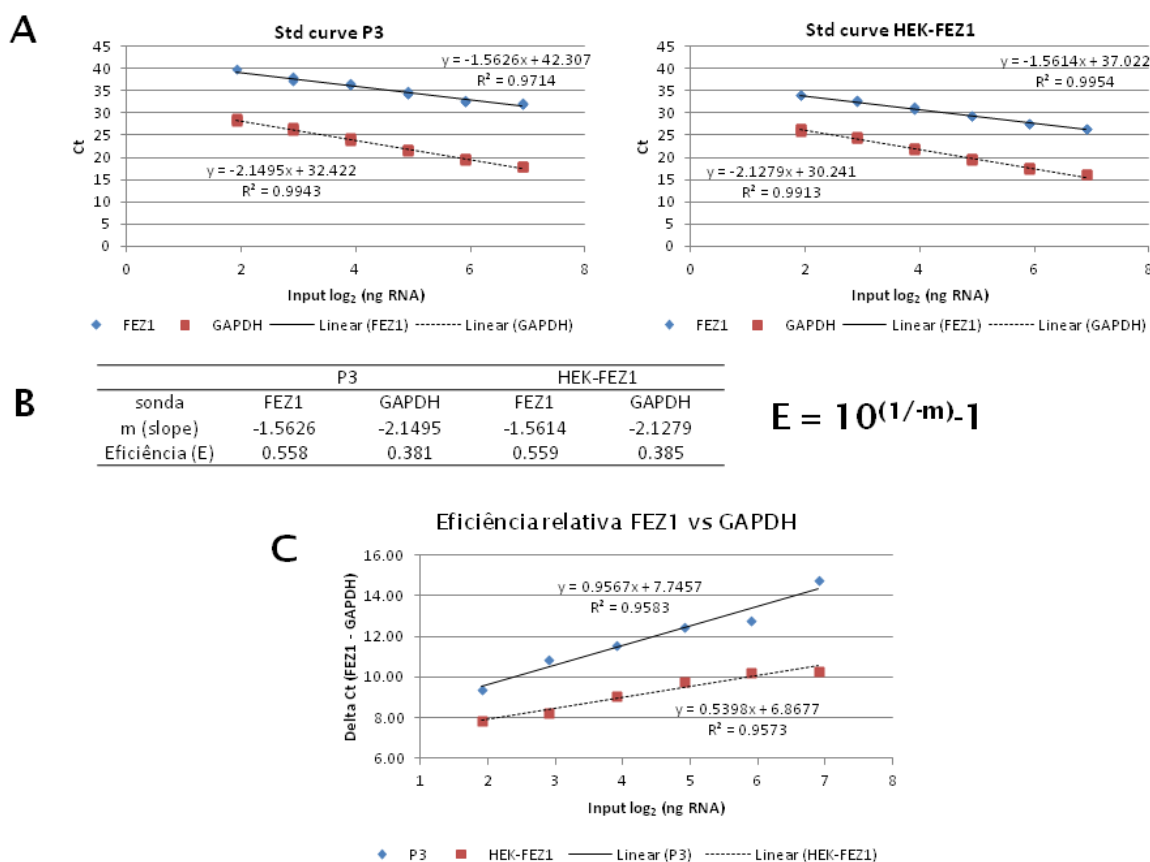


Figura 13: Padronização da amplificação de FEZ1 pela técnica de *Real Time qPCR* com a sonda *TaqMan*®. **A.** Construção das curvas de eficiência de amplificação de duas amostras: controle (HEK-FEZ1) e leucêmica (P3, paciente #3). **B.** Tabela e fórmula de cálculo das eficiências de amplificação a partir da inclinação das curvas (m). **C.** Curva de eficiência relativa de amplificação (FEZ1 vs. GAPDH).

Apesar de várias tentativas, não se conseguiu atingir eficiência de amplificação superior a 90%. Decidiu-se então por fazer a análise do maior número de amostras de uma vez, para que essas pudessem ser comparadas entre si. Embora a eficiência de amplificação não fosse alta, ao menos na placa em análise, ela seria igual ou próxima em todos os poços, permitindo a comparação entre os mesmos e as amostras controle dessa placa. Assim, as 9 melhores amostras de pacientes em termos de qualidade de RNA foram escolhidas para serem analisadas, juntamente com 4 controles, a saber: dois controles negativos (ECS C- e RHSF C-), PBMCs de doadores de sangue saudáveis, representando a condição normal, não leucêmica; e dois controles positivos, um sendo a célula THP-1, cuja expressão de FEZ1 já havia sido demonstrada em nível de proteína, e outro da linhagem HEK-293 Flp-In induzida a expressar a fusão FLAG-FEZ1.

As análises foram feitas utilizando-se a amostra RHSF C- como calibradora. Como pode ser visto na Figura 14, porém, não houve amplificação de nenhuma das amostras, mesmo dos controles positivos, permanecendo a constatação empírica da expressão de FEZ1 em células leucêmicas através de experimentos de *Real-time qPCR* uma lacuna a ser respondida.

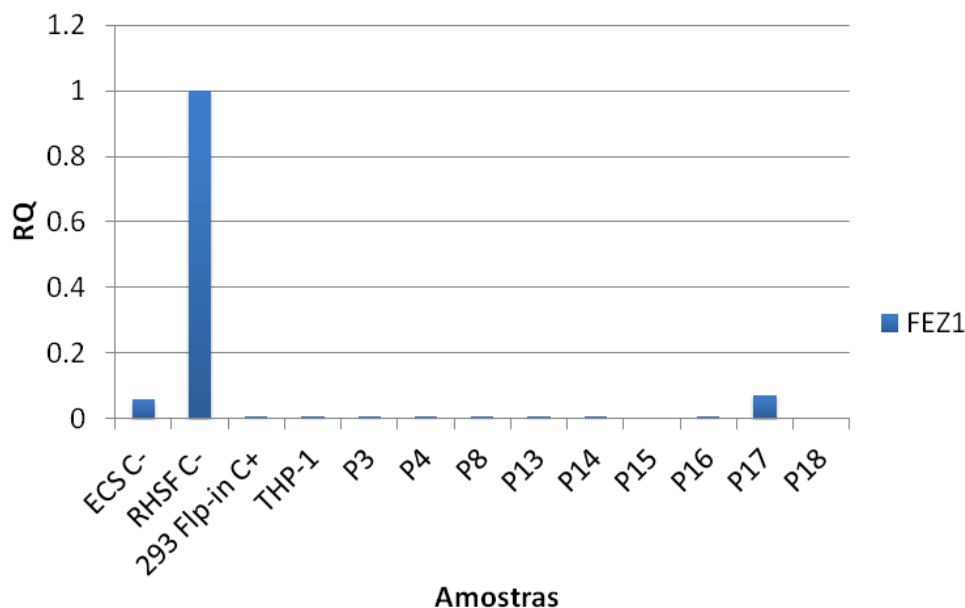


Figura 14: Análise da expressão relativa de FEZ1 em pacientes de leucemia. No total, foram analisados 9 pacientes (P#), dois controles negativos (doadores de sangue: ECS C- e RHSF C-) e dois controles positivos (293 Flp-in C+ e THP-1). Os dados foram calibrados em função da amostra RHSF C-. RQ = Quantificação Relativa.

4.2. Ensaios celulares: as consequências da expressão de FEZ1 para a célula.

Paralelamente aos estudos envolvendo leucemias, fizeram-se estudos para entender a funcionalidade para a célula da aquisição do fenótipo de núcleos multilobulados. Qual seria a vantagem ou desvantagem seletiva, se é que existiria alguma, da multilobulação ou mesmo da superexpressão de FEZ1? Por que, em uma transfecção, apenas 40% das células transfectadas apresenta o fenótipo de núcleos multilobulados ⁴⁶?

Como forma de responder a tais perguntas, o primeiro passo seria a obtenção de uma linhagem celular que pudesse ser analisada num tempo mais longo do que aquele da expressão transiente, decorrente de uma transfecção usual. Assim, partindo-se de um único clone, os efeitos decorrentes da variação nos níveis de expressão e na própria população de células poderiam ser minimizados e o evento ser estudado em mais detalhes. Além disso, pelo fato de não se saberem os efeitos deletérios ou tóxicos que a

superexpressão de FEZ1 poderia ter para a célula, a escolha por um sistema indutível se mostrou ideal.

Os cDNAs de FEZ1 e da fusão EGFP-FEZ1 (disponível no laboratório) foram clonados ao vetor pcDNA[®]5-FRT-FLAG (Figura 15A) e as linhagens HEK293 Flp-In “FLAG-FEZ1” e “FLAG-EGFP-FEZ1” foram obtidas conforme o protocolo descrito ⁶¹. Os clones obtidos foram testados quanto à expressão das fusões por *Western blotting* utilizando o anticorpo monoclonal anti-FLAG M2[®] (Sigma) e vários deles se mostraram positivos (Figura 15B). Vale ressaltar que tanto a proteína FEZ1 endógena, quanto as fusões, nesse caso, apresentam um padrão de migração diferente. Apesar de possuir ~45 kDa em massa, devido à grande quantidade de aminoácidos ácidos em sua cadeia, FEZ1 migra com massa aparente próxima a 70 kDa. A identidade das bandas foi confirmada por *stripping* e *Western blotting* utilizando o soro policlonal anti-FEZ1 (Proscience).

Curiosamente, mesmo em altas concentrações de tetraciclina, a linhagem HEK293 Flp-In EGFP-FEZ1 não apresentou emissão de fluorescência quando observada ao microscópio de fluorescência. Além disso, não foi observada quantidade significativa de células com núcleos multilobulados (dados não mostrados). Isso talvez se deva ao fato de a expressão transiente ser muito mais intensa do que no Sistema Flp-In[®] T-REx[®]. Mesmo diante desses resultados, foi dada continuidade aos experimentos com essas linhagens para tentar obter dados a respeito dos efeitos funcionais da expressão ectópica de FEZ1 para a célula.

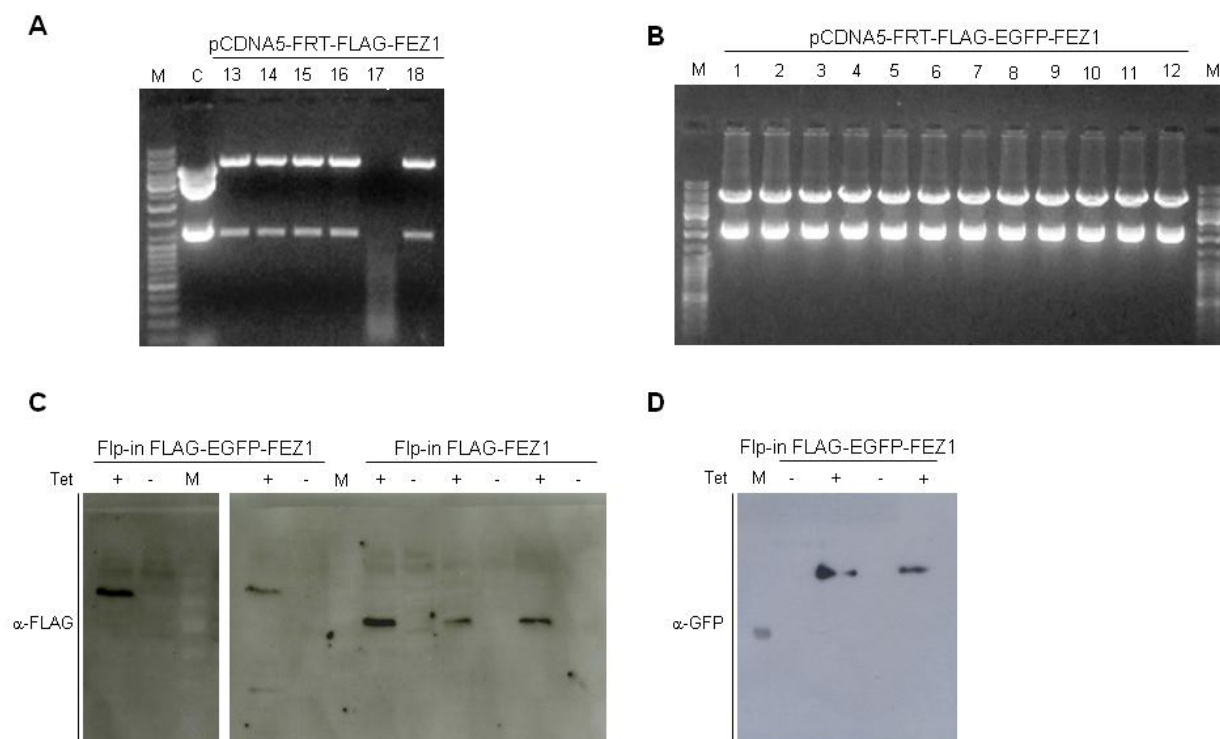


Figura 15: Clonagem e expressão de FEZ1 no sistema Flp-In™ T-REx. **A.** Análise de restrição com *Kpn I* e *Not I* de seis clones pCDNA5-FRT-FLAG-FEZ1. O clone #18 foi confirmado e levado a diante **B.** Análise de restrição com *Kpn I* e *Not I* de doze clones pCDNA5-FRT-FLAG-EGFP-FEZ1. O clone #10 foi confirmado e levado a diante. **C.** *Western blotting* do teste de indução de três clones celulares capazes de expressar a fusão FLAG-FEZ1 e dois, FLAG-EGFP-FEZ1. **D.** Confirmação da identidade dos dois clones FLAG-EGFP-FEZ1 utilizando o anticorpo anti-EGFP.

O primeiro experimento no sentido de identificar diferenças entre as células portando o vetor pcDNA®5-FRT-FLAG “vazio” ou expressando a fusão FLAG-FEZ1 foi o de acompanhamento da proliferação celular, utilizando o *kit Cell Titer 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*. Não houve diferença na forma das curvas de absorbância de HEK293 Flp-In FLAG-FEZ1 e FLAG-VAZIO, ao longo do tempo, o que é indicativo de que não há diferença nas taxas de proliferação das duas linhagens (Figura 16). Esse resultado se repetiu para os clones HEK293 Flp-In FLAG-EGFP-FEZ1 (dados não mostrados).

Essas células foram então testadas quanto à sua capacidade de crescer em meio contendo quimioterápicos como o taxol (Paclitaxel) e a vincristina (Sulfato de Vincristina), ambas utilizadas no tratamento de neoplasias. Tanto este, utilizado no tratamento de linfomas e leucemias, como aquele, utilizado para tratamento de tumores sólidos como de pulmão, ovário e mama, atuam sobre os microtúbulos, com mecanismos de ação, porém, distintos. Enquanto o taxol atua estabilizando os filamentos de microtúbulos, impedindo a sua dinâmica de remodelação, a vincristina atua justamente impedindo a formação de filamentos ao se ligar aos dímeros de tubulina livres ⁵⁶.

Como relatado, FEZ1 é uma proteína cujas funções estão em grande parte relacionadas à rede de microtúbulos da célula, constituindo elemento importante da maquinaria de transporte intracelular de proteínas e outras cargas ^{22,27}. Além disso, FEZ1 se associa diretamente aos microtúbulos ⁶⁹. Assim, será que FEZ1, através sua associação com os microtúbulos, poderia promover a resistência ou sensibilidade da célula à ação de algum desses compostos?

Porém, como mostrado nas Figuras 17 e 18, em várias concentrações desses compostos testadas, não houve diferença significativa na porcentagem de sobrevivência, comparando-se tanto células induzidas quanto não-induzidas.

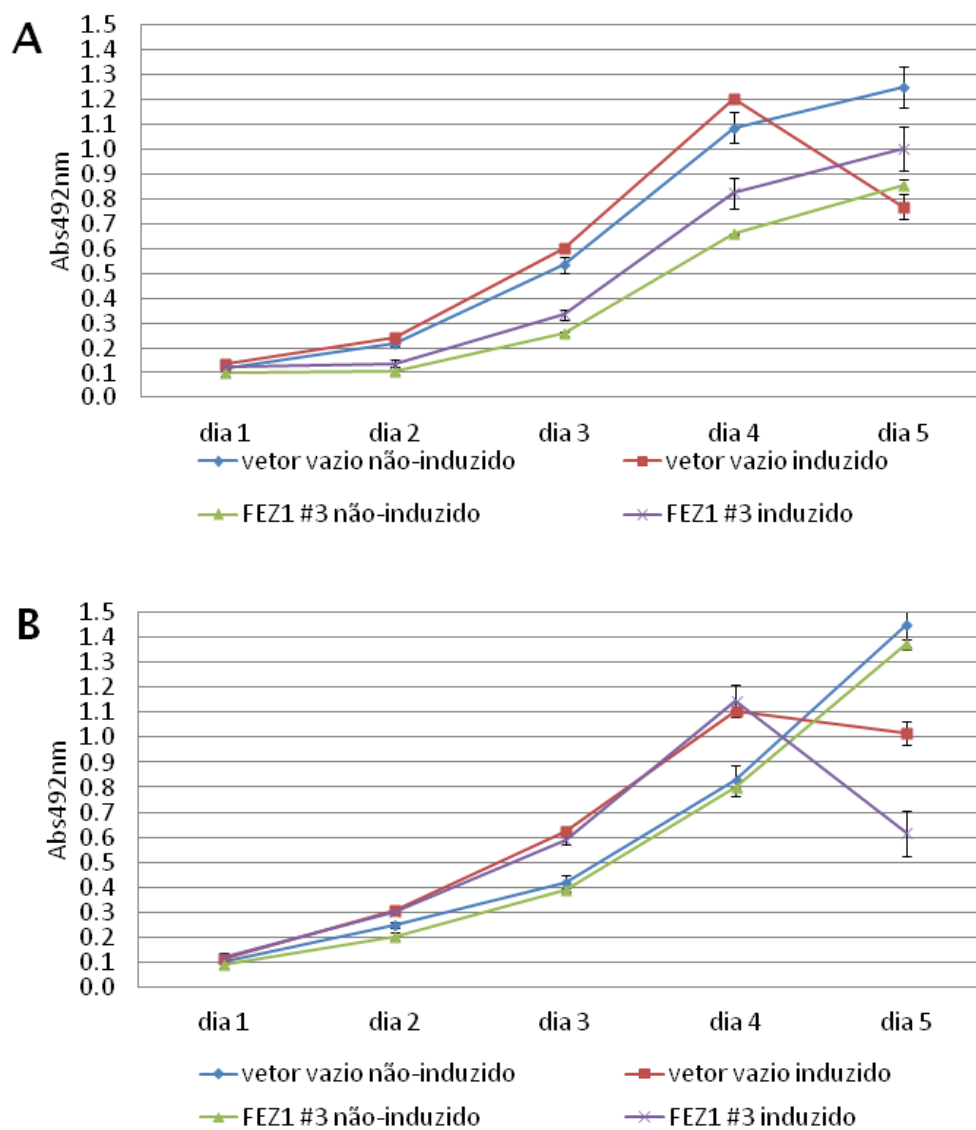


Figura 16: Ensaio de proliferação de células Flp-In™-293 expressando a fusão Flag-FEZ1. As medições foram iniciadas 48 horas após o plaqueamento de 5000 células por poço (pré-indução com 1000 ng/mL tetraciclina), utilizando o ensaio colorimétrico *Cell Titer 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay*. Os resultados estão apresentados em termos de absorbância a 492 nm. **A** e **B**. Repetições do mesmo experimento. Cada ponto da curva representa a média da leitura de três replicatas.

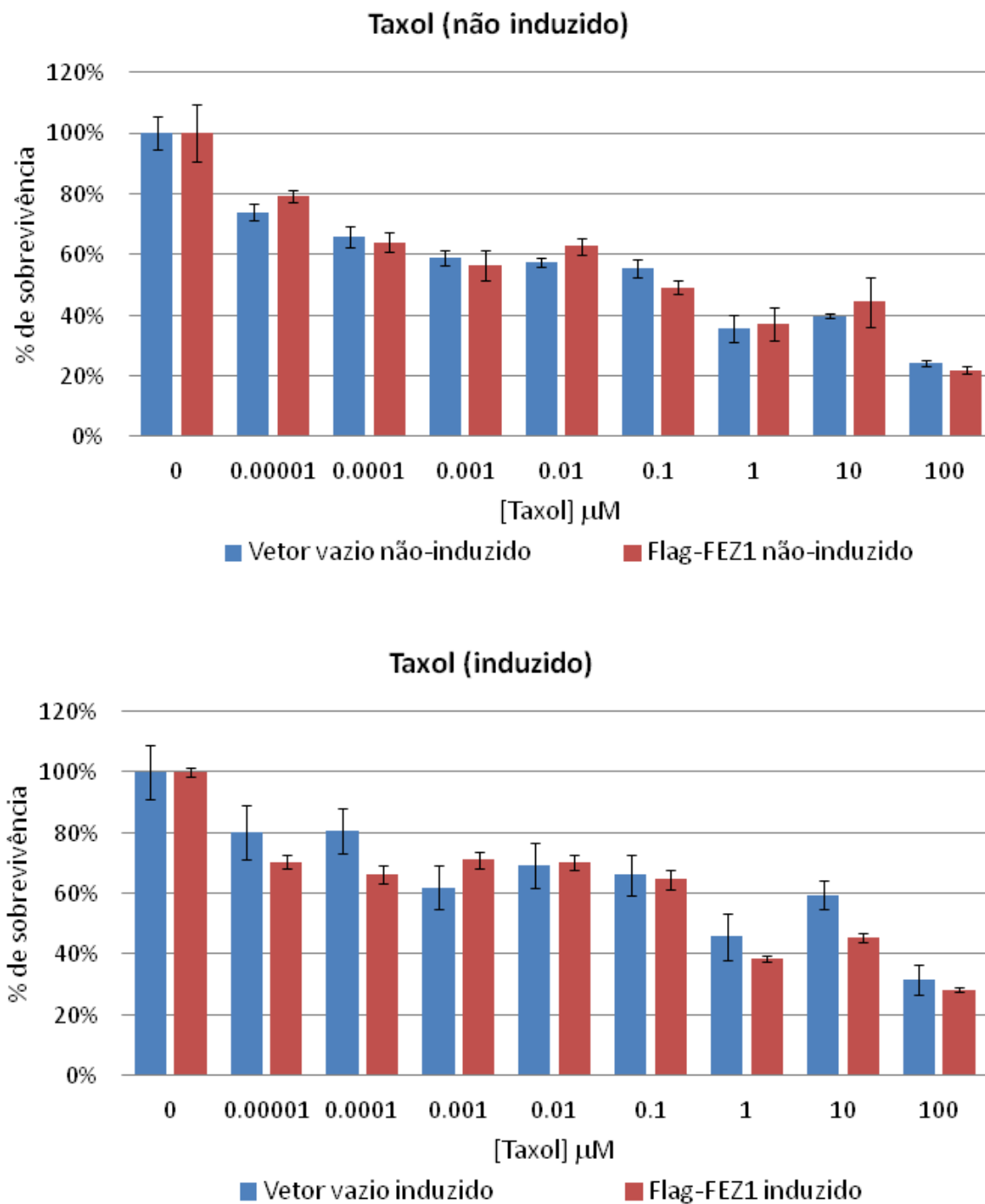


Figura 17: Ensaio de resistência ao tratamento com taxol. Células Flp-InTM-293 portando o vetor vazio ou a construção FLAG-FEZ1, induzidas e não-induzidas com tetraciclina (1000 ng/mL tetraciclina) foram expostas a várias concentrações do composto por 48 horas. A sobrevivência está expressa em porcentagem da leitura da absorbância de cada ponto em relação ao controle tratado com DMSO.

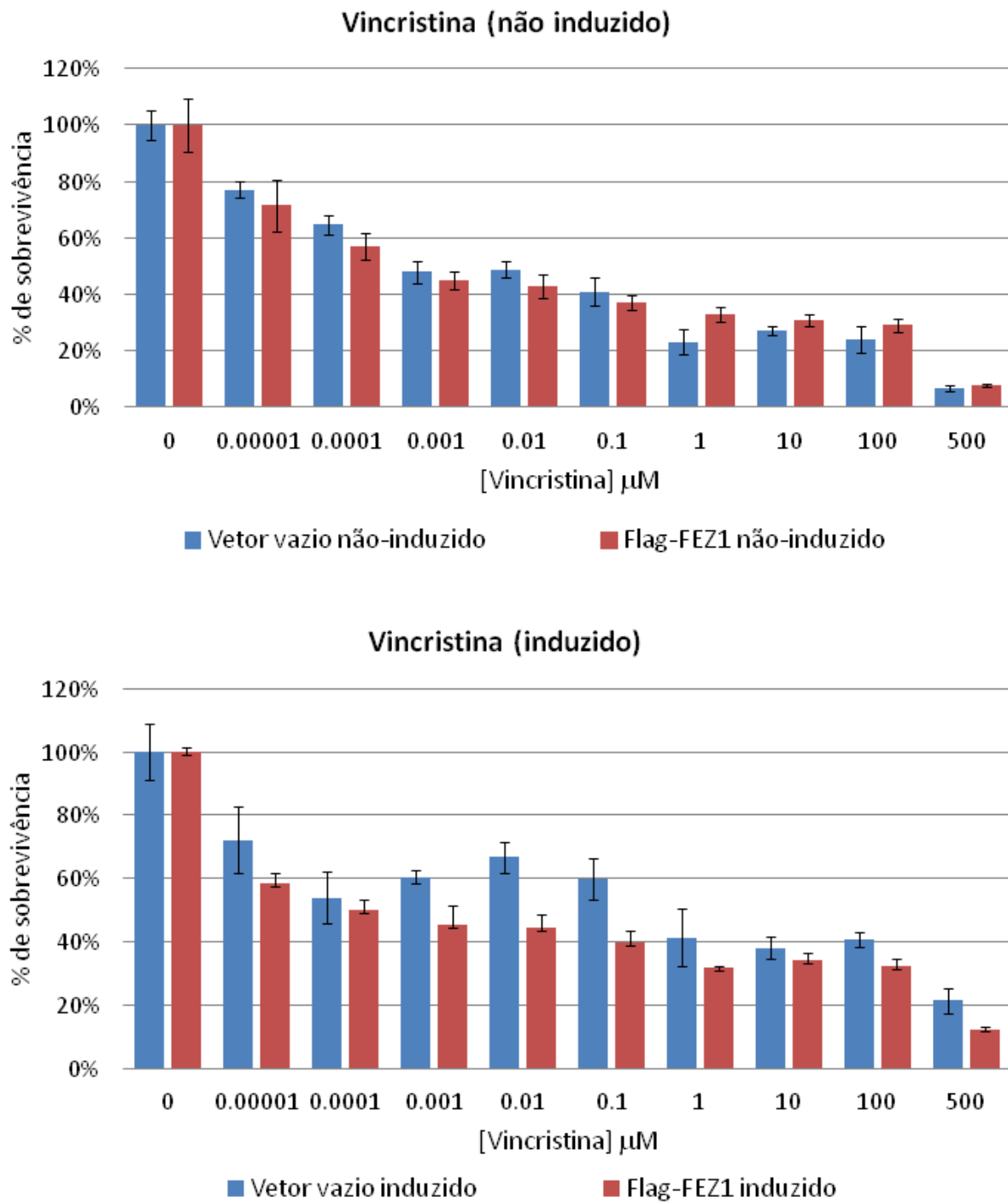


Figura 18: Ensaio de resistência ao tratamento com vincristina. Células Flp-InTM-293 portando o vetor vazio ou a construção FLAG-FEZ1, induzidas e não-induzidas com tetraciclina (1000 ng/mL tetraciclina) foram expostas a várias concentrações do composto por 48 horas. A sobrevivência está expressa em porcentagem da leitura da absorbância de cada ponto em relação ao controle não tratado.

4.3. O núcleo “flower-like” no contexto das interações de FEZ1.

Face aos resultados até então obtidos com as linhagens HEK293 Flp-In, decidiu-se por utilizá-las para aprofundar o nosso conhecimento a respeito das interações que FEZ1 é capaz de assumir na célula, bem como essas interações são reguladas pela ação de proteínas quinases da família das PKCs ativadas por PMA. Dados anteriores do nosso grupo demonstram que o tratamento com PMA aumenta a proporção de células HEK293 com núcleos multilobulados (Figura 19A, dados não publicados). Sabe-se ainda que a fosforilação de FEZ1 por PKCs *in vitro* acaba com sua interação com CLASP2, levando à hipótese de que o aumento observado na multilobulação sob tratamento com PMA possa ser consequência das mudanças no perfil de interações que FEZ1 estabelece quando é fosforilada ⁴¹.

Para descobrir que interações são essas, células HEK293 Flp-In Flag-FEZ1, induzidas com tetraciclina, foram tratadas (ou não) com PMA e a fusão Flag-FEZ1 foi imunoprecipitada juntamente com as proteínas parceiras de FEZ1. Com o intuito de se identificarem as interações inespecíficas mediadas pelo FLAG *tag*, a linhagem contendo o vetor pcDNA[®]5-FRT-FLAG “vazio” foi utilizada como controle.

A figura 19 traz a lista de proteínas que foram identificadas por espectrometria de massas. Infelizmente, não foram identificadas muitas proteínas e esse ensaio também não foi validado com uma repetição. Porém, nota-se na lista que a única proteína presente nas duas condições é SCOCO, parceiro de interação previamente descrito de FEZ1 ²⁶.

A proteína SCOCO foi descrita como um homólogo de UNC-69 de *C. elegans*, cujo mutante para esse gene apresenta os mesmos defeitos de locomoção associados à perda de UNC-76 ²⁶. A proteína SCOCO está envolvida no transporte de vesículas e sua ligação a FEZ1 constitui a associação com a maquinaria de transporte intracelular que se dá através dos microtúbulos e motores moleculares, como as *kinesinas* ²⁵. Curiosamente, SCOCO é estudada em nosso laboratório e, inclusive, em uma colaboração, foram feitos estudos de imunolocalização mostrando a colocalização de FEZ1 e SCOCO em uma estrutura perinuclear, possivelmente o centróssomo. Em outro projeto do grupo, o modo

como se dá essa associação está sendo detalhado através de ensaios de duplo-híbrido e novos parceiros de interação de SCOCO estão sendo descritos.

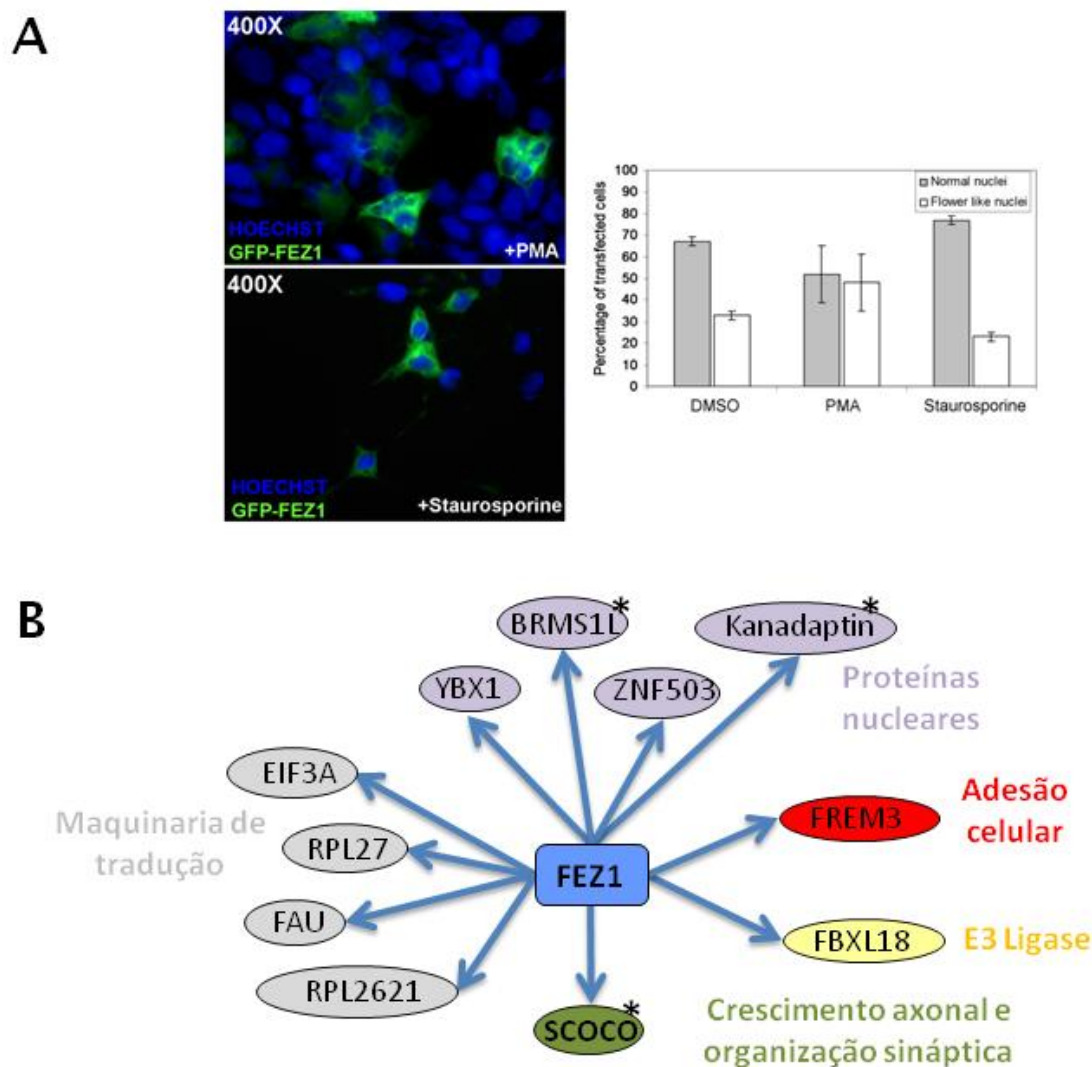


Figura 19: Núcleos multilobulados no contexto de regulação e interações de FEZ1. **A.** O efeito da atividade de proteínas quinases foi avaliado através do tratamento com PMA e *Staurosporina*, respectivamente, um ativador de PKCs e um inibidor genérico de quinases. Os dados do Dr. Daniel Lanza mostram que o tratamento com PMA aumenta a proporção de células com núcleos multilobulados. **B.** Esquema denotando as proteínas identificadas por MS em ambas condições (tratada e não tratada com PMA) separadas de acordo com processos/função. *=proteínas que apresentam domínios estruturais em *coiled-coils*. SCOCO foi a única proteína detectada em ambos os tratamentos.

Também é interessante notar que FEZ1 interage com fatores de transcrição, dentre outras proteínas nucleares (destacadas em lilás, Figura 19), como previamente descrito e publicado por nosso grupo através de ensaios de duplo-híbrido ³⁸. A capacidade de FEZ1 de se associar a proteínas nucleares ainda é uma questão em estudo, porém, é interessante notar que a proteína homóloga de SCOCO em aves, BERT, é capaz de regular, em nível transcricional, a expressão do fator de transcrição *Sox2* na placa neural de embriões de galinha, o que se dá pela sua associação com a proteína ERNI ⁷⁰. Há também a hipótese de que FEZ1 poderia atuar como mediadora do transporte de fatores de transcrição para o núcleo. Porém, um papel funcional para FEZ1 no núcleo também não pode ser descartado.

As proteínas que interagiram com FEZ1 apenas na condição controle foram BRMS1L, um fator de transcrição, e SLC4A1AP ou *Kanadaptin*. Estudos iniciais davam conta de que *Kanadaptin* é uma adaptadora do transporte da proteína kAE1 (*Kidney Anion Exchanger 1*), um canal iônico presente na membrana de células renais ⁷¹. Estudos recentes, porém, indicam que essas duas proteínas (*Kanadaptin* e *kAE1*) não interagem em células HEK293 e que *Kanadaptin* é uma proteína com múltiplas localizações e migra entre o núcleo e o citoplasma constantemente, porém, sua função exata ainda não é conhecida ^{71,72}.

Dentre as proteínas que interagiram apenas na condição tratada com PMA foram detectados peptídeos relacionados às proteínas FREM3 (*FRAS1-related*) e FBXL18. A proteína FREM3 é um componente da matriz extracelular, mais especificamente da lâmina basal e, curiosamente, camundongos *knockout* para os genes da família *Fras* apresentam agenesia renal, condição congênita na qual os rins não se desenvolvem. A expressão de FREM3 e FRAS1 é diminuída em rins policísticos de camundongos neonatos ^{73,74}. Interessantemente, FEZ1 começou a ser estudada em nosso grupo após ser identificada como parceiro de interação da proteína NEK1 em um *screening* duplo-híbrido cujo objetivo era encontrar proteínas relacionadas à Doença do Rim Policístico (PKD) ³⁵.

Já a proteína FBXL18 (*Isoform 1 of F-box/LRR-repeat protein 18*) parece constituir parte de um complexo com atividade de E3 Ligase ¹⁰. Além disso, FEZ1 se liga à

proteína E4B (UF2D) originariamente descrita como uma E4 (fator de montagem da cadeia de ubiquitina), mas que também funciona como uma E3 ligase. FEZ1 é poliubiquitinada por E4B, mas isso não influencia na sua estabilidade. A interação entre as duas promove a extensão de neuritos em células PC12 e é regulada por PKC ζ ¹⁰.

Além das interações com outras proteínas, as outras hipóteses que pairavam sobre os mecanismos de formação dos núcleos multilobulados levavam em consideração a própria estrutura de FEZ1 e a sua capacidade de dimerização. Durante a superexpressão, o excesso de FEZ1 na célula poderia levar à formação de dímeros “inespecíficos” entre populações de FEZ1 distintas (de ambas as extremidades dos microtúbulos, por exemplo), culminando na formação dos núcleos multilobulados⁴⁶.

Afinal, FEZ1 possui sequências com predição de formação de *coiled-coils* em sua estrutura que, além de mediar interações com outras proteínas³⁸, poderiam, em uma condição “anormal” (como o excesso de FEZ1 na célula), promover a formação inicial de dímeros “instáveis”, estabilizados então por uma ou mais das cinco cisteínas que fazem parte de sua cadeia polipeptídica. Em recente trabalho do grupo, foi demonstrado por imunoprecipitação e *Western blotting* que FEZ1 endógena forma dímeros em células HEK293⁴³. Para investigar se os *coiled-coils* preditos na estrutura de FEZ1 estão relacionados à formação dos núcleos multilobulados, os cDNAs correspondentes às porções isoladas da cadeia de FEZ1 que vão dos aminoácidos 229 ao 269 e dos aminoácidos 229 ao 303 foram clonados ao vetor pCDNA-FLAG e as construções pCDNA-FLAG-CC(229-269) e pCDNA-FLAG-CC(229-303) foram cotransfectadas cada qual com o vetor pEGFPC2-FEZ1 em células HEK293. A construção pEGFPC2-FEZ1 foi cotransfectada isoladamente como controle de tal forma que a redução ou aumento na contagem de núcleos multilobulados nas cotransfecções seria um indício da interferência dos *coiled-coils*. Vale ressaltar que, segundo nossas hipóteses, essa interferência poderia se dar tanto no sentido de impedir a dimerização, mas também impedindo a interação com outras proteínas. Os núcleos de células transfectadas de três experimentos independentes foram contados e as médias foram plotadas em histogramas como porcentagem de células transfectadas (Figura 20). Interessantemente, a

cotransfecção com pEGFPC2-FEZ1 e pCDNA-FLAG-CC(229-269) foi suficiente para reduzir a formação dos núcleos multilobulados em quase 40% quando comparado com a transfecção com pEGFPC2-FEZ1 apenas (Figura 20A), enquanto a cotransfecção com pCDNA-FLAG-CC(229-303) reduziu a ocorrência do fenótipo em 26%.

Já para avaliar a contribuição da dimerização através de pontes dissulfeto para a formação dos núcleos multilobulados, foi desenhada uma nova CDS sintética de FEZ1, na qual as cinco cisteínas foram substituídas por serinas. O cDNA sintético de FEZ1 sem cisteínas (FEZ1 *nocys*) foi clonado ao vetor pEGFPC2 e confirmado por sequenciamento e células HEK293 foram transfectadas. Transfecções com o vetor pEGFPC2 “vazio” (EGFP) ou contendo o cDNA de FEZ1 tipo selvagem (pEGFPC2-FEZ1 wt) foram feitas como controle. Os núcleos de células de três transfecções com cada vetor foram contados e as médias foram plotadas em histogramas como porcentagem de células transfectadas (Figura 20). Assim, como pode ser visto na Figura 20B, não houve diferença estatística significativa entre as transfecções com FEZ1 WT e FEZ1 *nocys*.

Aparentemente, apenas os *coiled-coils* seriam responsáveis pela formação dos núcleos multilobulados. Porém, parece haver uma pequena tendência de diminuição de núcleos multilobulados quando da transfecção com a construção FEZ1 *nocys* que poderia se mostrar significativa caso fosse investigado o efeito sinérgico dessa com o bloqueio pelos *coiled-coils* (Figura 20B).

Assim, seria razoável pensar que a formação dos núcleos multilobulados é um evento de natureza complexa e aleatória, e que para tal concorrem muitos fatores. Dentre esses, a dimerização de FEZ1 e a sua capacidade de estabelecer interações com diversos parceiros distintos, mediadas pelos domínios *coiled-coils*.

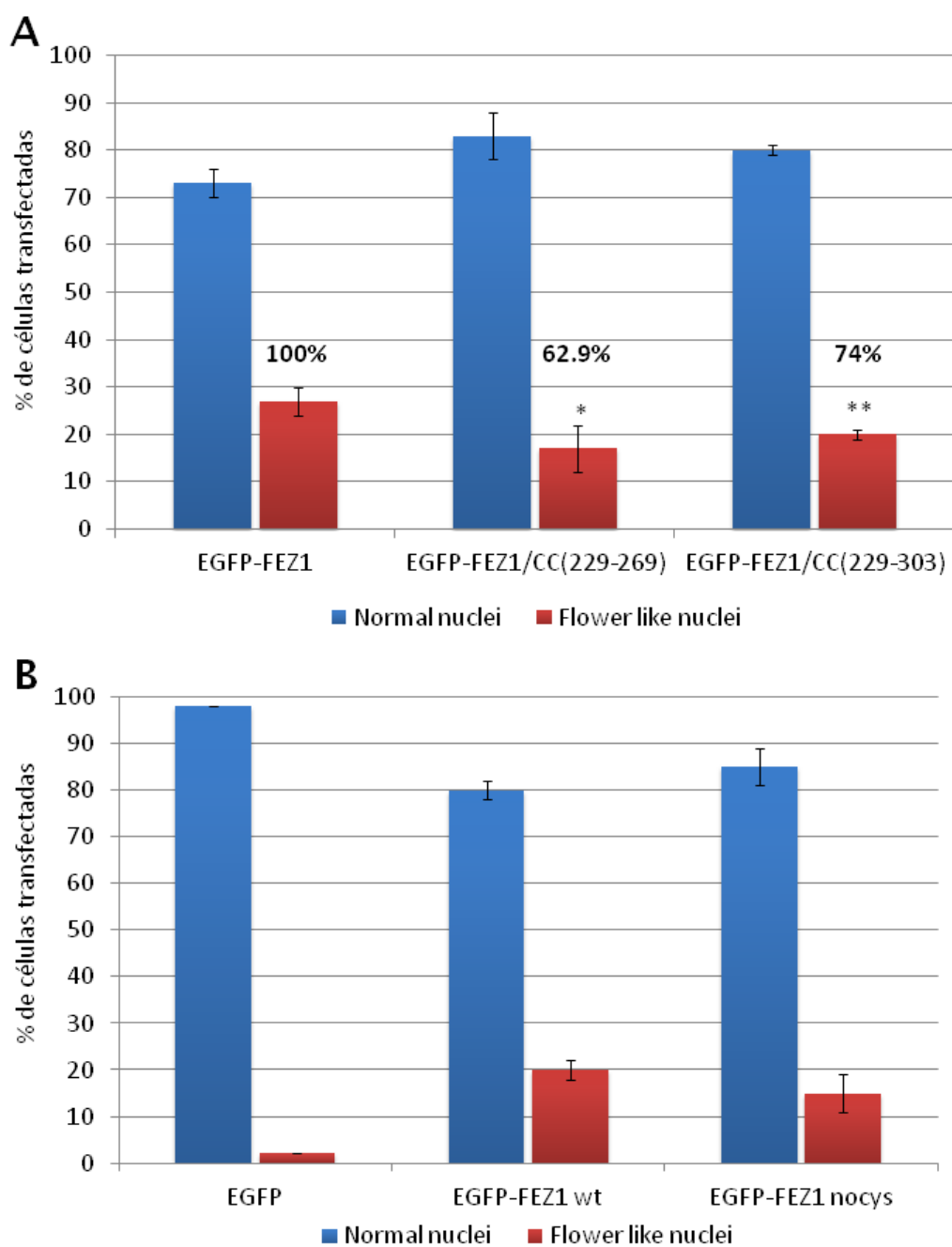


Figura 20: Ensaios de formação de núcleos multilobulados. **A.** Contagem de núcleos multilobulados em cotransfecção da construção EGFP-FEZ1 *full-length* com *coiled-coils* fusionados ao FLAG-tag (FLAG-FEZ1(229-269) e FLAG-FEZ1(229-303)). *p e **p < 0.05. Não há diferença quando se comparam as duas cotransfecções. **B.** Comparação da capacidade de formação de núcleos multilobulados pela expressão de mutante pontual de FEZ1 sem as cinco cisteínas (EGFP-FEZ1nocys). Não há diferença estatística entre as transfecções com EGFP-FEZ1 WT e EGFP-FEZ1nocys.

A capacidade de dimerização por pontes dissulfeto já foi demonstrada *in vitro* ⁴¹ e *in vivo* ⁴³. A cisteína 133 foi identificada por espectrometria de massas como sendo importante para o processo de formação do dímero ⁴³. Porém, a transfecção com uma construção de FEZ1 em que esse resíduo foi substituído por uma serina não levou à diminuição na proporção de células HEK293 transfectadas com núcleo multilobulado (dados não mostrados). Por essa razão, decidiu-se então construir o cDNA sintético, portando as cinco cisteínas mutadas.

Ademais, embora os ensaios de IP-MS do presente trabalho não tenham contribuído grandemente para aumentar o rol das interações de FEZ1 descritas, por outro lado representam uma amostra do que já se conhece: FEZ1 é uma proteína *hub*, capaz de interagir com diversos parceiros distintos e atuar em diferentes funções celulares ³⁸. As proteínas *hub* são três vezes mais importantes para a célula do que as proteínas não-*hub*, que interagem com apenas um ou dois parceiros, e sua deleção geralmente leva à morte celular ³⁹. Da mesma forma, é possível imaginar que a superexpressão dessas proteínas possa causar grandes perturbações, devidas, por exemplo, à ocorrência de interações “inespecíficas” ou “promíscuas”, em locais e tempos diferentes na célula, que poderiam levar a eventos extremos como é o caso dos núcleos multilobulados.

5. Conclusões e perspectivas

O objetivo desse trabalho foi tratar da questão da formação dos núcleos multilobulados sob diferentes perspectivas. Entender mecanística e funcionalmente como se dá a formação dos núcleos “*flower-like*” em células HEK293, bem como suas consequências funcionais para a célula em termos de sobrevivência, e tentar extrapolar um modelo que explicasse a ocorrência de células com fenótipo semelhante em leucemias mieloides.

Após a evidência inicial de que FEZ1 está expressa na linhagem de LMA M5, THP-1, em oposição às linhagens K562 e Jurkat, partiu-se para as análises das amostras de pacientes atendidos no Hemocentro da Unicamp. Embora as análises *in silico* apontassem para uma possível relação entre FEZ1 e leucemia, a expressão de FEZ1 em LMAs não pôde ser confirmada empiricamente. Os resultados obtidos não foram satisfatórios, talvez devido à qualidade das sondas e mesmo das amostras, visto que não foi possível padronizar as amplificações com o máximo de eficiência. Assim, novos experimentos deverão ser feitos no futuro com o objetivo de confirmar o que foi visto nas análises *in silico*.

Do ponto de vista funcional, conseguiu-se determinar que a superexpressão de FEZ1 não acarreta alteração na taxa de proliferação de células HEK293, bem como não promove resistência ou sensibilidade a agentes quimioterápicos como o taxol e a vincristina.

Nesse ponto, merece consideração o uso do sistema Flp-inTM T-RExTM (Invitrogen). No início, pareceu-nos uma escolha acertada combinar uma célula de expressão estável e ao mesmo tempo indutível, com a possibilidade de regular os níveis de expressão desejados. As transfecções estáveis permitem que se obtenha um *pool* homogêneo de células, dada a sua origem clonal, e assim garante-se que os resultados (que são médias) obtidos em um experimento representam mais fielmente a resposta de cada célula individualmente, ao passo que em transfecções transientes, o resultado geralmente é uma representação da realidade que congrega diferentes tipos de células, algumas mais transfectadas, outras menos e mesmo as não transfectadas. Todavia,

embora expressassem quantidades significativas das fusões FLAG-FEZ1 ou FLAG-EGFP-FEZ1, os clones de HEK293 Flp-In testados não formaram núcleos multilobulados.

Assim, conclui-se que o sistema Flp-inTM T-RExTM não foi uma escolha totalmente adequada ao tipo de evento que se queria observar. Como discutido, a ocorrência de núcleos multilobulados é um evento complexo e multifatorial. É consequência das propriedades de FEZ1, mas que, aparentemente, só ocorre quando os níveis de expressão são altíssimos, como aqueles que são alcançados por algumas células durante uma transfecção transiente. Além disso, células aderentes geralmente são mais resistentes a tratamentos com drogas citotóxicas do que células de crescimento em suspensão, que se dividem mais rapidamente. O uso de linhagens de crescimento em suspensão seria o próximo passo para melhor se visualizarem os efeitos da superexpressão de FEZ1 no contexto das leucemias. Os sistemas lentivirais de expressão poderiam ser utilizados no sentido de refinar essas hipóteses, bem como linhagens celulares como THP-1, capazes de expressar FEZ1.

Por outro lado, o uso do sistema Flp-inTM T-RExTM não invalida os resultados de IP-MS obtidos, que mostram que ainda há muitos contextos de atuação de FEZ1 na célula que ainda podem ser elucidados e que podem ajudar a entender melhor o seu papel no desenvolvimento do sistema nervoso e em desordens psicológicas.

Quanto à formação dos núcleos multilobulados, os experimentos de cotransfecção envolvendo os *coiled-coils* e de transfecção com FEZ1 mutada demonstram que sua estrutura íntegra é importante para a ocorrência do fenômeno. Os *coiled-coils* livres (FLAG-CCs) interferem na formação do fenótipo, talvez devido ao bloqueio à dimerização e à interação com os diversos parceiros de FEZ1 inteira. A transfecção com FEZ1 *nocys* somente não foi suficiente para diminuir significativamente a proporção de células transfectadas com esse fenótipo, mas novos experimentos são necessários para determinar o potencial de sinergismo que esses dois componentes (os *coiled-coils* e as cisteínas) podem ter sobre a ocorrência desse fenômeno.

Finalmente, os resultados das análises *in silico* de leucemias (se confirmados empiricamente), combinados aos resultados dos ensaios de viabilidade e de resistência a

quimioterápicos (que mostram que a superexpressão de FEZ1 não tem efeitos sobre a célula) e também os ensaios de inibição da formação de núcleos multilobulados, em conjunto, podem levar a crer que esse se trata na realidade de um fenômeno estocástico, ou seja, aleatório. O movimento aleatório das moléculas ao longo do espaço-tempo pode levar à variabilidade nos níveis de mRNA e proteínas, mesmo entre células de populações clonais, constituindo assim um ruído ⁷⁵. Significa dizer que células com genomas idênticos expostas a um mesmo ambiente não terão necessariamente fenótipos idênticos. Quando isso acontece, pode-se dizer que a célula está tomando decisões e inclui tanto divisões assimétricas quanto a diferenciação espontânea de células isogênicas expostas ao mesmo ambiente ⁷⁶.

A aleatoriedade das interações de FEZ1, uma proteína *hub*, produzida em excesso em um tipo celular não neuronal poderia explicar, por exemplo, por que apenas 40% das células transfectadas com a fusão GFP-FEZ1 apresenta núcleos multilobulados. Num modelo proposto, a translocação próxima ao *locus* de *FEZ1* poderia levar a um aumento de sua expressão. O acúmulo de FEZ1 em uma célula não neuronal pode então levar ou não à multilobulação, dependendo dos eventos e dos parceiros de interação com os quais as moléculas de FEZ1 venham a se encontrar, embora não cause maiores efeitos para a célula em questão. Ainda assim, estudar mais aprofundadamente esse fenômeno é importante, uma vez que desvendar quais são esses eventos, quais lhes são as vias de sinalização subjacentes e quais os parceiros que FEZ1 encontra “pelo caminho” pode dar pistas importantes para o entendimento de outros fenômenos biológicos de interesse, como o desenvolvimento neuronal e a esquizofrenia.

6. Referências

1. Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94 (1974).
2. Bloom, L. & Horvitz, H.R. The *Caenorhabditis elegans* gene *unc-76* and its human homologs define a new gene family involved in axonal outgrowth and fasciculation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 3414-9 (1997).
3. McIntire, S.L., Garriga, G., White, J., Jacobson, D. & Horvitz, H.R. Genes necessary for directed axonal elongation or fasciculation in *C. elegans*. *Neuron* **8**, 307-22 (1992).
4. Hedgecock, E.M., Culotti, J.G., Thomson, J.N. & Perkins, L.A. Axonal guidance mutants of *Caenorhabditis elegans* identified by filling sensory neurons with fluorescein dyes. *Developmental biology* **111**, 158-70 (1985).
5. Kuroda, S., Nakagawa, N., Tokunaga, C., Tatematsu, K. & Tanizawa, K. Mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* UNC-76 protein involved in axonal outgrowth is a protein kinase C zeta-interacting protein. *The Journal of cell biology* **144**, 403-11 (1999).
6. Honda, A. *et al.* Expression of fasciculation and elongation protein zeta-1 (FEZ1) in the developing rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **122**, 89-92 (2004).
7. Fujita, T. *et al.* Identification of a tissue-non-specific homologue of axonal fasciculation and elongation protein zeta-1. *Biochemical and biophysical research communications* **313**, 738-44 (2004).
8. Sakae, N. *et al.* Mice lacking the schizophrenia-associated protein FEZ1 manifest hyperactivity and enhanced responsiveness to psychostimulants. *Human molecular genetics* **17**, 3191-203 (2008).
9. Maturana, A.D., Fujita, T. & Kuroda, S. Functions of fasciculation and elongation protein zeta-1 (FEZ1) in the brain. *The Scientific World Journal* **10**, 1646-54 (2010).
10. Okumura, F., Hatakeyama, S., Matsumoto, M., Kamura, T. & Nakayama, K.I. Functional regulation of FEZ1 by the U-box-type ubiquitin ligase E4B contributes to neuritogenesis. *The Journal of biological chemistry* **279**, 53533-43 (2004).

11. Kang, E. *et al.* Interaction between FEZ1 and DISC1 in regulation of neuronal development and risk for schizophrenia. *Neuron* **72**, 559-71 (2011).
12. Miyoshi, K. *et al.* Disrupted-In-Schizophrenia 1, a candidate gene for schizophrenia, participates in neurite outgrowth. *Mol. Psychiatry* **8**, 685-694 (2003).
13. Flores, R., Hirota, Y., Armstrong, B., Sawa, A. & Tomoda, T. DISC1 regulates synaptic vesicle transport via a lithium-sensitive pathway. *Neuroscience research* **71**, 71-7 (2011).
14. Yu, Z. *et al.* Four mood stabilizers commonly induce FEZ1 expression in human astrocytes. *Bipolar disorders* **13**, 486-99 (2011).
15. Yamada, K. *et al.* Association analysis of FEZ1 variants with schizophrenia in Japanese cohorts. *Biological psychiatry* **56**, 683-90 (2004).
16. Koga, M. *et al.* Failure to confirm the association between the FEZ1 gene and schizophrenia in a Japanese population. *Neuroscience letters* **417**, 326-9 (2007).
17. Hodgkinson, C.A. *et al.* The FEZ1 Gene Shows No Association to Schizophrenia in Caucasian or African American Populations. *Neuropsychopharmacology* 190-196 (2007).doi:10.1038/sj.npp.1301177
18. Moens, L.N. *et al.* Sequencing of DISC1 Pathway Genes Reveals Increased Burden of Rare Missense Variants in Schizophrenia Patients from a Northern Swedish Population. *Schizophrenia* **6**, (2011).
19. Lipska, B.K. *et al.* Expression of DISC1 binding partners is reduced in schizophrenia and associated with DISC1 SNPs. *Human molecular genetics* **15**, 1245-58 (2006).
20. Sakae, N. *et al.* Mice lacking the schizophrenia-associated protein FEZ1 manifest hyperactivity and enhanced responsiveness to psychostimulants. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3191-3203 (2008).
21. Lee, S. *et al.* Essential role for the Prader-Willi syndrome protein neclin in axonal outgrowth. *Human molecular genetics* **14**, 627-37 (2005).

22. Blasius, T.L., Cai, D., Jih, G.T., Toret, C.P. & Verhey, K.J. Two binding partners cooperate to activate the molecular motor Kinesin-1. *The Journal of cell biology* **176**, 11-7 (2007).
23. Gindhart, J.G. *et al.* The kinesin-associated protein UNC-76 is required for axonal transport in the Drosophila nervous system. *Molecular biology of the cell* **14**, 3356-65 (2003).
24. Hackney, D.D. Jump-starting kinesin. *The Journal of cell biology* **176**, 7-9 (2007).
25. Luo, S. & Nonet, M.L. Regulators of kinesin involved in polarized trafficking and axon outgrowth. *Journal of biology* **5**, 8 (2006).
26. Su, C.-W. *et al.* The short coiled-coil domain-containing protein UNC-69 cooperates with UNC-76 to regulate axonal outgrowth and normal presynaptic organization in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of biology* **5**, 9 (2006).
27. Ikuta, J. *et al.* Fasciculation and elongation protein zeta-1 (FEZ1) participates in the polarization of hippocampal neuron by controlling the mitochondrial motility. *Biochemical and biophysical research communications* **353**, 127-32 (2007).
28. Cai, D., Hoppe, A.D., Swanson, J.A. & Verhey, K.J. Kinesin-1 structural organization and conformational changes revealed by FRET stoichiometry in live cells. *The Journal of cell biology* **176**, 51-63 (2007).
29. Hirokawa, N. & Takemura, R. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nature reviews. Neuroscience* **6**, 201-14 (2005).
30. Toda, H. *et al.* UNC-51/ATG1 kinase regulates axonal transport by mediating motor-cargo assembly. *Genes & development* **22**, 3292-307 (2008).
31. Chua, J.J.E. *et al.* Phosphorylation-regulated axonal dependent transport of syntaxin 1 is mediated by a Kinesin-1 adapter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2012).doi:10.1073/pnas.1113819109

32. Suzuki, T. *et al.* Identification of FEZ1 as a protein that interacts with JC virus agnoprotein and microtubules: role of agnoprotein-induced dissociation of FEZ1 from microtubules in viral propagation. *The Journal of biological chemistry* **280**, 24948-56 (2005).
33. Naghavi, M.H., Hatzioannou, T., Gao, G. & Goff, S.P. Overexpression of fasciculation and elongation protein zeta-1 (FEZ1) induces a post-entry block to retroviruses in cultured cells. *Genes & development* **19**, 1105-15 (2005).
34. Haedicke, J., Brown, C. & Naghavi, M.H. The brain-specific factor FEZ1 is a determinant of neuronal susceptibility to HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 14040-5 (2009).
35. Surpili, M.J., Delben, T.M. & Kobarg, J. Identification of proteins that interact with the central coiled-coil region of the human protein kinase NEK1. *Biochemistry* **42**, 15369-76 (2003).
36. Lu, K.P. & Hunter, T. The NIMA kinase: a mitotic regulator in *Aspergillus nidulans* and vertebrate cells. *Progress in cell cycle research* **1**, 187-205 (1995).
37. Letwin, K. *et al.* A mammalian dual specificity protein kinase, Nek1, is related to the NIMA cell cycle regulator and highly expressed in meiotic germ cells. *The EMBO journal* **11**, 3521-31 (1992).
38. Assmann, E.M., Alborghetti, M.R., Camargo, M.E.R. & Kobarg, J. FEZ1 dimerization and interaction with transcription regulatory proteins involves its coiled-coil region. *The Journal of biological chemistry* **281**, 9869-81 (2006).
39. Ekman, D., Light, S., Björklund, A.K. & Elofsson, A. What properties characterize the hub proteins of the protein-protein interaction network of *Saccharomyces cerevisiae*? *Genome biology* **7**, R45 (2006).
40. Jeong, H., Mason, S.P., Barabási, A.L. & Oltvai, Z.N. Lethality and centrality in protein networks. *Nature* **411**, 41-2 (2001).
41. Lanza, D.C.F. *et al.* Human FEZ1 has characteristics of a natively unfolded protein and dimerizes in solution. *Proteins* **74**, 104-21 (2009).

42. Stelzl, U. *et al.* A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* **122**, 957-68 (2005).
43. Alborghetti, M.R. *et al.* Human FEZ1 protein forms a disulfide bond mediated dimer: implications for cargo transport. *Journal of proteome research* **9**, 4595-603 (2010).
44. Mimori-Kiyosue, Y. *et al.* CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *The Journal of cell biology* **168**, 141-53 (2005).
45. Lanza, D.C.F. *et al.* FEZ1 interacts with CLASP2 and NEK1 through coiled-coil regions and their cellular colocalization suggests centrosomal functions and regulation by PKC. *Molecular and cellular biochemistry* **338**, 35-45 (2010).
46. Lanza, D.C.F., Trindade, D.M., Assmann, E.M. & Kobarg, J. Over-expression of GFP-FEZ1 causes generation of multi-lobulated nuclei mediated by microtubules in HEK293 cells. *Experimental cell research* **314**, 2028-39 (2008).
47. Sato, Y., Ohta, Y., Honda, Y., Kaji, M. & Oizumi, K. Diagnostic value of atypical lymphocytes in cerebrospinal fluid from adults with enteroviral meningitis. *Journal of neurology* **245**, 598-602 (1998).
48. Huang, J., Sweet, P., Slater, L.M., Sartorelli, A.C. & Leung, M.F. Microtubule-dependent multilobular organization of the nucleus in sensitive and multidrug-resistant L0 leukemia cells. *Cancer letters* **106**, 29-41 (1996).
49. Fukuda, R.-ichi *et al.* Alteration of phosphatidylinositol 3-kinase cascade in the multilobulated nuclear formation of adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 15213-8 (2005).
50. Bennett, J.M. *et al.* Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *British journal of haematology* **78**, 325-9 (1991).
51. Bennett, J.M. *et al.* Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of internal medicine* **103**, 460-2 (1985).

52. Bennett, J.M. *et al.* Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British journal of haematology* **33**, 451-8 (1976).
53. Bennett, J.M. *et al.* Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of internal medicine* **103**, 620-5 (1985).
54. Fathi, A.T., Grant, S. & Karp, J.E. Exploiting cellular pathways to develop new treatment strategies for AML. *Cancer treatment reviews* **36**, 142-50 (2010).
55. Schoch, C. *et al.* AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood* **102**, 2395-402 (2003).
56. Kavallaris, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nature reviews. Cancer* **10**, 194-204 (2010).
57. Kavallaris, M. *et al.* Multiple microtubule alterations are associated with Vinca alkaloid resistance in human leukemia cells. *Cancer research* **61**, 5803-9 (2001).
58. Rhodes, D.R. & Anstett, M. *Computing Fold Change. Oncomine Methods* 1-3 (2010).at <www.oncomine.org>
59. Rhodes, D.R. & Anstett, M. *Data Processing and Normalization. Oncomine Methods* 1-4 (2010).at <www.oncomine.org>
60. *Flp-InTM T-RExTM Core Kit. Manual* 55 (2001).at <www.lifetechnologies.com>
61. *ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel. Manual* 8 (Saint Louis,).at <www.sigma-aldrich.com>
62. Tsuchiya, S. *et al.* Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer research* **42**, 1530-6 (1982).
63. Li, Z. *et al.* High-affinity neurotrophin receptors and ligands promote leukemogenesis. *Blood* **113**, 2028-37 (2009).

64. Fujita, T. *et al.* Axonal guidance protein FEZ1 associates with tubulin and kinesin motor protein to transport mitochondria in neurites of NGF-stimulated PC12 cells. *Biochemical and biophysical research communications* **361**, 605-10 (2007).
65. Rhodes, D.R. *Cancer Outlier Profile Analysis (COPA). Oncomine Tutorial* (2010).at <www.oncomine.org>
66. Drexler, H.G., Quentmeier, H. & MacLeod, R.A.F. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of MLL gene alterations. *Leukemia* **18**, 227-32 (2004).
67. *Amplification Efficiency of TaqMan Gene Expression Assays. Application Note 6* (Carlsbad, 2006).at <www.appliedbiosystems.com>
68. *Real-time PCR: Understanding Ct. Application Note 6* (Carlsbad, 2011).at <www.appliedbiosystems.com>
69. Koushika, S.P. “JIP”ing along the axon: the complex roles of JIPs in axonal transport. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **30**, 10-4 (2008).
70. Papanayotou, C. *et al.* A mechanism regulating the onset of Sox2 expression in the embryonic neural plate. *PLoS biology* **6**, e2 (2008).
71. Hübner, S., Bahr, C., Gössmann, H., Efthymiadis, A. & Drenckhahn, D. Mitochondrial and nuclear localization of kanadaptin. *European journal of cell biology* **82**, 240-52 (2003).
72. Kittanakom, S., Keskanokwong, T., Akkarapatumwong, V., Yenchitsomanus, P.-thai & Reithmeier, R.A.F. Human kanadaptin and kidney anion exchanger 1 (kAE1) do not interact in transfected HEK 293 cells. *Molecular membrane biology* **21**, 395-402 (2004).
73. Kerecuk, L. *et al.* Expression of Fraser syndrome genes in normal and polycystic murine kidneys. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* (2012).doi:10.1007/s00467-012-2100-5
74. Pavlakis, E., Chiotaki, R. & Chalepakis, G. The role of Fras1/Frem proteins in the structure and function of basement membrane. *The international journal of biochemistry & cell biology* **43**, 487-95 (2011).

75. Munsky, B., Neuert, G. & van Oudenaarden, a. Using Gene Expression Noise to Understand Gene Regulation. *Science* **336**, 183-187 (2012).
76. Balázsi, G., van Oudenaarden, A. & Collins, J.J. Cellular decision making and biological noise: from microbes to mammals. *Cell* **144**, 910-25 (2011).

7. Anexos

7.1. Artigo aceito para publicação.

Em seguida, é apresentado o artigo intitulado “*Identification and characterization of an alternatively spliced isoform of the human protein phosphatase 2A α catalytic subunit.*” recentemente publicado no *Journal of Biological Chemistry* (10 de Fevereiro de 2012; 287 (7): 4853-62), fruto do projeto de iniciação científica do aluno, intitulado “**Análise do Padrão de Expressão e das Interações Protéicas de uma Nova Isoforma da Subunidade Catalítica da Proteína Fosfatase 2A (PP2Ac)**”, também apoiado pela FAPESP (número de processo 2008/10615-4).

Embora não se trate de um artigo relacionado ao tema do projeto de mestrado, compartilha com esse o uso de técnicas de biologia molecular e constituiu grande fonte de aprendizado e desenvolvimento para o aluno. Alguns experimentos cruciais para o aceite do artigo foram concluídos pelo aluno juntamente com os outros autores, ainda durante o período do mestrado.

Identification and Characterization of an Alternatively Spliced Isoform of the Human Protein Phosphatase 2A α Catalytic Subunit^{*[5]}

Received for publication, July 18, 2011, and in revised form, November 28, 2011. Published, JBC Papers in Press, December 13, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.283341.

Deivid L. S. Migueleti^{†§1}, Juliana H. C. Smetana^{†1}, Hugo F. Nunes[‡], Jörg Kobarg^{‡§2,3}, and Nilson I. T. Zanchin^{¶||2,4}

From the [†]Laboratório Nacional de Biotecnologias, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, [‡]Instituto de Biologia, and [¶]Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-875 Campinas, São Paulo, Brazil and the ^{||}Instituto Carlos Chagas/Fundação Instituto Oswaldo Cruz, CEP 81350-010 Curitiba, Paraná, Brazil

Background: The catalytic subunit of the PP2A phosphatase interacts with structural and regulatory proteins and can be regulated post-translationally by phosphorylation and methylation.

Results: A novel alternatively spliced isoform of the PP2A catalytic subunit has been identified.

Conclusion: The alternatively spliced isoform shows a specific interaction profile and no phosphatase activity.

Significance: The alternatively spliced isoform may represent a novel mechanism of PP2A regulation.

PP2A is the main serine/threonine-specific phosphatase in animal cells. The active phosphatase has been described as a holoenzyme consisting of a catalytic, a scaffolding, and a variable regulatory subunit, all encoded by multiple genes, allowing for the assembly of more than 70 different holoenzymes. The catalytic subunit can also interact with $\alpha 4$, TIPRL (TIP41, TOR signaling pathway regulator-like), the methyl-transferase LCMT-1, and the methyl-esterase PME-1. Here, we report that the gene encoding the catalytic subunit PP2A α can generate two mRNA types, the standard mRNA and a shorter isoform, lacking exon 5, which we termed PP2A $\alpha 2$. Higher levels of the PP2A $\alpha 2$ mRNA, equivalent to the level of the longer PP2A α mRNA, were detected in peripheral blood mononuclear cells that were left to rest for 24 h. After this time, the peripheral blood mononuclear cells are still viable and the PP2A $\alpha 2$ mRNA decreases soon after they are transferred to culture medium, showing that generation of the shorter isoform depends on the incubation conditions. FLAG-tagged PP2A $\alpha 2$ expressed in HEK293 is catalytically inactive. It displays a specific interaction profile with enhanced binding to the $\alpha 4$ regulatory subunit, but no binding to the scaffolding subunit and PME-1. Consistently, $\alpha 4$ out-competes PME-1 and LCMT-1 for binding to both PP2A α isoforms in pulldown assays. Together with molecular modeling studies, this suggests that all three regulators share a common binding surface on the catalytic sub-

unit. Our findings add important new insights into the complex mechanisms of PP2A regulation.

Reversible phosphorylation is the most common mechanism of signal transduction in eukaryotic cells. Phosphatases play a pivotal role in this process, allowing a fine tuning of the activity, localization, and half-life of regulatory proteins involved in specific biochemical pathways (1, 2).

Type 2A phosphatases (PP2A, ⁵ PP4, and PP6) belong to the PPP subfamily and act on a variety of substrates and cellular processes, including DNA replication, transcriptional regulation, translation, signal transduction, and apoptosis (1–3). PP2A is the major soluble serine/threonine-specific phosphatase in animal cells and one of the most conserved eukaryotic proteins (1, 2). The active PP2A phosphatase has been described as a holoenzyme consisting of a catalytic subunit (C), a scaffolding (PR65/A), and one of the several variable regulatory subunits (B). The diversity of regulatory subunits allows tight regulation of its substrate specificity and subcellular localization, and additional cellular and viral proteins can also associate with PP2A and regulate its activity (1, 2, 4). PP2A is a tumor suppressor, and its inactivation by mutations or viral proteins is a major mechanism of cellular transformation (5–8).

The combination of different types of catalytic, scaffolding, and regulatory subunits results in more than 70 different PP2A holoenzymes, each one exhibiting different specificity. However, this diversity relies mostly on the variable regulatory subunits, whereas the catalytic and scaffolding subunits display limited variability. Holoenzyme assembly is also under post-translational regulation by modifications such as phosphorylation or methylation of the catalytic subunit. Reversible methylation of PP2A C-terminal is mediated by leucine car-

^{*} This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, and Laboratório Nacional de Biotecnologias, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais.

[5] This article contains supplemental Figs. S1–S4.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Joint senior authors.

³ To whom correspondence may be addressed: Laboratório Nacional de Biotecnologias, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro 10.000, C.P.6192, 13084-971 Campinas, São Paulo, Brazil. Tel.: 55-19-3512-1125; Fax: 55-19-3512-1006; E-mail: jorg.kobarg@lnbio.org.br.

⁴ To whom correspondence may be addressed: Instituto Carlos Chagas/Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rua Alcayr Munhoz Mader 3775, CEP 81350-010 Curitiba, Paraná, Brazil. Tel.: 55-41-2104-3225; Fax: 55-41-3316-3267; E-mail: nilson.zanchin@pq.cnpq.br.

⁵ The abbreviations used are: PP2A, protein phosphatase 2A; PME-1, protein phosphatase methyl esterase-1; LCMT-1, leucine carboxy-methyl transferase 1; RPS6, ribosomal protein S6; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PHA, phytohemagglutinin; HEK293, human embryonic kidney 293; TIPRL, TOR signaling pathway regulator-like.

A PP2A α Splicing Isoform with Selective Interaction Profile

boxy-methyl transferase 1 (LCMT-1) and protein phosphatase methyl esterase-1 (PME-1) (9, 10), which can form complexes with the catalytic subunit.

Tap42/ α 4 and Tip41/TIPRL are regulatory proteins that can associate with PP2A catalytic subunits as well as with PP4c and PP6c (11). Both can interact simultaneously constituting a trimeric complex (12). α 4 has been recognized as a major regulator of PP2A complex assembly and PP2Ac degradation (13, 14). It suppresses the stress response factor c-Jun and represses p53-dependent transcription and apoptosis by maintaining both substrates in a low phosphorylation state (13). α 4 deletion promotes apoptosis in a variety of cell lines and leads to progressive loss of all PP2A, PP4, and PP6 complexes. Association with α 4 renders newly synthesized or old free catalytic subunits enzymatically inactive and resistant to proteasomal degradation until their assembly into functional phosphatase complexes (14). It was demonstrated that the ubiquitin-interacting motif of α 4 mediates the interaction with monoubiquitinated forms of PP2Ac protecting them from polyubiquitination and degradation by the E3 ubiquitin ligase Mid1 (15). Although α 4 C-terminal region interacts with E3 ubiquitin ligases, its association with PP2Ac is mediated by its N-terminal domain, whose structure reveals a tetratricopeptide repeat-like domain (16–18).

In human cells, so far only two PP2A catalytic subunits have been described, PP2A α and PP2A β , which are encoded by different genes (1, 2). Here, we report the identification of a novel splice variant of PP2A α in human cells. We show that the new variant is catalytically inactive and displays enhanced binding to the α 4 regulatory subunit but does not bind to the PR65/A subunit. In addition, using recombinant proteins we found that the PP2A regulators PME-1 and LCMT-1 bind both PP2Ac isoforms with similar affinity, but their interaction is prevented by prior binding of α 4 to the catalytic subunit. To our knowledge, this is the first case of alternative splicing described for PP2A α , which might constitute a novel regulatory mechanism for this enzyme and provide new insights into the mechanism of PP2Ac association with α 4.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents and Antibodies—Rapamycin (LC Laboratories) was used at a final concentration of 200 nM. Phytohemagglutinin (PHA) (Sigma) was used in a final concentration of 2 μ g/ml. The following antibodies were used in this study: rabbit antibodies for PP2Ac, TIPRL, phospho-RPS6, GAPDH and actin (Bethyl Laboratories), goat anti- α 4 (Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-PME-1 (Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-PR65/A (Invitrogen), mouse anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma), and anti-hexahistidine tag (Qiagen). Monoclonal anti-GST was obtained from a hybridoma (19).

DNA Cloning and Sequencing—The clone 3.4 cDNA from the novel PP2A α 2 isoform cloned into pACT2 and pGEX-5X-2, the α 4 cDNA cloned into pET28a, and the TIPRL cDNA cloned into pET-TEV (a pET28a derivative) were already available in our laboratory from previous studies (12, 20). The PP2A α cDNA (from the gene located on chromosome 5q31.1, GRCh37.p5, NC_000005.9) was amplified by RT-PCR from several immortalized human cell lines and from peripheral

blood mononuclear cells (PBMCs) and cloned using the pGEM-T-easy cloning system (Promega) according to the manufacturer's instructions. The PME-1 and LCMT-1 cDNAs were amplified from a fetal brain cDNA library (Clontech) using oligonucleotides 5'-GGA TCC ATG GCC ACT AGG CAG AGG GAA TC-3' (LCMT-1F), 5'-GCG GCC GCT TAA TAA GTT ATC TCC TTC AGC CCA AG-3' (LCMT-1R), 5'-GGG AAT TCA TGT CGG CCC TCG AAA AGA GC-3' (PME-1F), and 5'-GGG TCG ACT TAA CAG CCA GGA AAC ACA CAC TG-3' (PME-1R) and cloned into pGEM-T vector (Promega). The cDNAs were subcloned into pET-TEV using BamHI and NotI restriction enzymes for LCMT-1, and EcoRI and SalI for PME-1. The cDNAs from the novel and standard PP2Ac isoforms were also subcloned into the mammalian expression vector pcDNA-FLAG, in-frame with the FLAG tag (Invitrogen), generating plasmids pcDNA-FLAG-PP2A α and pcDNA-FLAG-PP2A α 2. Cloning procedures were carried out as described previously (21). cDNA sequences were verified by using an Applied Biosystems 3130 xl DNA analyzer.

Cell Culture and Handling—Buffy coat cells from healthy blood donors were obtained by centrifugation using triple top and bottom bag separation systems. The interface fraction (from here on called PBMCs) was harvested, washed three times in Hanks' salt solution, and transferred to culture flasks in RPMI 1640 medium (Invitrogen), with or without fetal calf serum (10%) and 2 mM L-glutamine. Cells were treated with rapamycin and/or PHA and kept in culture at 37 °C and 5% CO₂. Finally, cells were harvested for RNA and protein extraction. For the experiments shown in the Fig. 3 (A and B), a Qiagen RNA blood mini kit was used to isolate total RNA, where erythrocytes were removed by lysis. The PBMCs were kept at room temperature in microcentrifuge tubes up to the moment of RNA extraction. Human immortalized cells HEK293, RAJI, and Jurkat were maintained in 100-mm dishes and submitted to starvation (medium without serum) and/or rapamycin treatment. HEK293 cells were cultured in minimal essential α medium (Invitrogen), and RAJI and Jurkat cells were cultured in RPMI 1640 medium.

Whole cell extracts were prepared by suspending cells in high salt buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors from Calbiochem (250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, pH 8.0, 0.5% Nonidet P-40). After 30 min on ice, lysates were cleared by centrifugation (20,000 $\times$ g, 10 min, 4 °C).

To obtain stable clones expressing each PP2Ac isoform, $\sim 10^6$ HEK293 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium until they reached 60% confluency. The cells were transfected by electroporation with 20 μ g of the constructs pcDNA-FLAG $\emptyset$ (empty vector), pcDNA-FLAG-PP2A α , or pcDNA-FLAG-PP2A α 2 and submitted to selection with 1 mg/ml G-418 sulfate (Stratagene). Expression of FLAG-PP2A α and FLAG-PP2A α 2 was analyzed by Western blot using an antibody against the FLAG tag (mouse anti-FLAG M2, Sigma).

RNA Isolation and cDNA Amplification by RT-PCR—Total RNA was isolated from PBMCs and cell lines using the TRIzol reagent (Invitrogen) or the QIAamp RNA Blood Mini kit (Qia-

A PP2A α Splicing Isoform with Selective Interaction Profile

gen) according to the manufacturer's instructions. RNA quality and concentration were determined by spectrophotometry. Total cDNAs were synthesized using the QuantiTect Reverse Transcription system (Qiagen) according to the supplier's instructions or using the MMLV reverse transcriptase (Invitrogen). For MMLV-reverse transcription reactions, initially 500 ng from total RNA, 10 mM dNTPs and 10 μ M oligo(dT) were incubated at 65 °C for 5 min. Subsequently, the reverse transcriptase (MMLV-RT) and the first strand buffer 5 $\times$ (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) were added to the reaction, which was incubated at 37 °C for 50 min and at 70 °C for 15 min. Amplification of the PP2A α cDNAs by PCR was performed using the primers 5'-GAA TTC CAT ATG GAC GAG AAG GTG TTC AC-3' and 5'-GGA TCC TTA CAG GAA GTA GTC TGG GGT AC-3'. β -Actin partial cDNA amplification was performed as a control using the primers 5'-GAA ACT ACC TTC AAC TCC ATC-3' and 5'-CGA GGC CAG GAT GGA GCC GCC-3'. Amplicons were analyzed on 2% agarose gel electrophoresis.

Real-time PCR—To analyze the variation of the total amount of RNA in the experiment shown in Fig. 3A, the same samples were subjected to real-time qPCR amplification. The reaction mix contained 12.5 μ l of SYBR Green PCR Master Mix 2 $\times$ (Applied Biosystems), 1 μ l of each primer, 1 μ l of cDNA, and 10.5 μ l of sterile water. The primers were designed to detect either the standard (Forward1: 5'-GAT CTT CTG TCT ACA TGG TGG TCT C-3' and Reverse1: 5'-ACA CAT TGG ACC CTC ATG GGG AA-3') or the novel isoform (Forward1 and Reverse2: 5'-CCA GTT ATA TCC CTC ATG GGG AAC-3'). Primers for detection of HPRT1 (Forward: 5'-TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA GA-3' and Reverse: 5'-GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT-3') were used as endogenous control. qPCR assays were performed on an ABI® PRISM® 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). To ensure experimental accuracy, all reactions were performed in triplicate. Gene expression was quantified by the comparative C_T method, normalizing C_T values to the housekeeping gene GAPDH (forward primer: 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3'; reverse primer: 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3') and calculating relative expression values.

GST Pulldown Assays—GST-PP2A α , GST-PP2A α 2, or GST alone were coexpressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) with histidine-tagged TIPRL, PME-1, LCMT-1, or α 4. Protein expression was induced with isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside (0.5 mM), and the cells were incubated at 16 °C for 16 h or at 25 °C for 4 h. Cell lysis and interaction assays were performed as described previously (12).

PP2A Activity Assay—HEK293 cells stably transfected with pcDNA-FLAG, pcDNA-FLAG-PP2A α , or pcDNA-FLAG-PP2A α 2 were suspended in lysis buffer (150 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 3 mM EDTA, pH 8.0, 0.3% Nonidet P-40), incubated on ice for 15 min, and centrifuged at 20,000 $\times$ g for 10 min at 4 °C. The cleared lysates were separated in triplicates (300 μ l each), which were incubated with 1.5 μ g of anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma) and 15 μ l of Protein A/G plus beads for 16 h at 4 °C. The beads were harvested by centrifugation at 550 $\times$ g for 1 min at 4 °C and washed three times with lysis buffer. To perform the phosphatase assay, 40 μ l of PP2A

assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 20 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 14 mM *p*-nitrophenyl phosphate) was added to the beads, and the reactions were incubated at 30 °C for 30 min. PP2A activity was measured as the absorbance of the supernatants at 405 nm using an EnSpire plate reader (Perkin-Elmer). The beads were subsequently analyzed by Western blot.

Molecular Docking—The PDB files corresponding to α 4 N-terminal domain (PDB: 3QC1 (18)) and PP2A catalytic subunit (PDB: 3DW8, chain C (22)) were submitted to automated docking using the ClusPro 2.0 server (available on-line (23–26)). Each protein was analyzed both as receptor and ligand. The five highest scoring models were analyzed using PyMOL (available on-line (27)).

RESULTS

Identification of a Novel Splicing Isoform of PP2A α —In a previous study, we have reported the interaction of type 2A phosphatase catalytic subunits with TIPRL. The interactions were initially identified in a yeast two-hybrid screen using TIPRL as bait to screen a human leukocyte cDNA library (12). One of the clones isolated in that screen, then denominated clone 3.4, corresponded to a novel variant of PP2A α lacking an internal segment. Analysis of the PP2A α gene structure revealed that the missing part corresponds exactly to the 5th exon, suggesting that the novel variant could result from alternative splicing (Fig. 1 and supplemental Fig. S1). Investigation of PP2A α cDNAs from human cDNA libraries (leukocyte, fetal brain, and bone marrow) confirmed the presence of two distinct bands, one corresponding to the expected molecular weight of the standard PP2A α cDNA and another to the shorter isoform (Fig. 1A), which we will refer to as PP2A α 2 from here on.

In an attempt to verify the existence of this novel isoform in cultured cell lines, we amplified the PP2A α cDNA by RT-PCR from several immortalized human cell lines, mostly from hematopoietic origin. For all the cell lines tested (P19, L450, U937, K562, RAJI, Jurkat, and HEK293), there apparently was amplification of only one PCR product that corresponded to the molecular weight of the standard PP2A α cDNA (Fig. 1B). However, this observation needed confirmation. Therefore, to determine whether permanent cells lines express the PP2A α 2 mRNA, we relied on the existence of a unique XhoI restriction site within exon 5 of PP2A α (Fig. 1C), which allows for selective digestion of the PP2A α cDNA. The RT-PCR products from two representative cell lines, one adherent (HEK293) and one non-adherent (L540), were digested with XhoI to selectively digest the PP2A α cDNA, so that it would not be amplified in subsequent PCR reactions (Fig. 1D). The faint bands corresponding to the shorter isoform were purified from gels and used as templates in a second round of PCR amplification, which resulted in two distinct bands (Fig. 1E). The shorter PCR product was purified from the gel and cloned into the pGEM-T vector for sequencing analysis, which confirmed that it was indeed the cDNA of the PP2A α 2 isoform.

The results described above suggested that PP2A α 2 mRNA exists in several immortalized human cell lines, however at very low expression levels. We, therefore, asked

A PP2A α Splicing Isoform with Selective Interaction Profile

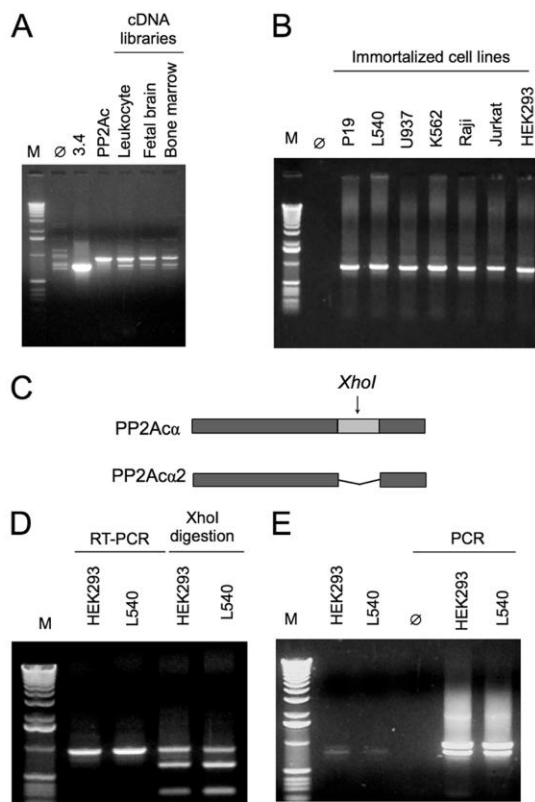


FIGURE 1. Identification and cloning of a novel splicing isoform of the PP2A catalytic subunit α . A, PCR amplification of PP2Ac cDNAs from three human cDNA libraries (leukocyte, fetal brain, and bone marrow) results in two distinct bands, corresponding to the canonical and to a novel shorter isoform (PP2A α 2). Clone 3.4 and PP2Ac indicate the control reactions containing the short and the canonical cDNA forms, respectively. B, RT-PCR amplification of PP2Ac cDNAs from immortalized cell lines results in a single band corresponding to the canonical isoform. C, diagram of the PP2Ac cDNAs showing the unique XhoI restriction site located at exon 5, which is missing in PP2A α 2. D and E, analysis of PP2Ac cDNA amplification by RT-PCR from two immortalized cell lines (HEK293 and L540). Following one round of PCR amplification, the PCR product was digested with XhoI to deplete the samples from the predominant PP2Ac amplification product. The cDNA containing exon 5 is digested with XhoI, producing two fragments (638 and 292 bp), whereas the shorter cDNA is not digested. E, the undigested PCR product was extracted from the gel and purified (left) and used as template in a second round of PCR amplification using PP2Ac-specific primers. This amplification resulted in two bands of similar intensity. The shorter band was cloned into pGEM-T easy vector and sequenced, which confirmed its identity as the shorter PP2A α 2 isoform.

whether its expression might be induced under specific conditions. As a first attempt to identify such conditions, we tested serum starvation or addition of rapamycin to block cell growth. In RAJI and Jurkat cells, these treatments resulted in a detectable although rather modest increase in PP2A α 2 mRNA levels (Fig. 2A). This effect could also be observed at the protein level as the Western blot analysis revealed that the PP2A α 2 isoform is indeed expressed also as a protein in both cell lines (Fig. 2B).

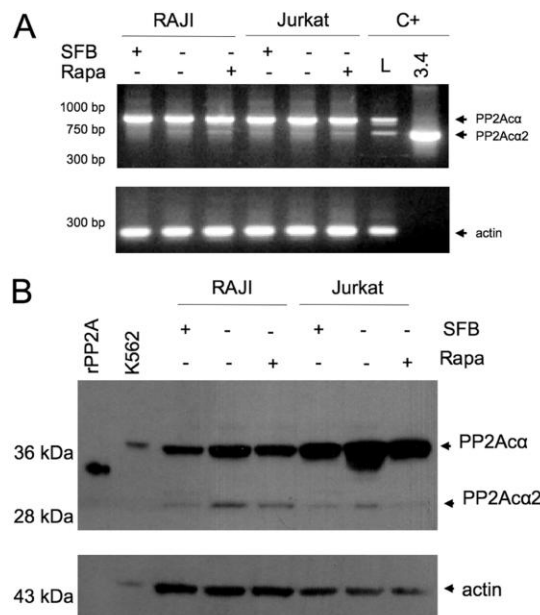


FIGURE 2. Analysis of the PP2A α 2 protein expression in RAJI and Jurkat cells. A, analysis of RT-PCR products of PP2A α obtained from the cDNAs of RAJI and Jurkat cells. The two bands detected correspond to the longer and shorter PP2Ac isoforms (930 and 768 bp, respectively). L = positive control of cDNA amplification from a leukocyte cDNA library; 3.4 = positive control of amplification of PP2A α 2 cDNA. Parallel amplification of a 300-bp actin cDNA was used as an internal control. B, Western blot analysis of the protein isoforms of PP2A α isolated from lysates of RAJI and Jurkat cells. +, indicates cells treated with either rapamycin (Rapa) or fetal bovine serum (FCS, 10%) for 48 h, respectively. Actin was used as a loading control in the Western blots.

PP2A α 2 Is Expressed in Resting Human Peripheral Blood Mononuclear Cells but Inhibited in Cultured Cells—Because the PP2A α 2 mRNA was expressed at relatively high levels in cDNA libraries obtained from human tissues, including leukocytes, but was barely detectable in immortalized cell lines, we decided to analyze its expression levels in primary PBMCs. In freshly isolated PBMCs from healthy donors, only the standard PP2A α mRNA could be detected by RT-PCR (Fig. 3A). Interestingly, when the cells are left to rest at room temperature, the alternatively spliced PP2A α 2 mRNA is detected, being as abundant as that of the PP2A α mRNA after 12–24 h at room temperature (Fig. 3A). A real-time PCR quantification of the samples analyzed in Fig. 3A showed that the abundance of PP2A mRNA decreased by 30% after 24 h, whereas the shorter isoform mRNA showed a 5-fold increase (Fig. 3B). The PBMCs are still viable after this period of incubation at room temperature as they recover following transfer to culture conditions. The PP2A α 2 mRNA decreases soon after the PBMCs are transferred to culture medium. A time course experiment of PBMCs that have been left to rest for 24 h showed that expression of PP2A α 2 mRNA was strongly inhibited in the first 2 h of culture, decreasing to a barely detectable level after 16 h (Fig. 3C). The PP2A α 2 protein was detected by Western blot, although the ratio between PP2A α /PP2A α 2

A PP2A α Splicing Isoform with Selective Interaction Profile

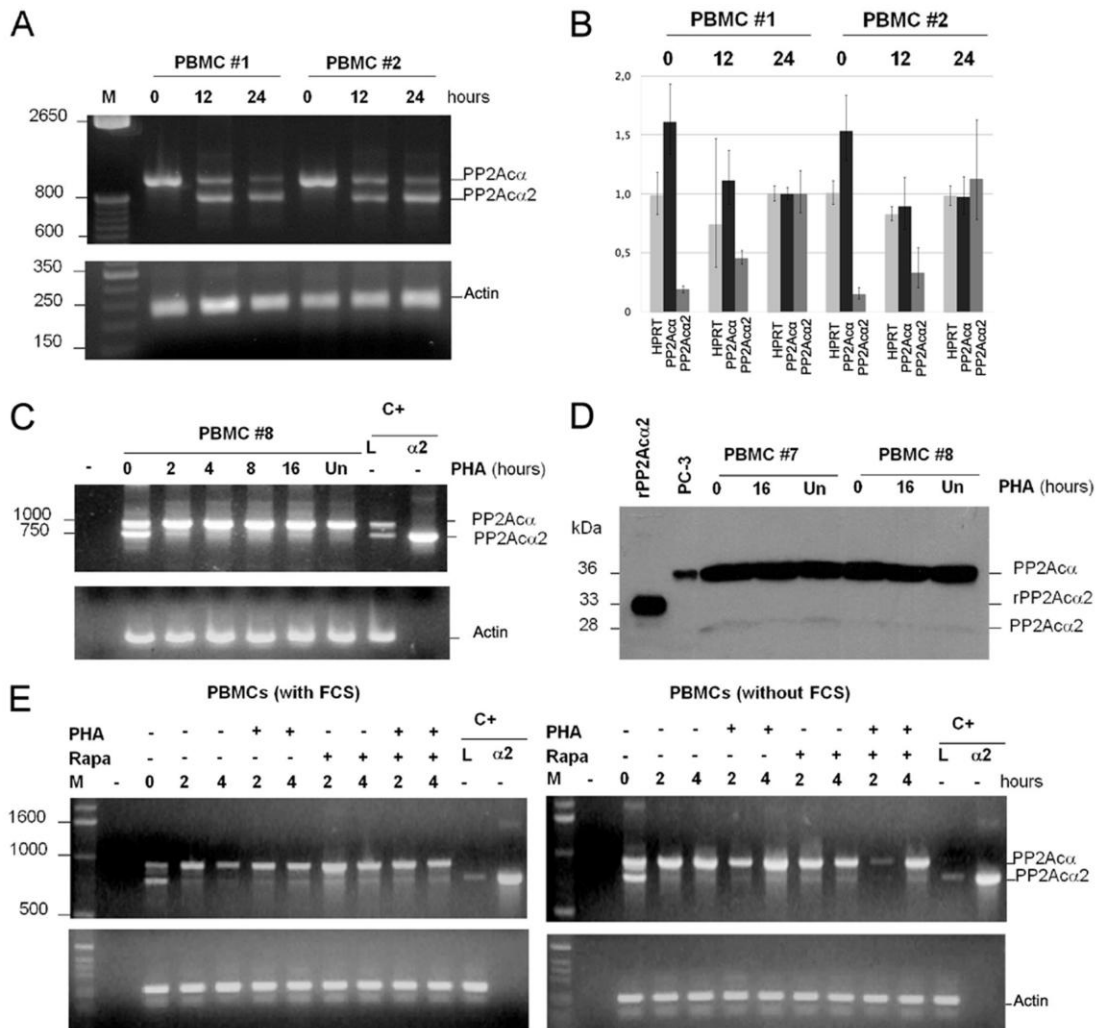


FIGURE 3. Analysis of PP2A α 2 expression in PBMCs. A, analysis of the RT-PCR products of PP2A α in PBMCs isolated from donors #1 and #2. RT-PCR was performed with RNA samples isolated at the moment of blood extraction (time 0) and 12 and 24 h after extraction. β -Actin was used as a control. B, real-time qPCR quantification of the samples from A. The numbers on the left indicate the fold change relative to the sample taken from donor 1 (PBMC #1) at 24 h, which was used to normalize the other samples. Light gray: HPRT (control), medium gray: PP2A α 2, dark gray: full-length PP2A α . C, time course analysis of the RT-PCR products of PP2A α in PBMC isolated from donor #8. After resting for 24 h, cells were transferred to culture followed by activation with PHA for the indicated times. Parallel amplification of a 300-bp actin cDNA was used as an internal control. D, Western blot analysis of the PP2A α protein isoforms of PBMCs from donors #7 and #8. After resting for 24 h, cells were transferred to culture followed by treatment or not with phytohemagglutinin (PHA) for the indicated times. Recombinant PP2A α 2 was used as a reference in the Western blot. E, analysis of RT-PCR products of PP2A α obtained from cDNAs of PBMCs. After resting for 24 h, cells were transferred to culture for the indicated times. +, indicates the cells treated with phytohemagglutinin (PHA) or rapamycin (Rapa). The two amplified bands correspond to the longer and shorter isoforms of PP2A α (930 and 768 bp, respectively). L = positive control of cDNA amplification from leukocyte cDNA library; α 2 = positive control of amplification of PP2A α 2 cDNA.

proteins in PBMCs was not equivalent to the PP2A α /PP2A α 2 mRNA ratio (Fig. 3D). Changes in culture conditions by addition of PHA, rapamycin, or serum starvation did not affect the levels of the PP2A α 2 isoform after the cells are transferred to culture medium (Fig. 3E). This shows that generation of the PP2A α 2 isoform takes place only under very stringent conditions that might involve reduced nutri-

ent levels, which is the case when the PBMCs are stored for relatively long periods.

PP2A α 2 Is Catalytically Inactive, Shows Enhanced Binding of α 4, and Does Not Interact with the Scaffolding Subunit PR65/A—After confirming the existence of a novel splicing variant of PP2A α that is expressed as a protein, although at low levels compared with the standard isoform, the next step in our

A PP2A α Splicing Isoform with Selective Interaction Profile

investigation consisted of analyzing the possible functional differences between these two PP2A α isoforms. For this purpose, we generated stably transfected HEK293 cell lines expressing FLAG-tagged PP2A α (clones A4 and C5) or PP2A α 2 (clone 3.4), as well as a control cell line transfected with the empty vector, and analyzed protein expression, enzyme activity, and interaction profiles.

Cells expressing FLAG-PP2A α and FLAG-PP2A α 2 showed proliferation rates similar to the control cells transfected with the empty vector (not shown), indicating that they are not toxic to the cell at these expression levels. The cells transfected with pcDNA-FLAG-PP2A α showed a corresponding band detectable by Western blotting using an anti-PP2A α antibody (Fig. 4A), whereas in cells transfected with pcDNA-FLAG-PP2A α 2, the short isoform could be detected only by immunoprecipitation with anti-FLAG antibody (Fig. 4C). In addition, the cells transfected with pcDNA-FLAG-PP2A α expressing the standard isoform showed a reduction in the levels of the endogenous PP2A α , whereas no changes were observed in cells transfected with the empty vector and FLAG-PP2A α 2 (Fig. 4A). Transfection with FLAG-PP2A α 2 resulted also in a significant increase in the protein levels of the PP2A regulator α 4, as well as in a decrease in the levels of the PP2A scaffolding subunit PR65/A, as seen by Western blot analysis (Fig. 4A).

An *in vitro* activity assay with *p*-nitrophenyl phosphate as substrate and the immunopurified FLAG-tagged PP2A α isoforms showed that PP2A α 2 does not display any detectable enzymatic activity (Fig. 4B). If this was due only to a defect in the active site, it would be expected that incorporation of the defective enzyme into heterotrimeric PP2A complexes might lead to a dominant negative phenotype. However, no enhanced phosphorylation of RPS6, a known PP2A target, was detected in cellular extracts expressing PP2A α 2, indicating that the existence of a catalytically inactive variant of PP2A α does not suppress the activity of the endogenous enzyme (Fig. 4). This explains also why the levels of the endogenous PP2A α levels are not affected in the cells transfected with pcDNA-FLAG-PP2A α 2.

The FLAG immunoprecipitates used in the phosphatase activity assay were analyzed by Western blot to detect interactions of the two PP2A α isoforms with endogenous proteins. PP2A α 2 precipitated a significantly higher amount of endogenous α 4 than PP2A α , whereas the interaction with TIPRL remained unchanged. However, a striking finding was that the interaction of PP2A α 2 with the PR65/A subunit was completely abolished (Fig. 4C). This finding indicates that PP2A α 2 is not incorporated into the mature PP2A heterotrimeric complexes.

Binding of α 4 to PP2A α 2 Prevents Its Interaction with PME-1 and LCMT-1—An examination of the position of exon 5 in the three-dimensional structure of PP2A α heterotrimeric complex with PR65/A (28, 29) shows that it is close to the active site (supplemental Fig. S2). This might explain the loss of catalytic activity by PP2A α 2, but the analysis of the structure also indicates that the residues encoded by exon 5 are distant from the site of interaction with PR65/A, suggesting that PP2A α 2 interaction with this subunit should not be directly affected by absence of the exon 5 amino acid residues. Another possibility

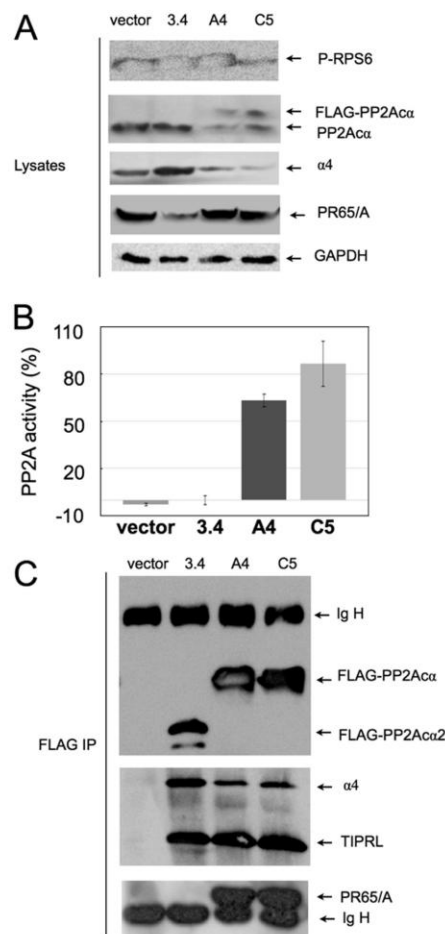


FIGURE 4. Characterization of PP2A α 2 stably expressed in HEK293 cells. A, Western blot analysis of the whole cell lysates obtained from HEK293 cells transfected with empty pcDNA-FLAG vector (*vector*), FLAG-PP2A α 2 (3.4), or FLAG-PP2A α (A4 and C5) using antibodies to detect the catalytic subunit of PP2A. Phosphorylation of the ribosomal protein RPS6 is slightly reduced in clone C5 and unchanged in clones 3.4 and A4. Expression of FLAG-PP2A α 2 (clone 3.4) results in increased expression of α 4 and reduced expression of PR65/A. B, phosphatase assays using FLAG immunoprecipitates from the four cell lineages described above. PP2A α 2 is catalytically inactive. C, Western blot analysis of the FLAG immunoprecipitates assayed in B to detect the presence of the FLAG-tagged proteins (using anti-FLAG antibody) and their interaction with endogenous proteins using antibodies specific to α 4, PR65/A, and TIPRL. PP2A α 2 precipitates higher amounts of α 4 and does not precipitates PR65/A.

to be considered is that the preferential binding of PP2A α 2 to α 4 is responsible for its reduced interaction with PR65/A, however, this implies that exon 5 amino acids participate in the interaction interface with α 4. The interaction site for α 4 on PP2A α is still elusive due to the lack of structural data and conflicting information obtained from biochemical experiments. Mutation analysis suggested that α 4 and PR65/A compete for PP2A α binding, indicating that these two subunits share a site of interaction on the side opposite the catalytic site of the phos-

phatase (30). However, the observation that okadaic acid treatment induces the dissociation of PP2Ac and $\alpha 4$ suggested that $\alpha 4$ might occlude the active site of PP2Ac (31).

The PP2A regulators PME-1 and LCMT-1 catalyze, respectively, methylation and demethylation of the C-terminal Leu³⁰⁹ residue of PP2Ac, which is located near the catalytic site in the three-dimensional structure of the enzyme (9, 10). An examination of the crystal structures of PP2Ac in complex with these two proteins showed that the amino acids encoded by exon 5 participate extensively in these contacts (supplemental Fig. S2). We, therefore, sought to determine how this might affect the interactions of PME-1 and LCMT-1 with the novel PP2A $\alpha 2$ isoform. We co-expressed recombinant GST-tagged PP2A α and PP2A $\alpha 2$ with histidine-tagged PME-1 or LCMT-1 in *E. coli* and performed *in vitro* pulldown assays. Histidine-tagged TIPRL was used as a parallel control. This assay showed that PME-1, TIPRL, and LCMT-1 all bind to both PP2A α isoforms, with TIPRL and LCMT-1 showing a slight preference for PP2A $\alpha 2$ (Fig. 5, A–C). We used PME-1 or LCMT-1 to obtain an indirect indication of the site of interaction of $\alpha 4$ on PP2A, by performing *in vitro* binding assays to the preassembled PP2A α - $\alpha 4$ complex. GST-tagged PP2A α or PP2A $\alpha 2$ were co-expressed in *E. coli* with histidine-tagged $\alpha 4$, and the lysates of these co-expressions were mixed with lysates from cells expressing histidine-tagged TIPRL, PME-1, or LCMT-1. The GST-tagged proteins were isolated using glutathione-Sepharose beads, and the interacting proteins were analyzed by Western blot (Fig. 5, D–F). Our previous results showed that TIPRL binds to PP2Ac in the presence of $\alpha 4$ and that residues 210–309 of PP2Ac are sufficient to interact with TIPRL (12). Consistently, TIPRL was detected in association with the PP2A α - $\alpha 4$ complex in the present assay. However, neither PME-1 nor LCMT-1 was detected in GST-PP2A α - $\alpha 4$ pulldown assays, suggesting that $\alpha 4$ physically blocks the binding sites for PME-1 and LCMT-1 on both PP2A α isoforms. The same result was observed in a similar experiment using purified proteins instead of cell lysates (not shown). This finding is in agreement with the fact that the residues encoded by exon 5 of PP2Ac affect its affinity for binding to $\alpha 4$. An analysis of the FLAG immunoprecipitations shown in Fig. 4C with an antibody directed to PME-1 showed that it binds only to PP2A α , and not to PP2A $\alpha 2$ (Fig. 5G), which is in line with our result described above (Fig. 4C) of the lack of interaction of PP2A $\alpha 2$ with PR65/A.

Structural Model of the $\alpha 4$ -PP2Ac Complex—The striking differences observed in the activity and interactions of the two PP2A α isoforms led us to investigate what are the possible structural explanations for these differences. After several unsuccessful attempts to crystallize the $\alpha 4$ -PP2A $\alpha 2$ complex, we performed an automated docking of PP2Ac to the recently published crystal structure of the N-terminal domain of $\alpha 4$ ($\alpha 4\Delta C$) using the Cluspro server. Both proteins were analyzed as receptor and ligand. The five highest scored models from each docking were analyzed using PyMOL, and, although slightly different from each other, these models displayed a consistent pattern of binding of $\alpha 4$ close to the active site of PP2Ac (supplemental Figs. S3 and S4). The highest scoring model obtained using $\alpha 4$ as receptor and PP2Ac as ligand,

depicted in Fig. 6, suggests that helices 5 and 6 of $\alpha 4$ bind to PP2Ac in a structure that resembles a clamp. Mutation of aspartate 42 of PP2Ac and arginine 156 and lysine 159 of $\alpha 4$ are sufficient to disrupt their interaction (18, 30). Interestingly, these residues appear in close proximity in our model, suggesting that they might form salt bridges that stabilize the complex. In this model, the loop formed by amino acids encoded by exon 5 of PP2Ac is part of the interaction interface with $\alpha 4$, which is consistent with the results shown in the previous section. The fact that PP2A $\alpha 2$, which lacks exon 5, binds to $\alpha 4$ with higher affinity than PP2A α suggests that this is a destabilizing interface, possibly required for the regulated dissociation of the many complexes that PP2A α forms *in vivo*.

DISCUSSION

The catalytic subunit of PP2A can associate with a variety of proteins and dephosphorylate innumerable substrates, acting like a hub in cellular signaling networks and controlling innumerable cellular processes (1–4). Such important tasks need many forms of fine regulation. Here, we describe a novel isoform of PP2A α generated by exon 5 skipping. The finding that the shorter PP2A $\alpha 2$ isoform is found in PBMCs that are maintained in conditions similar to those used for storage of transfusion blood is intriguing and reveals a mechanism of alternative splicing that mediates a novel mode of PP2A α regulation. This mechanism seems to be associated to nutrient restrictions, or it might also be possible that it is a mechanism found in resting cells, which would explain why the levels of the shorter PP2A $\alpha 2$ isoform decrease soon after transfer to culture medium. Despite many attempts to detect endogenous PP2A $\alpha 2$ in cultured cell lines, it could only be found in trace amounts relative to the standard isoform and under specific conditions, such as starvation of RAJI and Jurkat. Whether this isoform might represent a conspicuous protein in any cell type or condition still remains an open question.

To characterize the catalytic activity and interaction profile of this new PP2A α isoform, we generated stable HEK293 cell lines expressing FLAG-tagged PP2A α or PP2A $\alpha 2$ and also expressed recombinant GST-tagged proteins in *E. coli*. Interestingly, no significant differences in binding affinity for the PP2A regulators TIPRL, $\alpha 4$, PME-1, and LCMT-1 were noticed when comparing the two GST-tagged PP2A α isoforms expressed in bacteria. However, when we analyzed the same proteins expressed in mammalian cells, we found that PP2A $\alpha 2$ precipitated at least twice as much $\alpha 4$ as compared with the standard 309-residue isoform, whereas the interaction with the PR65/A subunit virtually disappeared while the interaction with TIPRL remained unchanged. Changes in the expression levels of $\alpha 4$ and PR65/A caused by expression of PP2A $\alpha 2$ were consistent with these interaction profiles, with a marked reduction in PR65/A, and an increase in $\alpha 4$ levels. It is possible that PR65/A is destabilized by the unbalance caused by expression of the PP2A $\alpha 2$ isoform and is targeted for degradation, whereas $\alpha 4$ is stabilized by its enhanced interaction with the PP2A $\alpha 2$ isoform.

The most striking differences between the PP2A α isoforms is the fact PP2A $\alpha 2$, lacking amino acids encoded by exon 5, is catalytically inactive toward *p*-nitrophenyl phosphate and does

A PP2A α Splicing Isoform with Selective Interaction Profile

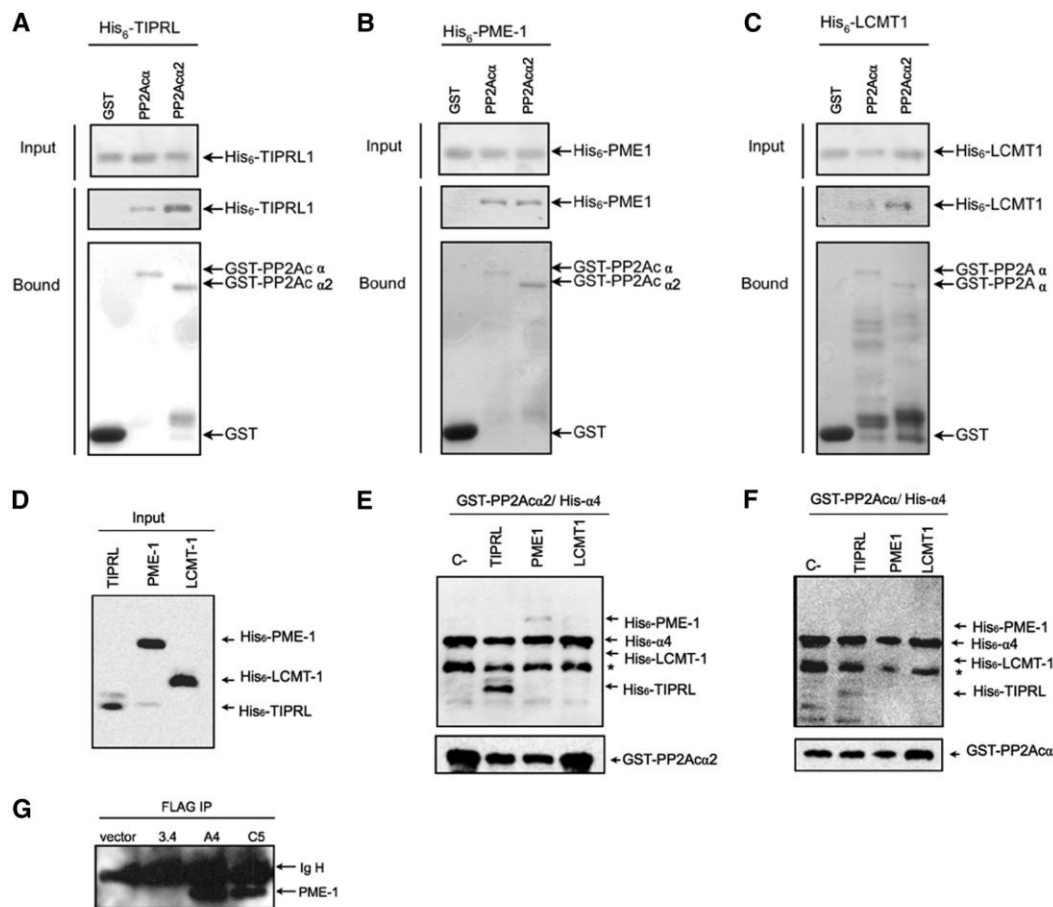


FIGURE 5. GST pulldown assays using recombinant proteins. A–C, interaction assays of TIPRL, PME-1, and LCMT-1. Fusions of the indicated phosphatase catalytic subunits were co-expressed in *E. coli* with histidine-tagged TIPRL, PME-1, or LCMT1. GST was used as a negative control. GST fusion proteins were isolated from extracts by binding to glutathione-Sepharose beads. Bound proteins were resolved by SDS-PAGE and detected by immunoblotting with anti-His or anti-GST primary antibodies. Both PP2A α isoforms interacted specifically with the regulatory proteins tested. D, Western blot analysis using anti-hexahistidine antibody of *E. coli* extracts expressing histidine-tagged TIPRL, PME-1, and LCMT1. E and F, interaction assays of the PP2A α 4 complexes and TIPRL, PME-1, or LCMT1. GST fusions of the indicated phosphatase catalytic subunits were co-expressed in *E. coli* with histidine-tagged α 4, and the extracts were mixed with the extracts shown in D and incubated for 2 h at 4 °C. Bound proteins were resolved by SDS-PAGE and detected by immunoblotting with anti-hexahistidine antibody (upper panels) or anti GST (lower panels). Only TIPRL interacted with PP2A α in the presence of α 4. The asterisk indicates a proteolysis product of α 4. G, Western blot analysis of the FLAG immunoprecipitates shown in Fig. 4C to detect the presence of endogenous PME-1 using anti PME-1 antibody.

not interact with the PR65/A subunit. However, the interaction analysis of the phosphatase regulator α 4 also produced important findings for the understanding of the functional differences between the two PP2A α isoforms. It has long been discussed whether α 4 is a phosphatase inhibitor or an allosteric regulator; however, recent findings suggested that the primary function of α 4 is to stabilize an immature form of the PP2A catalytic subunit and to promote its assembly into the canonical heterotrimeric complexes (14). According to this model, the α 4-PP2A complex is catalytically inactive, and the function of α 4 would be to stabilize and to direct the catalytic subunit to the correct complexes, where it would become active. Our findings agree with this model, because the higher affinity of the PP2A α 2

isoform for α 4 favors the stabilization of a trapped intermediate complex in the maturing process of PP2A, which is unable to reach the final active state in the heterotrimeric complex.

In vitro binding assays using recombinant proteins showed that α 4 prevents PME-1 and LCMT-1 from interacting with both PP2A α 2 and PP2A α , suggesting that these proteins share a common interaction site on the catalytic subunit, which includes residues encoded by exon 5 and is close to the phosphatase active site (9, 10). Molecular modeling of the α 4-PP2A complex supports this proposal while accommodating also previous information from point mutations (18, 30). Taken together, our data indicate that α 4 blocks the PP2A active site, however, okadaic acid does not induce the dissociation of α 4

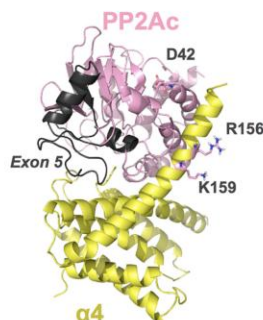


FIGURE 6. Schematic representation of the highest scoring model obtained using $\alpha 4$ (PDB: 3QC1) as receptor and PP2Ac (PDB: 3DW8, chain C) as ligand. $\alpha 4$ is colored in yellow, and PP2Ac is colored in pink. Exon 5 of PP2Ac is colored in gray. Residues Asp⁴² of PP2Ac and Arg¹⁵⁶ and Lys¹⁵⁹ of $\alpha 4$ are represented as sticks. The model was obtained from automated docking using ClusPro 2.0 (available on-line) and rendered using PyMOL (available on-line).

from either one of the isoforms (Ref. 12 and data not shown). Incubation with a molar excess of PME-1 or LCMT-1, or even the drug metformin, which was recently reported to induce dissociation of this complex in HeLa cell extracts (32), were unable to dissociate $\alpha 4$ from PP2Ac *in vitro* (data not shown). Our results also suggested that PP2Ac $\alpha 2$, but not PP2Ac α , is unable to dissociate from $\alpha 4$, but due to the high stability of this complex it was not possible to study the dissociation process *in vitro*.

One important question to be answered is whether PP2Ac $\alpha 2$ is catalytically inactive due to a defect in the active site or simply because it is prevented from being incorporated into the active holoenzyme, because it does not interact with the PR65/A subunit. It was not possible to test the activity of the recombinant protein expressed in *E. coli*, because even the standard isoform is inactive when expressed in bacteria (data not shown). Most probably, we observed a combination of these two factors, which raises an interesting question: could these effects be separated by generating a PP2Ac mutant, which is enzymatically inactive but still is incorporated into heterotrimeric complexes? In a recent work, a PP2Ac active site mutant (H118N) was found to completely lose its interaction with the PR65/A subunit, whereas the interaction with $\alpha 4$ remained unchanged (33). This suggests that the regulation of PP2Ac by $\alpha 4$ might be so robust that any modification that results in a defective enzyme is readily detected and sequestered in an inactive form.

In summary, the results presented in this work strongly suggest a new regulatory mechanism for PP2A which is, to our knowledge, the first case of alternative splicing described for PP2Ac α . This work also sheds new light on the mechanism of regulation of the canonical PP2Ac α isoform by $\alpha 4$.

Acknowledgments—We thank Maria Eugenia R. Camargo and Elaine Cristina Teixeira for technical assistance and Adriana Duarte from the Hemocentro, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, for providing “buffy coat” samples.

REFERENCES

- Janssens, V., and Goris, J. (2001) Protein phosphatase 2A. A highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signaling. *Biochem. J.* **353**, 417–439
- Zolnierowicz, S. (2000) Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 1225–1235
- Goldberg, Y. (1999) Protein phosphatase 2A. Who shall regulate the regulator? *Biochem. Pharmacol.* **57**, 321–328
- Virshup, D. M., and Shenolikar, S. (2009) From promiscuity to precision. Protein phosphatases get a makeover. *Mol. Cell* **33**, 537–545
- Eichhorn, P. J., Creghton, M. P., and Bernards, R. (2009) Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1795**, 1–15
- Junttila, M. R., Puustinen, P., Niemelä, M., Ahola, R., Arnold, H., Böttzauw, T., Ala-aho, R., Nielsen, C., Ivaska, J., Taya, Y., Lu, S. L., Lin, S., Chan, E. K., Wang, X. J., Grénman, R., Kast, J., Kallunki, T., Sears, R., Kähäri, V. M., and Westermarck, J. (2007) CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. *Cell* **130**, 51–62
- Mumby, M. (2007) PP2A. Unveiling a reluctant tumor suppressor. *Cell* **130**, 21–24
- Van Hoof, C., and Goris, J. (2004) PP2A fulfills its promises as tumor suppressor. Which subunits are important? *Cancer Cell* **5**, 105–106
- Xing, Y., Li, Z., Chen, Y., Stock, J. B., Jeffrey, P. D., and Shi, Y. (2008) Structural mechanism of demethylation and inactivation of protein phosphatase 2A. *Cell* **133**, 154–163
- Stanevich, V., Jiang, L., Satyshur, K. A., Li, Y., Jeffrey, P. D., Li, Z., Menden, P., Semmelhack, M. F., and Xing, Y. (2011) The structural basis for tight control of PP2A methylation and function by LCMT-1. *Mol. Cell* **41**, 331–342
- Chen, J., Peterson, R. T., and Schreiber, S. L. (1998) $\alpha 4$ associates with protein phosphatases 2A, 4, and 6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 827–832
- Smetana, J. H., and Zanchin, N. I. (2007) Interaction analysis of the heterotrimer formed by the phosphatase 2A catalytic subunit, $\alpha 4$ and the mammalian ortholog of yeast Tip41 (TIPRL). *FEBS J.* **274**, 5891–5904
- Kong, M., Fox, C. J., Mu, J., Solt, L., Xu, A., Cinalli, R. M., Birnbaum, M. J., Lindsten, T., and Thompson, C. B. (2004) The PP2A-associated protein $\alpha 4$ is an essential inhibitor of apoptosis. *Science* **306**, 695–698
- Kong, M., Ditsworth, D., Lindsten, T., and Thompson, C. B. (2009) $\alpha 4$ is an essential regulator of PP2A phosphatase activity. *Mol. Cell* **36**, 51–60
- McConnell, J. L., Watkins, G. R., Soss, S. E., Franz, H. S., McCorvey, L. R., Spiller, B. W., Chazin, W. J., and Wadzinski, B. E. (2010) $\alpha 4$ is a ubiquitin-binding protein that regulates protein serine/threonine phosphatase 2A ubiquitination. *Biochemistry* **49**, 1713–1718
- McConnell, J. L., Gomez, R. J., McCorvey, L. R., Law, B. K., and Wadzinski, B. E. (2007) Identification of a PP2A-interacting protein that functions as a negative regulator of phosphatase activity in the ATM/ATR signaling pathway. *Oncogene* **26**, 6021–6030
- McDonald, W. J., Sangster, S. M., Moffat, L. D., Henderson, M. J., and Too, C. K. (2010) $\alpha 4$ phosphoprotein interacts with EDD E3 ubiquitin ligase and poly(A)-binding protein. *J. Cell Biochem.* **110**, 1123–1129
- LeNoue-Newton, M., Watkins, G. R., Zou, P., Germane, K. L., McCorvey, L. R., Wadzinski, B. E., and Spiller, B. W. (2011) The E3 ubiquitin ligase and protein phosphatase 2A (PP2A)-binding domains of the $\alpha 4$ protein are both required for $\alpha 4$ to inhibit PP2A degradation. *J. Biol. Chem.* **286**, 17665–17671
- Assmann, E. M., Alborghetti, M. R., Camargo, M. E., and Kobarg, J. (2006) FEZ1 dimerization and interaction with transcription regulatory proteins involves its coiled-coil region. *J. Biol. Chem.* **281**, 9869–9881
- Smetana, J. H., Oliveira, C. L., Jablonka, W., Aguiar Pertinhez, T., Carneiro, F. R., Montero-Lomeli, M., Torriani, I., and Zanchin, N. I. (2006) Low resolution structure of the human $\alpha 4$ protein (IgBP1) and studies on the stability of $\alpha 4$ and of its yeast ortholog Tap42. *Biochim. Biophys. Acta* **1764**, 724–734
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1998) *Current Protocols in Molecular Biology*, John

A PP2A α Splicing Isoform with Selective Interaction Profile

- Wiley and Sons, New York
22. Xu, Y., Chen, Y., Zhang, P., Jeffrey, P. D., and Shi, Y. (2008) Structure of a protein phosphatase 2A holoenzyme. Insights into B55-mediated Tau dephosphorylation. *Mol. Cell* **31**, 873–885
 23. Kozakov, D., Hall, D. R., Beglov, D., Brenke, R., Comeau, S. R., Shen, Y., Li, K., Zheng, J., Vakili, P., Paschalidis, I. Ch., and Vajda, S. (2010) Achieving reliability and high accuracy in automated protein docking. ClusPro, PIPER, SDU, and stability analysis in CAPRI rounds 13–19. *Proteins* **78**, 3124–3130
 24. Kozakov, D., Brenke, R., Comeau, S. R., and Vajda, S. (2006) PIPER. An FFT-based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins* **65**, 392–406
 25. Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., and Camacho, C. J. (2004) ClusPro. An automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics* **20**, 45–50
 26. Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., and Camacho, C. J. (2004) ClusPro. A fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Res.* **32**, W96–9
 27. DeLano, W. L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific, San Carlos, CA
 28. Xu, Y., Xing, Y., Chen, Y., Chao, Y., Lin, Z., Fan, E., Yu, J. W., Strack, S., Jeffrey, P. D., and Shi, Y. (2006) Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme. *Cell* **127**, 1239–1251
 29. Cho, U. S., and Xu, W. (2007) Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. *Nature* **445**, 53–57
 30. Prickett, T. D., and Brautigan, D. L. (2004) Overlapping binding sites in protein phosphatase 2A for association with regulatory A and α -4 (mTap42) subunits. *J. Biol. Chem.* **279**, 38912–38920
 31. Kloecker, S., Reed, R., McConnell, J. L., Chang, D., Tran, K., Westphal, R. S., Law, B. K., Colbran, R. J., Kamoun, M., Campbell, K. S., and Wadzinski, B. E. (2003) Parallel purification of three catalytic subunits of the protein serine/threonine phosphatase 2A family (PP2A(C), PP4(C), and PP6(C)) and analysis of the interaction of PP2A(C) with α 4 protein. *Protein Expr. Purif.* **31**, 19–33
 32. Kickstein, E., Krauss, S., Thornhill, P., Rutschow, D., Zeller, R., Sharkey, J., Williamson, R., Fuchs, M., Köhler, A., Glossmann, H., Schneider, R., Sutherland, C., and Schweiger, S. (2010) Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 21830–21835
 33. Lizotte, D. L., Blakeslee, J. J., Sityaporn, A., Heath, J. T., and DeLong, A. (2008) A PP2A active site mutant impedes growth and causes misregulation of native catalytic subunit expression. *J. Cell Biochem.* **103**, 1309–1325

7.2. Figuras suplementares do artigo.

Figure S1

```

atggacgagaaggtgttcaccaaggagctggaccagtggatcgagcagctgaacgagtgc
M D E K V F T K E L D Q W I E Q L N E C
aagcagctgtccgagtcccaggtcaagagcctctgcgagaaggctaagaaatcctgaca
K Q L S E S Q V K S L C E K A K E I L T
aaagaatccaacgtgcaagaggttcgatgtccagttactgtctgtggagatgtgcatggg
K E S N V Q E V R C P V T V C G D V H G
caatttcgatgatctcatggaactgtttagaattgggtggcaaatacaccagatacaaattac
Q F H D L M E L F R I G G K S P D T N Y
ttgtttatgggagattatgttgacagaggatattattcagttgaaacagttacactgctt
L F M G D Y V D R G Y Y S V E T V T L L
gtagctcttaaggttcgttacgtgaacgcatacaccattcttcgaggggaatcatgagagc
V A L K V R Y R E R I T I L R G N H E S
agacagatcacacaagtttatggtttctatgatgaatgtttaagaaaatatggaaatgca
R Q I T Q V Y G F Y D E C L R K Y G N A
aatgttttgaaatatcttacagatctttttgactatcttcctctcactgccttggtggat
N V W K Y F T D L F D Y L P L T A L V D
gggcagatcttctgtctacatgggtggtctctcgccatctatagatacactggatcatatc
G Q I F C L H G G L S P S I D T L D H I
agagcacttgatcgcttacaagaagttccccatgaggggtccaatgtgtgacttgctgtgg
R A L D R L Q E V P H E G P M C D L L W
tcagatccagatgaccgtgggtggttgggggtatatctcctcgaggagctgggttacaccttt
S D P D D R G G W G I S P R G A G Y T F
gggcaagatatttctgagacatttaatacatgccaatggcctcacgttggtgtctagagct
G Q D I S E T F N H A N G L T L V S R A
caccagctagtgtgaggggatataactggtgccatgaccggaatgtagtaacgattttc
H Q L V M E G Y N W C H D R N V V T I F
agtgctccaaactattgttatcgttgtggttaaccaagctgcaatcatggaacttgacgat
S A P N Y C Y R C G N Q A A I M E L D D
actctaaaatactctttcttgagtttgacccagcacctcgtagaggcgagccacatggt
T L K Y S F L Q F D P A P R R G E P H V
actcgtcgtacccagactacttcctgtaa
T R R T P D Y F L -

```

Figure S1. Nucleotide and amino acid sequences of human PP2A α (NM_002715.2,) showing the fifth exon, which is missing in PP2A α 2, highlighted in red.

Figure S2

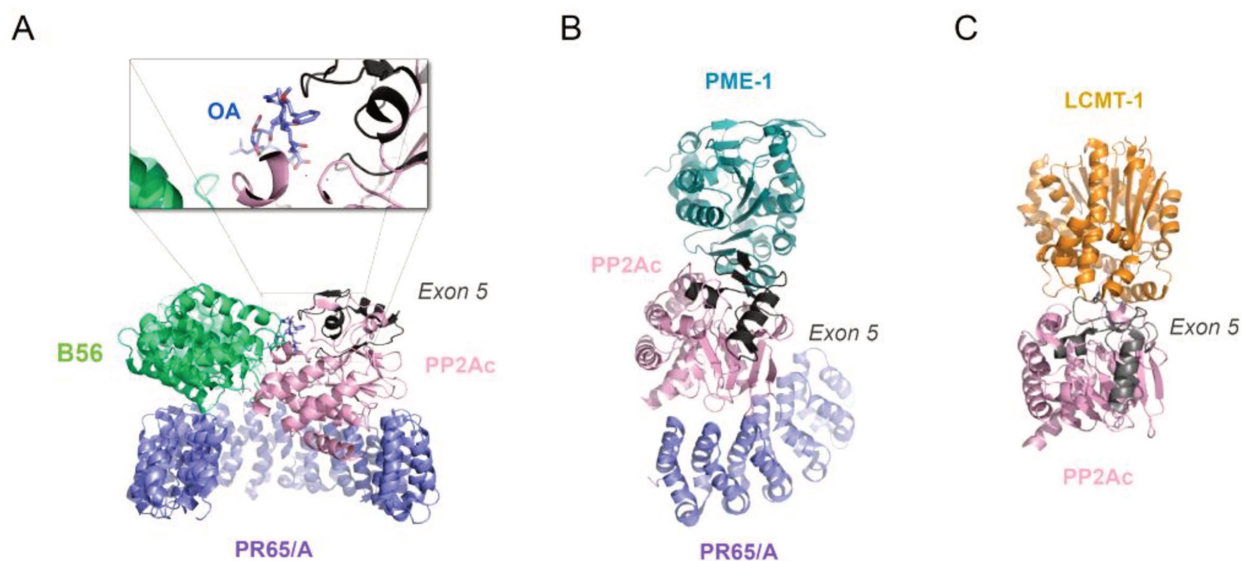


Figure S2. A. Three-dimensional structure model of heterotrimeric PP2Ac in complex with okadaic acid (PDB 2IAE). The box shows a closer view of okadaic acid (OA) and part of the exon 5 (dark gray). **B, C.** Three dimensional structure of PP2Ac core enzyme in complex with PME-1 (PDB 3C5W) and PP2Ac in complex with LCMT-1 (PDB 3P71) showing that exon 5 (dark grey) may participate in intermolecular interactions with these proteins. The images were generated using Pymol (www.pymol.org).

Figure S3

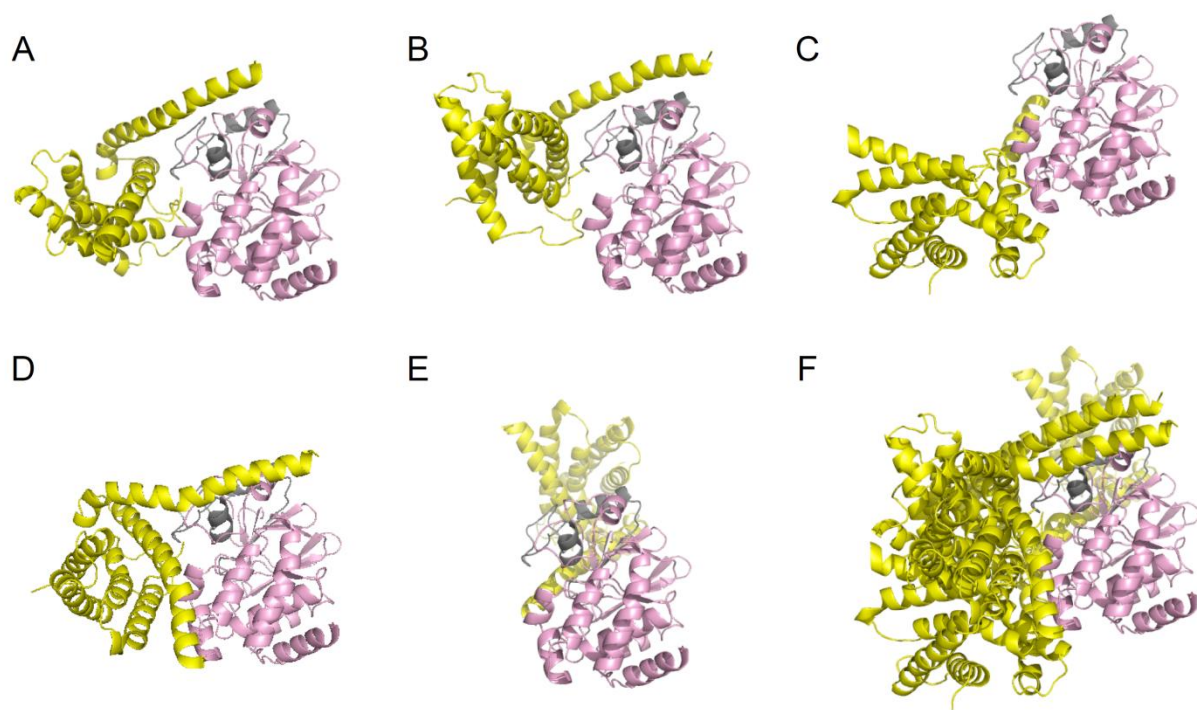


Figure S3. A-E. Cartoon representation of the five highest scoring models obtained using PP2Ac (PDB 3DW8, chain C) as receptor and $\alpha 4$ (PDB 3QC1) as ligand. $\alpha 4$ is colored in yellow and PP2Ac is colored in pink. Exon 5 of PP2Ac is colored in grey. A superposition of the models is shown in F. The models were obtained from automated docking using ClusPro 2.0 (<http://cluspro.bu.edu/>) and rendered using Pymol (<http://www.pymol.org>).

Figure S4

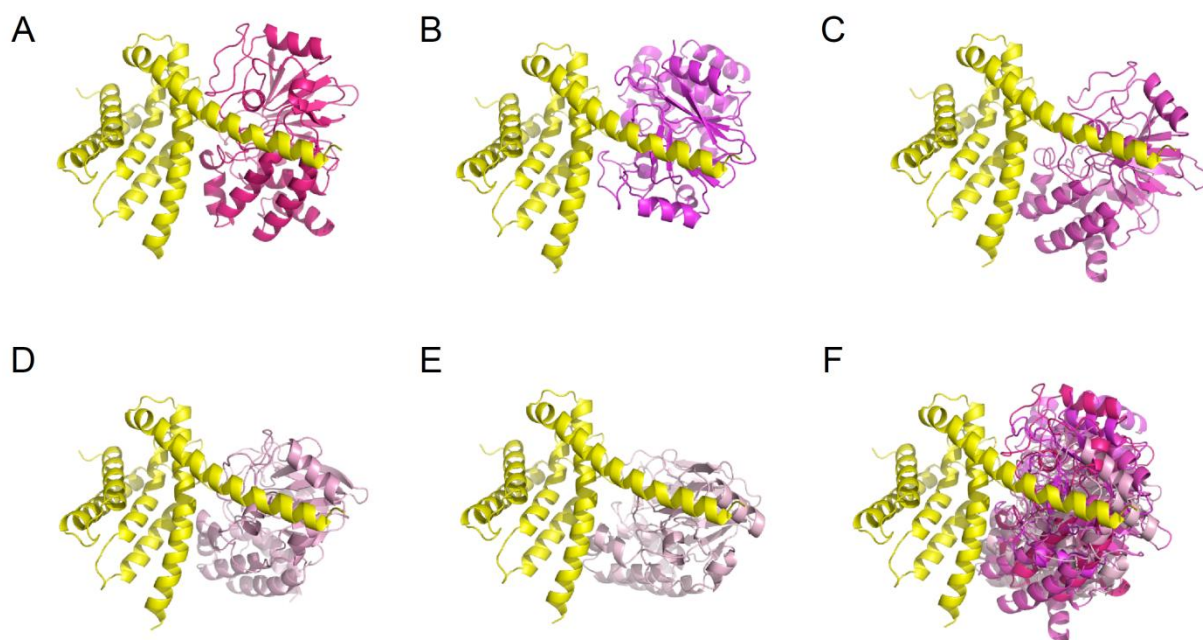


Figure S4. A-E. Cartoon representation of the five highest scoring models obtained using $\alpha 4$ (PDB 3QC1) as receptor and PP2Ac (PDB 3DW8, chain C) as ligand. $\alpha 4$ is colored in yellow and PP2Ac is colored in pink shades. A superposition of the models is shown in F. The models were obtained from automated docking using ClusPro 2.0 (<http://cluspro.bu.edu/>) and rendered using Pymol (<http://www.pymol.org>).

7.3. Outros anexos.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada "A proteína FEZ1 e a formação dos núcleos multilobulados":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

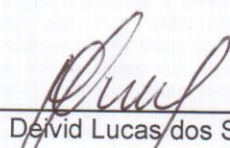
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

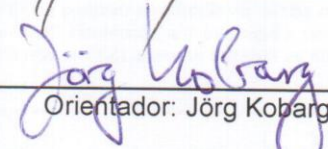
(X) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. JK 4.02, Instituição: Laboratório Nacional de Biociências (LNBio/CNPEM/ABTLuS).

() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. _____, Instituição: _____

(X) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. 1109/2009, Instituição: Faculdade de Ciências Médicas (UNICAMP)

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


Aluno: Deivid Lucas dos Santos Migueleti


Orientador: Jörg Kobarg

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Prof. Dr. MARCELO LANCELOTTI
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

JK 4.02

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa para análise pela CIBio - Comissão Interna de Biossegurança da ABTLuS – Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron

Título do projeto: A proteína FEZ1 e a formação do fenótipo de núcleos multilobulados ("flower-like"): mecanismos e consequências para o câncer.

Pesquisador responsável: Jörg Kobarg

Experimentador: Deivid Lucas dos Santos Migueleti

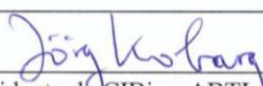
Nível do treinamento do experimentador: [] -Iniciação científica, [X] -mestrado, [] -doutorado, [] -doutorado direto, [] -pós-doutorado, [] -nível técnico, [] -outro, especifique: _____

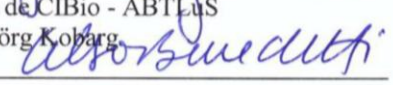
Resumo do projeto:

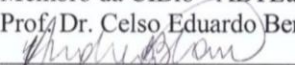
A proteína UNC-76 foi identificada como necessária para a fasciculação e alongação de axônios do verme *Caenorhabditis elegans*. Os defeitos das larvas mutantes *unc-76* sugerem uma função para UNC-76 durante o desenvolvimento do sistema nervoso tanto neste verme, quanto em *Drosophila melanogaster*. Da mesma forma, a proteína homóloga de mamíferos FEZ1 apresenta altos níveis de expressão de seu transcrito em tecidos neuronais e camundongos *knockout* para o gene *FEZ1* apresentam desvios de comportamento que remetem a desordens neurológicas. O papel de FEZ1 para o correto desenvolvimento do sistema nervoso parece residir na sua associação com elementos do citoesqueleto e vias de sinalização (e.g., PKC α), contribuindo assim para o crescimento axonal e a polarização celular. Trabalhos do grupo mostraram que FEZ1 é uma proteína multifuncional (*hub*), capaz de interagir com inúmeras proteínas, através de domínios *coiled-coil* C-terminais. Além disso, estudos estruturais mostraram que FEZ1 é uma proteína naturalmente desovelada e se apresenta como um dímero em solução. Isso suporta a hipótese de que FEZ1 atua junto ao citoesqueleto como uma proteína adaptadora dimérica e bivalente. Hipótese reforçada pelas observações de que FEZ1 interage e colocaliza com elementos do citoesqueleto (e.g., Nck1 e CLASP2). Ademais, a superexpressão de FEZ1, em células HEK293, provoca o aparecimento de núcleos multilobulados ("flower-like") em mais de 40% das células transfectadas, 64 horas após a transfecção, e tal fenótipo é revertido sob tratamento com nocodazol, uma droga que despolimeriza microtúbulos. Interessantemente, tal fenótipo é comum em alguns tipos de leucemia e já foi associado à resistência a drogas. Tendo isso em vista, esse projeto visa estudar o papel funcional da proteína FEZ1 na progressão de subtipos de leucemia mielóide aguda, bem como a mecanística por trás da formação do fenótipo de núcleos multilobulados. Para tal, blastos leucêmicos de pacientes com os subtipos M4 e M5 da LMA serão avaliados, por *Real Time* PCR e imunofluorescência, quanto à superexpressão de FEZ1. Através da construção de mutantes de FEZ1 e posterior transfecção de células em cultura, será investigado como a dimerização de FEZ1 contribui para a formação do fenótipo "flower-like". Finalmente, será investigado, por ensaio colorimétrico de viabilidade celular (MTT), se a aquisição de tal fenótipo mediante a superexpressão de FEZ1 promove aumento ou diminuição da viabilidade celular, bem como confere resistência a quimioterápicos.

A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 4.3.2010 .

Parecer final: [X] -projeto aprovado, [] -projeto recusado, [] -projeto com deficiências, favor comentários abaixo:


Presidente da CIBio - ABTLuS
Prof. Dr. Jörg Kobarg


Membro da CIBio - ABTLuS
Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti


Membro da CIBio - ABTLuS
Profa. Dra. Andrea Balan



CEP, 24/11/09.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 1109/2009 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 4846.0.000.146-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS EM MECANISMOS DE FORMAÇÃO DO FENÓTIPO DE NÚCLEOS MULTILOBULADOS ("FLOWER-LIKE") EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS DE LEUCEMIA MIELOÍDE AGUDA DOS SUBTIPOS M4 E M5".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Jörg Kobarg

INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/11/2009

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/11/10 (O formulário encontra-se no site acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar o fenótipo "flower like" em monócitos e promonócitos de pacientes com LMA dos subtipos M4 e M5.

III - SUMÁRIO

Estudo prospectivo, que envolve pacientes com LMA M4 e M5 do Hemocentro - Unicamp. Serão analisadas as lâminas de sangue periférico, análise por imunofluorescência e RT-PCR para identificar expressão das proteínas FEZ2, NEKs, Ki1-57, SMC3 e CLASP2.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O presente estudo mostra-se bem estruturado, com metodologia bem definida. Não está claro o número amostral do estudo: quantos pacientes com subtipo M4 e M5 serão analisados e se este número é importante. Por ser um trabalho prospectivo, temos que levar em conta que o número de casos novos de LMA/ ano no Hemocentro é de aproximadamente 32-35 pacientes, sendo que os subtipos M4 e M5 devem perfazer cerca de 50% dos casos. Como o material para o estudo requer apenas material em lâminas, sendo necessário ou se houver alguma dificuldade em se obter amostras, fica como sugestão a utilização de material de pacientes já diagnosticados que ficam em arquivo no laboratório do Hemocentro.

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 complementares, resolve aprovar sem



restrições o Protocolo de Pesquisa, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

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.

VII – DATA DA REUNIÃO

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de novembro de 2009.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
VICE-PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP