

GERMANNA LIMA RIGHETTO

**“SF2/ASF E SRPK2: RELAÇÃO ENTRE A MAQUINARIA DE
SPLICING ALTERNATIVO E O DESENVOLVIMENTO DA
LEUCEMIA”**

CAMPINAS

2013

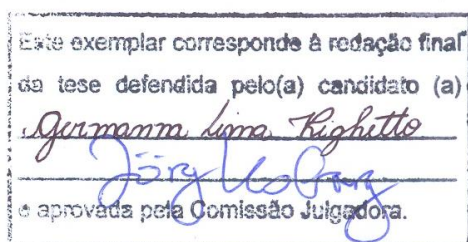


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

GERMANNA LIMA RIGHETTO

**“SF2/ASF E SRPK2: RELAÇÃO ENTRE A MAQUINARIA DE
SPLICING ALTERNATIVO E O DESENVOLVIMENTO DA
LEUCEMIA”**



Tese apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Mestra em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.

Orientador: Dr. Jörg Kobarg
Coorientador: Dr. José Andrés Yunes

CAMPINAS,
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

R449s Righetto, Germanna Lima, 1989-
SF2/ASF e SRPK2: relação entre a maquinaria de
splicing alternativo e o desenvolvimento da leucemia /
Germannna Lima Righetto. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

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

1. Splicing de RNA. 2. Splicing alternativo. 3.
Leucemia. 4. Análise de microarranjo. I. Kobarg,
Jörg. II. Yunes, José Andrés. III. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: SF2/ASF and SRPK2: correlation of alternative splicing machinery
and leucemia development

Palavras-chave em Inglês:

RNA splicing

Alternative splicing

Leukemia

Microarray analysis

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Jörg Kobarg [Orientador]

Carmen Sílvia Passos Lima

Ana Carolina de Mattos Zeri

Data da defesa: 20-03-2013

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 20 de março de 2013

BANCA EXAMINADORA

Dr. Jörg Kobarg (orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima


Assinatura

Dra. Ana Carolina De Mattos Zeri


Assinatura

Dra. Sandra Martha Gomes Dias

Assinatura

Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira

Assinatura

Índice

Agradecimentos	vi
Lista de abreviações e siglas.....	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. Introdução.....	1
1.1. <i>Splicing alternativo: função e importância biológica</i>	1
1.2. <i>Relação entre splicing alternativo aberrante e a oncogênese</i>	3
1.3. <i>SR quinases e a leucemia</i>	5
1.4. <i>A leucemia e a alteração na maquinaria de splicing alternativo</i>	7
2. Objetivos	11
3. Materiais e Métodos	12
3.1. <i>Cultivo de linhagens leucêmicas</i>	12
3.2. <i>Coleta das células, extração de RNA e síntese do cDNA</i>	12
3.3. <i>Amplificação do cDNA de SRPK2 e sequenciamento</i>	12
3.4. <i>Quantificação por qRT-PCR</i>	14
3.5. <i>Clonagem do cDNA de SF2/ASF no vetor pcDNA-FLAG</i>	15
3.6. <i>Transfecção de células HEK293T</i>	16
3.7. <i>Coleta e lise celular para análise por Western Blotting</i>	16
3.8. <i>Imunoprecipitação e Western Blotting</i>	17
3.9. <i>Extração de RNA e análise da sua qualidade</i>	17
3.10. <i>Experimento de Exon Array: síntese do cDNA e hibridização dos chips</i>	18
3.11. <i>Experimento de Exon Array: escaneamento e análise primária dos dados</i>	18
3.12. <i>Experimento de Exon Array: clusterização hierárquica</i>	20
3.13. <i>Experimento de Exon Array: gene level analysis X exon level analysis</i>	20
4. Resultados e Discussão.....	22
4.1. <i>Busca por alterações no transcrito de SRPK2 em linhagens leucêmicas</i>	22
4.2. <i>Busca por alterações na expressão das SR quinases SRPK1, SRPK2 e CLK1 em leucemias</i>	37
4.3. <i>Busca por alterações no splicing global de células ectopicamente expressando o fator de splicing SF2/ASF</i>	40
5. Conclusão e Perspectivas	55
6. Referências	56
7. Anexos.....	62

À minha querida e amada mãe.

Agradecimentos

Dedico essa dissertação e agradeço, primeiramente, à minha mãe, Vera Lúcia Lima Righetto. Admiro muito sua força e obstinação. Obrigada por sempre ter me protegido, lutado pela nossa família e pela minha felicidade. Sem seu apoio nada disso seria possível, pois você é meu alicerce e minha mola propulsora. Obrigada por suportar a ausência, a distância e, principalmente, por compreender e me ensinar que o amor verdadeiro supera qualquer obstáculo. Amo você demais, apesar de, por vezes, não demonstrar tão explicitamente. Você estará sempre em minha mente e coração.

Agradeço ao meu irmão, Guilherme Lima Righetto, pelos incríveis momentos e risadas. Obrigada por ter feito minha infância e adolescência tão felizes e com lembranças hilárias. Sinto muito sua falta no dia-a-dia e gostaria de tê-lo mais perto.

Agradeço ao meu pai, Oswaldo Righetto, por ter um papel tão fundamental na formação da minha personalidade. Agradeço mais ainda por ter dado vida ao meu irmão mais velho e aos meus novos irmãozinhos (Isa, Sophia, Laura e Augusto), que já amo infinitamente. Obrigada por terem feito meu ano de 2012 mais cheio de amor, emoções e pureza.

Agradeço a todos os mestres que participaram de minha formação e me estimularam sempre. Obrigada, especialmente, aos meus professores de ciência, biologia e química: Zezinho, Fernando, Ana Maria, Luizão e Angelo, por terem me mostrado quão fascinante é esse mundo de descobertas e questionamentos.

Agradeço a todos os amigos que fizeram minha trajetória de vida mais alegre e prazerosa. Obrigada aos meus amigos de escola: Alinne, Roberta, Bianca, Bruno e Mariele pelas conversas, risadas e ensinamentos. Obrigada aos meus amigos de faculdade: Clara Luz, Maria Angélica (Linguetinha), Mayra, Aline, Mariana e Jéssica, pelo companheirismo e apoio durante a difícil fase de adaptação fora de casa.

Agradeço a todas as meninas que já moraram comigo e, especialmente, àquelas cuja amizade guardo no meu coração. Obrigada Aline, Lillian, Rebeka, Kátia, Helô, Raquel, Bia, Larissa, Priscilinha, Olívia, Marina e Ravena por terem me ajudado nessa jornada de amadurecimento e autoconhecimento. Sinto falta da companhia de vocês!

Agradeço a todos os alunos e funcionários do LNBio que ajudaram direta ou indiretamente na execução desse trabalho e no meu amadurecimento profissional. Obrigada as técnicas Gi, Andréia e Carol por tornarem os dias de trabalho mais agradáveis. Obrigada a todos os colegas do grupo LMA, em especial àqueles que se tornaram meus amigos: Diogo, Deivid, Eduardo, Ariane, Gabriela e Vanessa.

Agradeço em especial à Fernanda Luisa Basei por ser mais do que uma colega de trabalho, mas sim uma conselheira e amiga. Obrigada pelos inúmeros ensinamentos, pelas dicas, pelas conversas, pelo seu ombro amigo e extremo companheirismo. Admiro muito você e sua capacidade científica, pois sem suas contribuições esse trabalho não seria o mesmo.

Obrigada à todos os companheiros do meu antigo grupo de trabalho: Zé, Nádia e Vanessa. Agradeço as risadas, o companheirismo e a leveza de uma relação pura e fraternal.

Obrigada especialmente à Nádia Martins por ter me recebido tão bem no laboratório, ter me ajudado e por ser uma das companhias mais agradáveis e racionais que possuo. Agradeço todas as conversas, broncas, risadas e fugas do laboratório.

Agradeço aos alunos e funcionários do Boldrini que me ajudaram em muitos experimentos e me ensinaram tanto. Obrigada Ana, Ana Luiza, André, Priscila, Rafael, Patrícia, Mônica e Amanda por me receberem de braços abertos e ainda me ajudarem a me habituar com a dinâmica de um laboratório diferente.

Agradeço aos meus amigos de especialização Matheus e Rodrigo. Vocês tornaram minhas quintas-feiras mais alegres e minha semana mais leve. Obrigada Rodrigo por se engajar tanto em me ensinar mais sobre o mundo jornalístico e por se empenhar na leitura e melhoria dos meus textos.

Agradeço não nominalmente a todas as pessoas que passaram pela minha vida e fizeram parte da minha trajetória. Obrigada pelas situações e ensinamentos que, mesmo de forma não intencional, me fizeram refletir sobre mim mesma e sobre a vida. Obrigada pelos desafios e amadurecimento que vocês me proporcionaram.

Agradeço ao Rafael F. P. e Silva por ter sido um anjo em minha vida. Obrigada por me estender a mão em um momento tão difícil e me ajudar a enxergar outras perspectivas sobre mim e sobre minha vida. Sinto muita falta dos nossos encontros, das conversas, dos conflitos e ensinamentos. Espero que você seja muito feliz e siga ajudando outras pessoas. Sou eterna e profundamente grata.

Agradeço à Cristiane S. Rocha por ter me ajudado nas análises de dados de microarranjo. Agradeço a paciência e a disponibilidade em me receber. Agradeço também ao Fernando Nodari pelo ótimo treinamento e pela disposição em trabalhar de forma intensa e emocionante na execução dos experimentos de microarranjo.

Agradeço ao Gustavo Bressan pelos ensinamentos, puxões de orelha e pela oportunidade de participar de um projeto tão interessante e motivador. Espero que essa parceria gere muitos frutos e nos permita aprender e crescer como profissionais.

Agradeço ao Jörg Kobarg pela orientação e por ter me aceitado no grupo em um momento crítico. Obrigada por ser tão humano, bondoso e compreensivo. Obrigada por ter me consolado em diversos momentos de choro.

Agradeço ao Andrés Yunes pela co-orientação e pelos inúmeros ensinamentos. Obrigada por ter me dado “luz” em diversos momentos e por sempre estar disposto a ensinar e responder a questionamentos.

Agradeço à Unicamp pela formação. Sempre sonhei em estudar nessa universidade e me orgulho de ser sua “filha”. Obrigada ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade de aperfeiçoamento.

Agradeço, finalmente, às agências de fomento FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e CNPq (Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio nesse e em outros projetos dos quais fiz parte.

*É preciso amor pra poder pulsar/
É preciso paz pra poder sorrir/
É preciso chuva para florir.*

Almir Sater *(Tocando em frente)*

*Queira/
Basta ser sincero e desejar profundo/
Você será capaz de sacudir o mundo, vai!/
Tente outra vez.*

*Tente/
E não diga que a vitória está perdida/
Se é de batalhas que se vive a vida/
Vai!/
Tente outra vez.*

Raul Seixas (Tente outra vez)

*“Não é possível libertar um povo sem, antes, livrar-se da escravidão de si mesmo.
Sem esta, qualquer forma de libertação será insignificante, efêmera e ilusória, quando não um
retrocesso. Cada pessoa tem sua caminhada própria.
Faça o melhor que puder.
Seja o melhor que puder.
O resultado virá na mesma proporção de seu esforço.
Compreenda que, se não veio, cumpre a você modificar suas técnicas, visões, verdades, etc.
Nossa caminhada somente termina no túmulo.
Ou até mesmo além...”*

Mahatma Ghandi

Lista de abreviações e siglas

Akt – serina-treonina quinase (também conhecida como PKB - *Protein Kinase B*)

B2M – Beta-2-Microglobulina

BH – método estatístico de Benjamini-Hochberg

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

CDD - *Conserved Domain Database*

cDNA – *complementary DNA*

CLK1 – *CDC-like Kinase 1*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA – *Desoxyribonucleid Acid*

dNTP - *deoxyriboNucleotide TriPhosphates*

GUS - beta-GlucUronidaSe

HEK293T – *Human Embrionic Kidney cell* (linhagem celular)

LLA-B - Leucemia Linfóide Aguda de célula B

LLA-T – Leucemia Linfóide Aguda de célula T

LMA - Leucemia Mielóide Aguda

LMC - Leucemia Mielóide Crônica

MDS - *Myelodysplastic Syndrome*

MM – *MisMatch*

mTOR - *Mammalian Target Of Rapamycin*

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NMD - *Nonsense-mediated Decay*

ORF – *Open Reading Frame*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PDK1 - *Phosphoinositide-Dependent Kinase-1*

PI3K - *PhosPholInositide 3 Kinase*

PLIER - *Probe Logarithmic Intensity Error Estimation*

PM - *Perfect Match*

qRT-PCR – *quantitative Reverse Transcriptase PCR*

RICTOR - *Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR*

RMA - *Robust Multichipchip Analysis*

RNA – *Ribonucleid Acid*

RNAi – RNA de interferência

RNA_m – RNA mensageiro

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute Medium*

RQ – *Relative Quantification*

RRM – *RNA Recognition Motif*

RS – domínio rico em arginina (R) e serina (S)

S6K – *S6 Kinase*

SF2/ASF – *Splicing Factor 2*

SF3 – *Splicing Factor 3*

shRNA – *small hairpin RNA*

siRNA – *small interference RNA*

snRNA – *small nuclear RNA*

snRNP – *small nuclear RiboNucleoProtein*

SRPK1 - *Serine-Arginine Protein Kinase 1*

SRPK2 - *Serine-Arginine Protein Kinase 2*

SRSF1 – *Serine-Arginine Splicing Factor 1*

UTR – *UnTranslated Region*

Resumo

O processo de *splicing* do RNAm é responsável por orquestrar a junção de *exons*, criando uma grande diversidade de isoformas gênicas. Alterações nos componentes da maquinaria de *splicing* e, conseqüentemente, no processamento do pré-RNAm podem causar ou contribuir para uma infinidade de doenças, dentre elas o câncer. A proteína SF2/ASF foi o primeiro fator de *splicing* a ser caracterizado como proto-oncogênico, estando superexpresso em diferentes tipos de neoplasias. Sabe-se que a ativação desse fator é, principalmente, mediada por SR quinases conhecidas como *splicing* quinases e pertencentes à família das SRPKs. A quinase SRPK1, responsável pela fosforilação de SF2/ASF no citoplasma, tem conhecida superexpressão em leucemias. Já a quinase SRPK2, paróloga a SRPK1, possui relação já demonstrada com a proliferação de células leucêmicas e com sua diferenciação. Diante desse quadro, buscamos nesse estudo possíveis correlações entre a maquinaria de *splicing* e o câncer, dando enfoque à relação entre essa maquinaria e a leucemia. Para tanto, buscamos alterações no cDNA de SRPK2 e quantificamos a expressão das SR quinases SRPK1, SRPK2 e CLK1 em diferentes linhagens de leucemia. Além disso, avaliamos, usando o sistema de *Exon Array* (Affymetrix), o efeito da superexpressão do fator de *splicing* SF2/ASF em células de mamífero, buscando alterações globais no *splicing* dessas células capazes de explicar o caráter oncogênico do fator. Foram encontradas nesse estudo duas novas isoformas de SRPK2, isoladas a partir do cDNA das linhagens de leucemia estudadas. Também foi observada a expressão diferencial das SR quinases SRPK1 e SRPK2 nas linhagens leucêmicas de origem linfoide e mieloide, dando indícios sobre um possível papel divergente dessas quinases nos diferentes tipos de leucemia. Além disso, nas análises preliminares do conjunto de dados obtidos no experimento de *Exon Array*, foi possível traçar importantes considerações sobre seu caráter oncogênico. Esses dados preliminares do experimento de *Exon Array*, somados às demais alterações encontradas nas SR quinases, fornecem novas e interessantes pistas sobre a relação entre alterações na maquinaria de *splicing* e a oncogênese.

Abstract

The mRNA splicing is the cellular process responsible for RNA edition, expanding the genome by the combination of gene exons. Mutations in components of this machinery may cause or contribute to a variety of diseases, including cancer. The SF2/ASF protein was the first splicing factor characterized as proto-oncogenic by its overexpression in diverse neoplasias. The cellular activation of this and other splicing factors are mainly dependent on specific kinases, known as splicing kinases and components of a SRPKs family. The SRPK1 kinase, responsible for the cytoplasmic phosphorylation of SF2/ASF, is overexpressed in leukemia. SRPK2, a paralog of SRPK1, is involved in leukemia cell proliferation and differentiation. In this study we searched for splicing machinery and cancer correlations, focusing in the relationship of this machinery and leukemia. In this study we searched for alterations in SRPK2 cDNA and quantified the expression of this kinase and SRPK1 and CLK1 in leukemia immortalized cells. Moreover, we analyzed using Exon Arrays (Affymetrix) the effect of SF2/ASF overexpression in global splicing of non-oncogenic cells, searching for alterations related to its oncogenic character. In this study we discovered two new isoforms of SRPK2 amplified through different leukemia cell lineages. We confirmed the differential expression of SRPK1 and SRPK2 kinases in lymphoid and myeloid leukemia lineages indicating a divergent correlation of these kinases in different leukemia types. In the Exon Array preliminary analysis we also observed important alterations in cellular gene expression. These data and the alterations found in SR kinases provide new and interesting clues about the relationship of splicing machinery alterations and oncogenesis.

1. Introdução

1.1. *Splicing alternativo: função e importância biológica*

Grande parte do genoma humano e dos eucariotos superiores é formado por sequências não codificantes e que, consequentemente, não contribuem em informação para a síntese de proteínas. Devido à presença dessas sequências, denominadas de *introns*, o genoma eucariótico é caracterizado como descontínuo (Cooper, Wan & Dreyfuss, 2009). O processo pós-transcricional de *splicing* é o responsável por, no momento da formação do RNAm maduro, eliminar as sequências não codificantes e unir as porções do pré-RNAm que contém informações traduzíveis, os *exons* (Ward & Cooper, 2010).

Estima-se que 94% do genoma seja processado através do *splicing* alternativo (Hallegger, Llorian & Smith, 2010). O *splicing* alternativo permite que, além dos *introns*, *exons* também possam ser modificados e até eliminados durante o processamento do pré-RNAm (Grosso *et al.*, 2008). O mecanismo permite que diferentes isoformas gênicas possam ser originadas a partir de um mesmo transcrito primário (o pré-RNAm), contribuindo para a diversificação do transcriptoma e proteoma dos humanos e demais eucariotos (Black *et al.*, 2003; Grosso *et al.*, 2008; Hallegger, Llorian & Smith, 2010; Visconte *et al.*, 2012).

Tanto o processo de *splicing* constitutivo quanto o de *splicing* alternativo são dependentes da ação coordenada de pequenos RNAs nucleares, conhecidos como snRNAs (do inglês, *small nuclear RNAs*) e de diferentes proteínas: quinases, fatores de *splicing* e proteínas nucleares (Ward & Cooper, 2010).

O reconhecimento de *introns* e *exons* é feito por fatores gerais e específicos de *splicing*, seguido pelo recrutamento do spliceossomo, formado pela junção de cinco complexos compostos por diferentes proteínas associadas a apenas um snRNA (Maeder & Guthrie, 2008). Os snRNAs que compõem os complexos do spliceossomo são chamados de snRNAs tipo U e, por isso, levam à denominação dos complexos do spliceossomo de U1, U2, U4, U5 e U6 (Krummel *et al.*, 2009), sendo também chamados de snRNPs (do inglês, *small nuclear ribonucleoproteins*).

De forma simplificada, a montagem do spliceossomo se inicia através da ligação da snRNP U1 ao sítio do pré-RNAm reconhecido pelo fator de *splicing*, desencadeando a ligação das demais snRNPs U2, U4, U5 e U6 mediante a hidrólise de ATP (Maeder & Guthrie, 2008; Krummel *et al.*, 2009), como ilustrado pela Figura 1. A ação do spliceossomo sobre a fita de pré-RNAm pode resultar na exclusão de *introns* e na alteração dos *exons* existentes, que na ocorrência de *splicing* alternativo, podem ser

excluídos ou incluídos (Grosso *et al.*, 2008; Maeder & Guthrie, 2008). OS principais eventos de *splicing* alternativo estão ilustrados na Figura 2.

A ação coordenada dos diferentes fatores de *splicing*, de proteínas acessórias e do spliceossomo é, diretamente, influenciada pelo tipo celular, estado fisiológico e de desenvolvimento do organismo (Anczuków *et al.*, 2012). Sendo a forma de processamento do RNAm capaz de afetar diversos processos celulares e de desenvolvimento, como a determinação sexual, apoptose, excitação e contração celular (Black *et al.*, 2003; Grosso *et al.*, 2008).

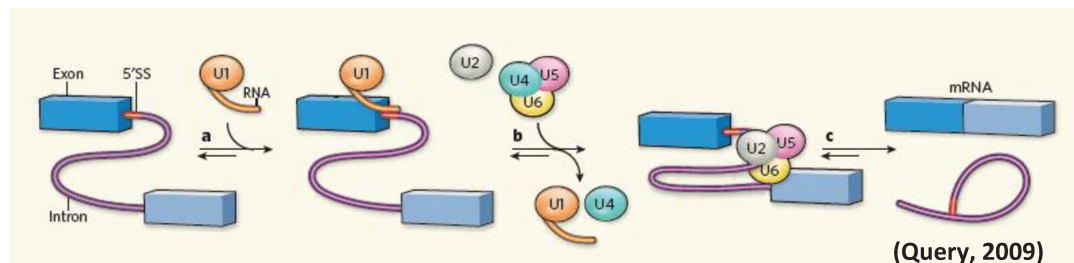


Figura 1: Diagrama esquemático das etapas de formação do spliceossomo e edição do RNAm. O pré-RNAm é formado por regiões codificantes (*exons*) e não codificantes (*introns*), que precisam ser editadas pelo spliceossomo. **A:** na primeira etapa do processo o componente U1 do spliceossomo se liga ao RNA que será editado. **B:** as subunidades remanescentes - U2, U4, U5 e U6 – interagem com o complexo RNA-U1. U1 e U4 deixam o complexo, ativando a catálise mediada pelo spliceossomo e o *splicing* do RNA. **C:** O spliceossomo remove o *intron* e une os *exons*, deixando o RNAm pronto para ser traduzido.

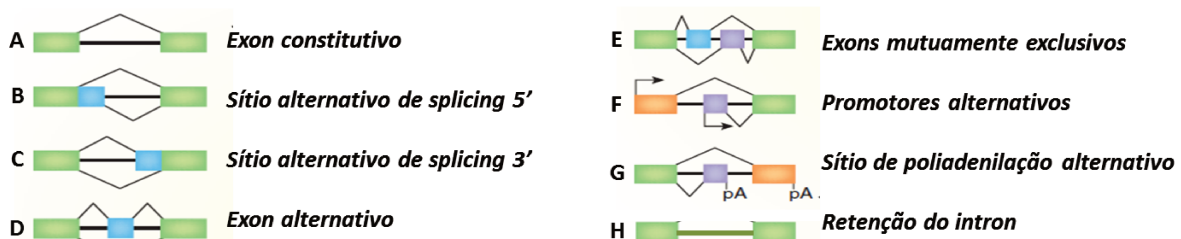


Figura baseada em Hu & Fu (2007) e Ward & Cooper (2010)

Figura 2: Possibilidades de *splicing* alternativo do pré-RNAm. O pré-RNAm pode ser processado de diversas formas através do *splicing* alternativo: *exons* podem ser mantidos (**A**) ou alternativamente retirados (**D**). Podem também ter parte de sua sequência excluída pela presença de sítios alternativos de *splicing* (**B** e **C**) ou serem mutuamente exclusivos dentro da sequência de RNAm (**E**). O *splicing* alternativo ainda é responsável pelo processamento diferencial de promotores e pela poliadenilação alternativa do RNAm (respectivamente, **F** e **G**). Além de também, em alguns casos, promover a retenção total ou parcial de *introns*, que irão compor a sequência do RNAm maduro (**H**).

1.2. Relação entre *splicing* alternativo aberrante e a oncogênese

Como mecanismo de extrema importância para a homeostase celular e dependente da ação coordenada de diferentes componentes celulares, é de se esperar que erros na regulação do processo de *splicing* possam implicar em um grande número e diversidade de doenças (Black *et al.*, 2003; Grosso *et al.*, 2008). Estima-se que 50% das doenças resultantes de mutação tenham como causa erros no processamento do pré-RNA_m (Ward & Cooper, 2010). Sabe-se que a indução da produção anômala de um determinado RNA_m, na célula, pode contribuir direta ou indiretamente para o desenvolvimento do câncer, sua progressão e resposta à terapia (Grosso *et al.*, 2008).

Aparentemente os efeitos mais nocivos da modificação da atividade do *splicing*, que podem culminar no desenvolvimento do câncer, envolvem a alteração de genes relacionados à migração, crescimento celular, resposta hormonal, apoptose e finalmente, à resposta aos quimioterápicos (Venables *et al.*, 2006; Skotheim *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007).

Dois tipos de alterações são responsáveis pela produção anômala de isoformas de *splicing*: mutações em *cis* e mutações em *trans*. As mutações em *cis* são aquelas que ocorrem nas sequências consenso de determinado gene e prejudicam o *splicing*, gerando isoformas aberrantes, apenas na sequência afetada. As mutações em *trans* afetam os fatores responsáveis pelo *splicing* e, dessa forma, são mais abrangentes e, possivelmente, prejudiciais (Wang *et al.*, 2007).

São cada vez mais numerosos os trabalhos que reportam alterações na maquinaria de *splicing* - mutações em *trans* - em diferentes tipos de câncer, ainda que o efeito dessa desregulação para o *splicing* global das células cancerosas nem sempre seja bem compreendido (Grosso *et al.*, 2008).

Em 2007, Karni e colaboradores foram os primeiros a caracterizar um fator de *splicing*, o SF2/ASF, como proto-oncogênico. Esse fator, também denominado de SRSF1, é componente da principal família de fatores de *splicing*, a Serine-Arginine Splicing Factor (SRSF) *Family*, ilustrada na Figura 3. Essa família é caracterizada pela presença de sítios de reconhecimento de RNA (do inglês, *RNA Recognition Motif* – RRM) e de domínios ricos em serina e arginina, conhecidos como domínios SR (Black *et al.*, 2003). Dentre os componentes da família, SF2/ASF é um dos mais estudados e importantes para a ocorrência do *splicing*, sendo responsável pelo recrutamento de U1 em diversos sítios de edição do RNA_m.

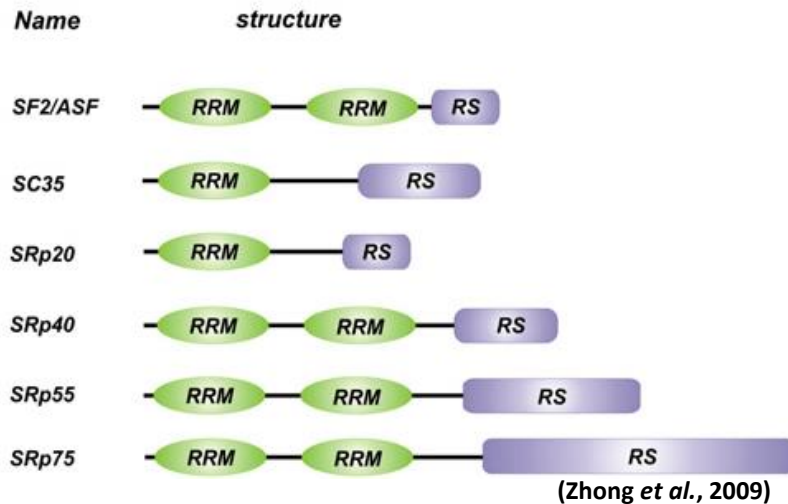


Figura 3: Componentes da família de fatores de *splicing* ricos em serina e arginina (SRSF). Os componentes dessa família de fatores de *splicing* são caracterizados pela presença de uma porção rica em resíduos de arginina e serina (porções RS, em roxo) e pela presença de porções de reconhecimento do RNA (porções RRM, em verde), por onde se ligam à sequência a ser editada.

São inúmeros os indícios que levaram Karni e colaboradores (2007) a sugerir um papel importante de SF2/ASF na oncogênese. Primeiramente o fator de *splicing* foi encontrado superexpresso em tumores sólidos de cólon, tireoide, adenocarcinoma, intestino delgado, rim e fígado. Além de estar amplificado (com maior número de cópias de RNAm em comparação com o tecido normal) em pacientes portadores de câncer de mama.

No mesmo estudo a expressão ectópica de SF2/ASF em fibroblastos foi capaz de gerar sarcomas em camundongos, mostrando uma possível relação entre o fator de *splicing* e a transformação maligna de células. Hipótese corroborada pela reversão tumoral nos camundongos após o restabelecimento da expressão normal do fator, pelo uso de shRNA (do inglês, *small hairpin RNAs*).

Estudos de Ezponda e colaboradores (2010) encontraram SF2/ASF também superexpresso em pacientes portadores de câncer de pulmão. Os autores observaram ainda que células imortalizadas desse tipo de câncer tinham a apoptose induzida ao serem tratadas com siRNA (do inglês, *small interference RNA*), que restabeleceria a expressão do fator de *splicing* a níveis normais.

Já os dados de Anczuków e colaboradores (2012) mostraram que a superexpressão de SF2/ASF foi suficiente para gerar tumorigênese em glândulas mamárias de camundongos. Análises *in vitro* dos mesmos autores mostraram que a superexpressão de SF2/ASF era capaz de aumentar a proliferação de células do epitélio mamário que, ao

serem crescidas em cultura celular 3D, resultaram em estruturas glandulares acinosas bastante desenvolvidas.

Os trabalhos posteriores à caracterização de SF2/ASF como proto-oncogênico por Karni e colaboradores (2007) avolumam indícios sobre seu possível papel na oncogênese e somam novas informações sobre a atuação desse fator de *splicing* em diferentes tipos de câncer.

1.3. SR quinases e a leucemia

A caracterização de SF2/ASF como proto-oncogênico joga luz sobre outro componente fundamental da maquinaria de *splicing*: as quinases que regulam os fatores de *splicing*. A atividade de SF2/ASF e de outros fatores de *splicing* da família SR sobre a fita de pré-RNA é diretamente modulada por fosforilação (Giannakouros *et al.*, 2011). A principal família responsável pela ativação dos fatores de *splicing* é aquela composta por serina-arginina (SR) quinases, cujos componentes recebem a denominação de Serine-Arginine Protein Kinases (SRPKs) (Giannakouros *et al.*, 2011). Essas quinases fosforilam os domínios ricos em serina e arginina das proteínas SR, regulando sua sublocalização celular, a saída dos speckles nucleares (porções nucleares ricas em fatores de *splicing*), a interação proteína-proteína e RNA-proteína e, finalmente, a ação dos fatores SR sobre as fitas de pré-RNA (Aubol *et al.*, 2003; Jang *et al.*, 2008).

A SR quinase SRPK1 foi a primeira a ser descoberta em um *screening* em busca de proteínas responsáveis pela fosforilação de fatores SR (Giannakouros *et al.*, 2011). A quinase possui papel fundamental na atividade de SF2/ASF, sendo responsável pela fosforilação de seus domínios SR e pelo seu endereçamento ao núcleo (Koizumi *et al.*, 1999; Aubol *et al.*, 2003).

Além do fator de *splicing* SF2/ASF, a quinase responsável por sua regulação parece também estar alterada no contexto do câncer. Alguns trabalhos já observaram uma expressão alterada de SRPK1 e de outras SR quinases em diferentes tipos de neoplasias. Vale citar nesse contexto os trabalhos de Hayes e colaboradores (2006 e 2007) onde a expressão de SRPK1 foi encontrada aumentada em diferentes linhagens derivadas de tumores de pâncreas, mama e cólon. Interessantemente, quando as linhagens tinham a expressão de SRPK1 diminuída pelo uso de siRNA se tornavam mais sensíveis ao tratamento com gemcitabina e cisplatina, conhecidos quimioterápicos.

Esses dados dão indícios sobre uma possível relação entre SRPK1 e a progressão dessas neoplasias. E, além disso, sugerem um possível favorecimento do tratamento

quimioterápico convencional através da inibição dessa quinase, aumentando a reposta de morte das células cancerosas (Hayes *et al.*, 2006 e 2007).

Além da superexpressão em tumores sólidos (Hayes *et al.*, 2006 e 2007), a expressão de SRPK1 também parece estar alterada em alguns tipos de leucemia. SRPK1 foi encontrada superexpresso em pacientes adultos com leucemia linfóide aguda de células T (LLA-T) e em pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC) (Hishizawa *et al.*, 2005; Salesse *et al.*, 2004).

Outra SR quinase paráloga SRPK1 (Giannakouros *et al.*, 2011), a SRPK2, parece desempenhar um papel importante na leucomogênese. As duas quinases diferem quanto a expressão em diferentes tecidos e quanto a algumas características estruturais (Giannakouros *et al.*, 2011), assim como demonstrado na Figura 4. SRPK2 possui uma porção rica em prolina na porção N-terminal e uma região ácida no seu domínio espaçador, domínio que divide o sítio catalítico em duas porções e é característico dessa classe de quinases (Wang *et al.*, 1998; Jang *et al.*, 2008; Giannakouros *et al.*, 2011). A região ácida do domínio espaçador é a responsável pela interação com o fator de *splicing* acinus, preferencialmente fosforilado por essa quinase (Jang *et al.*, 2008; Giannakouros *et al.*, 2011).

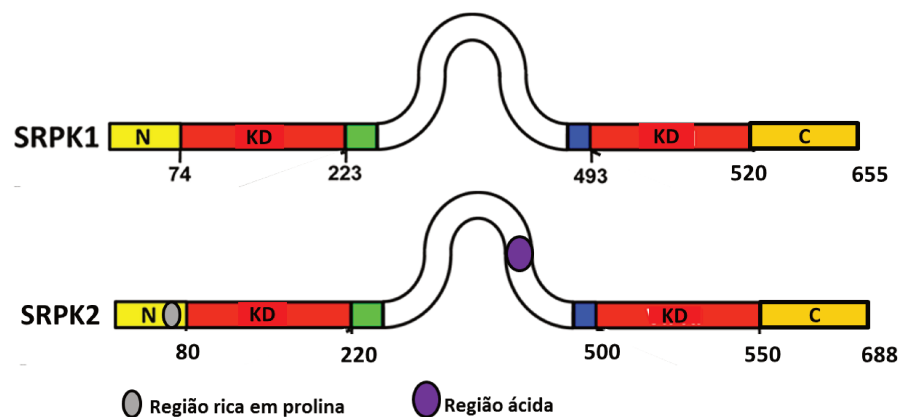


Figura baseada em Giannakouros *et al.*, 2011 e Aubol *et al.*, 2012

Figura 4: Representação esquemática das estruturas primárias das quinases SRPK1 e SRPK2. Essa família de quinases é responsável pela fosforilação de fatores de *splicing*, sendo sua principal característica a divisão do domínio de quinase (KD, em vermelho) em duas porções, pela presença de uma região espaçadora (em branco). SRPK1 e SRPK2 apresentam alta similaridade, diferindo pela presença de uma região rica em prolina na porção N-terminal de SRPK2 (em cinza) e uma região ácida no seu domínio espaçador (em roxo), por onde interage com o fator de *splicing* acinus (Jang *et al.*, 2008; Giannakouros *et al.*, 2011).

Estudos de Jang e colaboradores (2008) mostram que além de superexpresso, o fator de *splicing* acinus encontra-se superativado em pacientes portadores de malignidades hematológicas. Das diferentes leucemias analisadas – leucemias linfoides agudas de célula T e de célula B e leucemia mieloide aguda – todas apresentavam algum nível de alteração na expressão de SRPK2 e do fator de *splicing* acinus.

Nos experimentos de proliferação celular feitos com a linhagem leucêmica K562 foi observada, pelos mesmos autores, uma diminuição significativa na taxa de crescimento dessas células após o *knock down* de SRPK2, feito por RNAi. E, além disso, as análises de células primárias de pacientes com LMA mostraram uma alta expressão de SRPK2, alteração também observada nas linhagens leucêmicas de origem mieloide NB4 e U937 e linfóide BJAD e DG75.

Jang e colaboradores (2008) também observaram alterações na sublocalização celular da quinase em linhagens linfoides. SRPK2, que se distribui, preferencialmente, no citoplasma de células mieloides saudáveis e leucêmicas, foi encontrada no núcleo de linhagens leucêmicas linfoides. Observação que, somada aos demais fenômenos relatados por esses autores, fornecem importantes indícios sobre a importância da quinase SRPK2 na proliferação de células leucêmicas e, possivelmente, no desenvolvimento da leucemia.

1.4. A leucemia e a alteração na maquinaria de *splicing* alternativo

A leucemia (do grego, leukos: branco; aimas: sangue) é um tipo de câncer que atinge as células progenitoras do sangue. A doença é caracterizada por desordens na contagem, morfologia e dinâmica molecular das células sanguíneas, resultantes do acúmulo de mutações durante o processo de sua diferenciação, conhecido como hematopoiese (ilustrada na Figura 5). As mutações conferem às células um caráter altamente proliferativo e de resistência à morte celular (Kennedy & Barabé, 2008), sendo o subtipo de leucemia desenvolvida dependente do tipo de progenitor celular alterado durante a diferenciação.

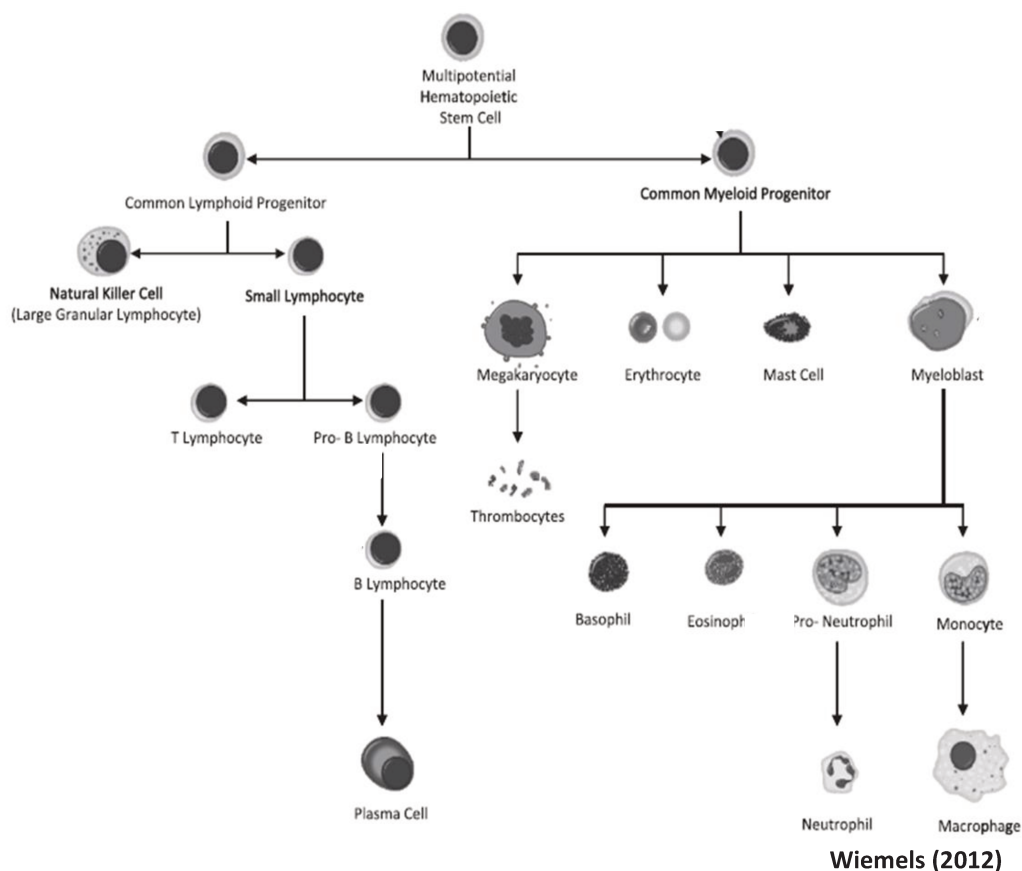


Figura 5: Esquema da diferenciação de células sanguíneas (hematopoiese). A partir de uma célula multipotente são formadas as células tronco de origem mielóide e linfóide. Em passos posteriores de diferenciação as células linfóides geram os linfócitos T e B (à esquerda da ilustração) e os progenitores mielóides geram as demais células presentes no sangue, dentre elas: megacariócito, eritrócito, mastócitos e mieloblastos. (à direita da ilustração).

Segundo dados divulgados pelo INCA (Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro, Brasil) estima-se, para o biênio de 2012-2013, a ocorrência de 4.570 novos casos de leucemia em homens e 3.940, em mulheres (INCA, 2011). Os valores correspondem a um risco estimado de 5 novos casos a cada 100 mil homens e 4 novos casos a cada 100 mil mulheres. Os dados são ainda mais alarmantes na população infantil, onde a leucemia figura como câncer mais comum, correspondendo entre 25-35% dos casos de câncer pediátrico.

Existem algumas causas já conhecidas para o desenvolvimento da leucemia, como a exposição à radiação ionizante e algumas síndromes genéticas congênitas (como *Down*, neurofibromatose e anemia de Falconi), porém esses fatores somados explicam apenas 10% dos casos (Wiemels, 2012). Alguns outros fatores causais, como a exposição ao

benzeno, fumo e quimioterapias, são importantes, exclusivamente, no desenvolvimento da leucemia em adultos (Wiemels, 2012).

Biologicamente, sabe-se que certas mutações e translocações cromossômicas estão associadas ao desenvolvimento da leucemia. Em uma revisão detalhada da bibliografia feita por Milteman, Johansson & Mertens (2007), foram encontradas 264 fusões gênicas, afetando 238 genes diferentes, em desordens hematológicas. Valor que representa 75% de todas as fusões gênicas conhecidas em neoplasias humanas (Milteman, Johansson & Mertens, 2007; Kennedy & Barabé, 2008).

Dentre as alterações mais comumente encontradas nas leucemias estão as mutações na NPM1 (do inglês, *nucleocytoplasmic shuttling protein nucleophosmin*) em 25% dos casos de LMA, perda de função ou deleção do fator de transcrição PAX5 em 30% dos casos de LLA-B e mutações ativadoras no receptor de tirosina quinase FLT3 tanto em leucemias linfoides quanto mieloides (Kennedy & Barabé, 2008).

Apesar do grande número de casos relatados, a ação molecular desses oncogenes resultantes de translocações precisa ser mais bem detalhada. Mesmo com a extensiva caracterização molecular e epidemiológica, a influência desses e de outros oncogenes no desenvolvimento e progressão da leucemia ainda permanece desconhecida (Kennedy & Barabé, 2008).

Sabe-se, hoje, que as translocações encontradas em diferentes neoplasias, e, principalmente nas leucemias, não são suficientes para a transformação das células e o desenvolvimento do câncer (Milteman, Johansson & Mertens, 2007). Muitas translocações descritas nas malignidades hematológicas também são encontradas em pessoas saudáveis e nos pacientes em remissão completa da leucemia. Sendo assim, parece existir a necessidade de eventos secundários, como mutações, para o desenvolvimento dessa doença (Milteman, Johansson & Mertens, 2007).

Vários estudos tem apontado uma importante relação causal entre mutações no evento de *splicing* alternativo e o desenvolvimento da leucemia, apesar de pouco ainda ser conhecido sobre a contribuição das alterações no desenvolvimento da doença (Pekova *et al.*, 2008; Casnici *et al.*, 2009;). Estudos recentes identificaram, usando análise total de genoma e exoma, mutações importantes na maquinaria do spliceossomo em síndromes mielodisplásicas (MDS) e em outras desordens hematológicas (Visconte *et al.*, 2012). A mielodisplasia é caracterizada como um grupo de desordens em células mieloides que alteram a contagem de células do sangue e, frequentemente, aumentam a predisposição ao desenvolvimento de leucemia mieloide aguda (Garcia-Manero, 2012).

A subunidade b1 do fator de *splicing* 3 (SF3), componente da snRNP U2, foi encontrada mutada em 75%-81% dos portadores da MDS, tornando o gene um importante candidato para a patogênese dessa doença (Visconte *et al.*, 2012). Biologicamente, a subunidade b1 de SF3 (chamada de SF3b1) tem importância crucial na ocorrência do *splicing*, já que essa porção é responsável por mediar a ligação de U2 ao sítio do RNAm que será editado (Visconte *et al.*, 2012). Sendo assim, a integridade dessa região seria de fundamental importância e, provavelmente, mutações nessa porção poderiam implicar em uma série de alterações biológicas decorrentes de um *splicing* aberrante.

Mutações em outros componentes da maquinaria de *splicing* também foram descritas em portadores de MDS e de outras doenças hematológicas. Yoshida e colaboradores (2011) foram os primeiros a descrever uma mutação de SRSF2 (mais conhecido como SC35) na mielodisplasia. Além de estar presente na MDS, a mutação aparece com mais frequência na LMC, afetando 28,4% dos pacientes analisados (Yoshida *et al.*, 2011). Mutações em SF2/ASF também foram descritas para MDS, mas com frequência muito menor que aquela observada para SF3b1 e SRSF2 (Visconte *et al.*, 2012).

As alterações encontradas na mielodisplasia e em outras doenças hematológicas, além das demais alterações descritas em diferentes tipos de câncer, dão indícios sobre a importância e influência do evento de *splicing* alternativo para o desenvolvimento de neoplasias, e, mais especificamente, da leucemia. Tendo em vista a importância do *splicing* no contexto biológico e a quantidade de relatos sobre alterações nesse evento em pacientes portadores de distúrbios hematológicos, buscamos, nesse trabalho, avaliar a relação do fator de *splicing* SF2/ASF e das quinases SRPK1 e SRPK2 com a leucomogênese.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Esse estudo teve como objetivo geral estudar a relação entre a maquinaria de *splicing* de RNAm e a oncogênese.

2.2. Objetivos específicos

- ❖ Buscar por alterações no transcrito de SRPK2 em linhagens de células leucêmicas;
- ❖ Quantificar a expressão das SR quinases SRPK1, SRPK2 e CLK1 em diferentes linhagens leucêmicas, buscando associações com as características biológico-clínicas da doença;
- ❖ Analisar o padrão global de *splicing*, por *Exon Array*, de células expressando ectopicamente o fator de *splicing* SF2/ASF a fim de encontrar isoformas diferencialmente expressas que pudessem se correlacionar ao seu caráter oncogênico.

3. Materiais e Métodos

3.1. Cultivo de linhagens leucêmicas

As linhagens de células leucêmicas K562, HL60, KG1, U937, Jurkat, Molt-4, TALL, P12, REH, RS4, 697 e Nalm-6 foram cultivadas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) pH 7,4 suplementados com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células cresceram em suspensão em garrafas de 75 cm², a 37 °C, sob atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

A obtenção e cultivo das linhagens foram realizados em colaboração com o laboratório de Biologia Molecular do Centro Infantil Boldrini e sob a orientação do prof. Dr. José Andrés Yunes.

3.2. Coleta das células, extração de RNA e síntese do cDNA

As células foram peletadas por centrifugação a 1500 rpm (Centrífuga *Eppendorf* 5810R) durante 3 minutos, a 20°C. Cada *pellet* foi lavado 3 vezes com PBS 1X (10 mM fosfato, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7.4), ressuspensionado e separado em alíquotas de 5x 10⁶ células/tubo. A lise celular e a extração do RNA foram realizadas como descrito no protocolo *Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (*GE Healthcare*). 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, além de analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi feita a partir de 1 µg do RNA total utilizando-se o *kit SuperScript First-Strand Kit* (*Invitrogen*). O cDNA sintetizado teve sua qualidade avaliada a partir de uma *Polymerase Chain Reaction* (PCR) com 4 conjuntos de *primers* capazes de amplificar genes com expressão constante e conhecida entre células humanas (controles endógenos).

3.3. Amplificação do cDNA de SRPK2 e sequenciamento

Para a amplificação específica do cDNA de SRPK2, em busca de possíveis alterações genéticas, foram desenhados *primers* capazes de cobrir a sequência do RNAm em pequenas partes, de 600 a 650pb, aumentando a confiabilidade tanto da amplificação quanto do posterior sequenciamento. Os *primers* foram, ainda, desenhados de forma a possibilitar uma sobreposição das porções amplificadas (como mostra a figura 6),

resultando na cobertura total e com alta confiabilidade do cDNA durante o sequenciamento.

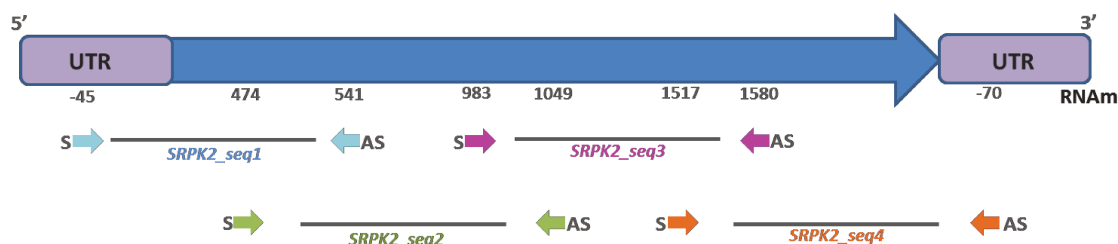


Figura 6: Diagrama esquemático da disposição dos *primers* usados na amplificação e sequenciamento do cDNA de SRPK2 à partir do cDNA total de linhagens leucêmicas. Cada par de *primers* (representados por setas de cores iguais) cobre uma porção de 600 a 650pb dentro da sequência do RNAm do gene. Os pares de *primers* foram sobrepostos por regiões de 50pb (vide distância entre *primers* sense S e antisense AS representados por cores diferentes), permitindo uma cobertura completa no sequenciamento. Essa mesma distância foi considerada para o desenho dos *primers* próximos às regiões 5' e 3' UTRs (do inglês, *UnTranslated Regions*).

Foram usados para a reação de amplificação 2 μ L da enzima DNA polimerase (Biotools); 0,6 μ L dos *primers* sense e antisense a 100 pmol; 0,7 μ L de dNTPs a 10 mM; 2,5 μ L de buffer PCR Buffer 10X (Biotools); 1 μ L do cDNA de interesse e o restante do volume de água, completando 25 μ L. As reações foram incubadas a 95°C por 2 minutos e submetidas a uma desnaturação da fita de DNA a 95°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos com desnaturação a 95°C (1,5 minutos), anelamento a 60°C (2 minutos) e temperatura de extensão de 72°C (2 minutos), finalizando com 5 minutos a 72°C. Em uma segunda etapa de amplificação, a fim de confirmar os resultados obtidos no sequenciamento dos *amplicons*, foi utilizada a *Taq Pfu* (Fermentas/ Thermo Scientific), enzima DNA polimerase com alta fidelidade na incorporação de nucleotídeos.

As amostras foram corridas em gel de agarose 2% e, quando amplificadas no tamanho esperado, purificadas com o kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Quiagen) e enviadas para o sequenciador automático de DNA ABI PRISM 377 *Genetic Analyser* (Applied Biosystems). As amostras que apresentaram *amplicons* inesperados foram purificadas do gel de agarose e clonadas no vetor pGEM-T (Promega) antes de serem enviadas para sequenciamento.

Para a análise primária do eletroferograma obtido utilizou-se o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (versão 8.0) e o programa *ClustalW2 Align*

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) para o alinhamento entre a sequência canônica de SRPK2 e os *amplicons* sequenciados. Uma segunda análise da presença de mutações foi feita utilizando-se o software *Mutation Surveyor* V4. 05 (*Softgenetics, State College, PA, USA*).

3.4. Quantificação por qRT-PCR

A quantificação dos níveis de expressão do RNA das quinases SRPK1, SRPK2 e CLK1 nas linhagens leucêmicas K562, HL60, KG1, U937, Jurkat, Molt-4, TALL, P12, REH, RS4, 697 e Nalm-6 foi feita através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).

Foi utilizado o método de quantificação relativa (RQ), que permite comparar a diferença de expressão dos genes de interesse usando como normalizador um gene constitutivamente expresso, como o GAPDH ou a actina. No caso desse estudo foram escolhidos dois controles endógenos diferentes, o gene beta-2-microglobulina (B2M) e o gene beta-glucuronidase (GUS), a partir dos dados publicados por Beillard e colaboradores (2003).

Primeiramente, foi estabelecida a quantidade de cDNA a ser utilizada para cada amplificação, bem como determinada a eficiência dos *primers*. Para tanto foi construída uma curva de diluição contendo diferentes quantidades de cDNA (no caso, um *pool* dos cDNAs das 12 linhagens estudadas), sendo calculada a eficiência da reação à partir da inclinação (*slope*) resultante da análise gráfica dos pontos da curva de diluição. Somente os *primers* com eficiência próxima ou superior a 100%, calculada pela fórmula $E = 10^{(1/\text{slope})} - 1$, foram utilizados no experimento de quantificação.

Determinada a eficiência de cada *primer* e escolhida a melhor concentração de cDNA para as amplificações, seguiu-se a quantificação por PCR quantitativo em tempo real. Para as reações, montadas em placas de 96 poços e feitas em triplicatas técnicas, utilizou-se 6 µL de *Power SYBR Green PCR Master Mix 2X*, 200 µM de cada *primer* e 1 µL de uma solução contendo cDNA e água. Foram incluídas na mesma placa todas as linhagens cuja quantificação seria comparada, além dos controles endógenos e dos controles de contaminação (NTC – *no template control*).

A corrida foi realizada em um equipamento *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*, seguindo o programa: *hold* de 50 °C por 2 min, *hold* de 90 °C por 10 min e 40 ciclos a 95°C por 15 s, 60°C por 1 min. Finalizada a ciclagem foi realizada a dissociação das fitas de DNA através do aquecimento das amostras a 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 min, 95 °C por 30 s e, finalmente, 60 °C por 15 s.

Os valores de Ct (do inglês, *threshold cycle*), medida de concentração relativa da quantidade de determinado alvo na reação de PCR, resultantes da ciclagem no *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System* foram transportados para o *Microsoft Office Excel* e convertidos em valores de quantificação relativa através da fórmula: $RQ = 2^{-\Delta Ct} \times 100$. Sendo o valor de ΔCt obtido pela subtração do valor de Ct da sequência de interesse pela média dos valores de Ct dos controles endógenos utilizados no estudo.

3.5. Clonagem do cDNA de SF2/ASF no vetor pcDNA-FLAG

Como primeira etapa para o experimento de superexpressão de SF2/ASF em células HEK293T foi necessária a amplificação de sua sequência de cDNA, à partir de bibliotecas de cDNAs, e sua subclonagem em um vetor de expressão.

Tanto o isolamento do cDNA de SF2/ASF, à partir de uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano (Clontech), quanto a subclonagem no vetor de expressão em células de mamífero pcDNA-FLAG foram feitas pela Dr. Juliana Smetana, nas instalações do Laboratório Nacional de Biociências.

O vetor de expressão pcDNA-FLAG é uma modificação do vetor comercial pcDNA3 (Invitrogen) feita no Laboratório Nacional de Biociências. O vetor modificado apresenta a inclusão de um epítipo FLAG próximo ao promotor T7, como mostra a Figura 7, permitindo que a proteína de interesse, quando expressa na célula, possa ser reconhecida por anticorpos contra esse epítipo. Sendo assim, ensaios de envolvimento de anticorpos, como *Western Blotting* e microscopia de imunofluorescência, podem ser realizados sem a necessidade de anticorpos específicos para a proteína de interesse.

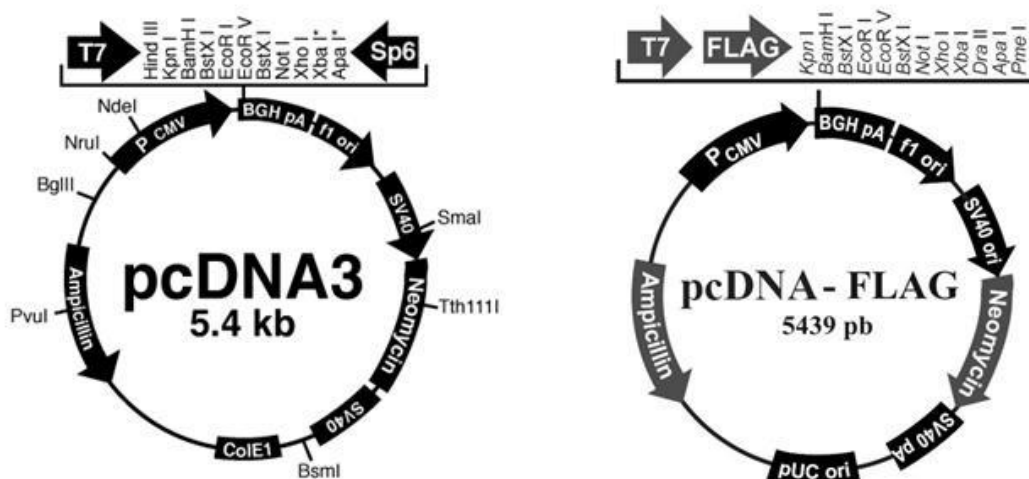


Figura 7: Comparação dos mapas dos vetores pcDNA3 (Invitrogen), à esquerda, e do seu derivado, o vetor pcDNA-FLAG. A figura mostra a inserção do epítipo FLAG, após o promotor T7, no vetor pcDNA-FLAG e a modificação de alguns sítios de restrição.

3.6. Transfecção de células HEK293T

Feita a clonagem da sequência no vetor pcDNA-FLAG, foi realizada a transfecção das células HEK293T com o vetor plasmidial contendo SF2/ASF e com o vetor vazio, que serviria como controle negativo do experimento de *Exon Array*.

A transfecção dessas células, que forneceriam o RNA necessário para o experimento de *Exon Array*, foi feita em garrafas de 75 cm², em triplicatas biológicas. As células, cultivadas até atingirem a confluência de 80%, foram transfectadas utilizando o reagente PEI (*Polyethyleneimina*), polímero catiônico que carrega o DNA mediante interação com sua carga negativa, similarmente ao mecanismo do reagente *Lipofectamine* (Invitrogen).

Para a transfecção foram misturados 200 µL de uma solução de NaCl 150 mM a 5 µg de DNA e, posteriormente, acrescentados 17 µL de PEI. A mistura foi incubada por 30 minutos e adicionada a cada garrafa, que durante a incubação tiveram seu meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) trocado por meio novo.

3.7. Coleta e lise celular para análise por Western Blotting

Após 48 horas, as células transfectadas foram desprendidas das garrafas e peletadas por centrifugação a 1500 rpm (Centrífuga *Eppendorf* 5810R), durante 3 minutos,

a 20°C. Os *pellets* foram lavados 3 vezes com 15 mL de PBS 1X pH 7,4 (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂PO₄; 1,4 mM KH₂PO₄). As células lavadas foram divididas em 2 alíquotas, uma para análise da expressão da proteína, por *Western Blotting*, e a outra usada para a extração do RNA total.

A lise das células usadas para verificação da expressão de proteínas foi realizada seguindo o protocolo descrito por Nikolakaki e colaboradores (2001).

3.8. Imunoprecipitação e Western Blotting

Para análise da superexpressão de SF2/ASF em células HEK293T por *Western Blotting* foi, primeiramente, realizada a imunoprecipitação das alíquotas resultantes da extração de proteínas.

A imunoprecipitação foi realizada a partir da incubação da proteína G Sepharose (GE Healthcare) com o anticorpo anti-FLAG (Invitrogen), seguida pela incubação com as proteínas extraídas da célula HEK293T lisada. Com esse procedimento foi possível concentrar e isolar somente as proteínas que continham o epítipo FLAG, que, no caso, seriam aquelas expressas a partir do plasmídeo pcDNA-FLAG.

Feita a imunoprecipitação, a análise da superexpressão de SF2/ASF-FLAG foi realizada por *Western Blotting*, usando anticorpo contra o epítipo FLAG. A Figura 18 na seção 4.3 dos Resultados e Discussão mostra o resultado dessa análise.

3.9. Extração de RNA e análise da sua qualidade

Confirmada a superexpressão da proteína SF2/ASF nas triplicatas de células HEK293T, como mostra a Figura 18, seguiu-se com a extração de RNA total. A extração, feita a partir das alíquotas indicadas na seção 3.7, foi realizada utilizando-se o *kit RNeasy* (Qiagen), indicado pela empresa *Affymetrix* (que produz os *chips* de *Exon Array*) devido à pureza e rendimento obtidos.

Os RNAs extraídos foram quantificados e avaliados 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 utilizando o *NanodropTM Spectrophotometer*. A análise de qualidade foi complementada com o *Agilent 2100 Bioanalyser RNA 6000 Nano chip*, ferramenta que possibilita a análise eletroforética do RNA somada à sua quantificação e medida da razão de RNA ribossomal.

Essa ferramenta tem como principal vantagem a avaliação da qualidade e integridade do RNA total por valores numéricos, expressos pelo fator RIN (do inglês, *RNA Integrity Number*), impedindo interpretações individuais errôneas e subjetivas. Os valores de RIN são determinados pela integridade do RNA ribossomal submetido a uma eletroforese em gel que é feita dentro do *chip*. O RNA mais íntegro, cujo valor de RIN está próximo a 10, deve apresentar bandas nítidas correspondentes às subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal e ausência de degradação (caracterizada pela presença de rastros durante a migração no gel).

Tanto para os RNAs extraídos das triplicatas de superexpressão de SF2/ASF-FLAG quanto os RNAs oriundos das triplicatas controle apresentaram valores de RIN superiores à 9,8. A Figura 19 na seção 4.3 dos Resultados e Discussão mostra o resultado da eletroforese feita através do *Agilent 2100 Bioanalyser RNA 600 Nano chip*.

3.10. Experimento de Exon Array: síntese do cDNA e hibridização dos chips

O RNA total das células HEK293T, cuja qualidade foi analisada e confirmada, foi utilizado para a síntese da primeira e segunda fitas do cDNA, realizada através do *WT Expression Kit* (Ambion) segundo as descrições do fabricante.

A fita *sense* de cDNA resultante foi fragmentada e teve sua porção terminal 3' marcada com biotina de acordo com o protocolo descrito no *WT Terminal Labeling Kit* (Affymetrix). Os fragmentos resultantes foram usados para a hibridização dos *chips* de *Exon Array*, realizada de acordo com as indicações do *Hibridization Control Kit* (Affymetrix) e *Hibridization Wash and Stain Kit* (Affymetrix).

Maiores detalhes sobre os procedimentos de síntese de cDNA, fragmentação, marcação, hibridização e lavagem dos *chips* podem ser encontrado no site da Affymetrix (<http://www.affymetrix.com/estore/>), fabricante dos *Exon Arrays*.

3.11. Experimento de Exon Array: escaneamento e análise primária dos dados

As etapas finais de lavagem e escaneamento dos *arrays* foram realizadas em uma estação fluídica (*Fluidic Station 450*), operada através do *Affymetrix GeneChip Command Console* (AGCC). Durante essa etapa foram feitas as primeiras análises de qualidade do *chip* pela verificação da ocorrência da hibridização e também de sua especificidade, observadas a partir da imagem escaneada.

A AGCC fornece, ao escanear os *chips*, dados de intensidade (brilho) das *probes* representadas no *array*. No caso do *Exon Array* cada *probe* representa um *exon*, que no *chip* de *Exon Array* é interrogado 4 vezes, ou seja, cada *probe set* representa a interrogação de um mesmo *exon* 4 vezes.

A análise pelo AGCC fornece dados de intensidade no formato *.CEL*, que correspondem à transformação numérica das intensidades de luz capturadas durante o escaneamento. Esses dados são normalizados e convertidos, já utilizando o *Affymetrix Expression Console Software 1.2*, em arquivos *.CHP*.

O *Affymetrix Expression Console Software 1.2* é uma ferramenta que permite a análise primária dos dados presentes no *chip* e a análise estatística das correlações de intensidade entre os *chips* utilizados no experimento. Todas essas análises se baseiam na sumarização dos dados de intensidade, que passam do formato *.CEL para .CHP*, através da utilização de dois algoritmos: RMA (*Robust Multichip Analysis*) e PLIER (*Probe Logarithmic Intensity Error Estimation*).

Os dois algoritmos tem como função a conversão dos valores de intensidade de cada *probe* em apenas um único valor, que corresponderá ao valor da *probe set*. Essa conversão é, inicialmente, dependente da quantidade de *background* (ruído) presente na hibridização. Ou seja, para que os dados de expressão sejam fidedignos e não sejam superestimados pela ocorrência de hibridização inespecífica, os valores de ruído devem ser descontados (Okoniewski & Miller, 2008).

O algoritmo RMA, de forma simplificada, trabalha apenas com a análise da hibridização correta (*Perfect Match – PM*), que é dependente da quantidade de material e sua afinidade pela sequência de cDNA presente no *array*, levando em consideração no cálculo um “fator de erro”. Já o algoritmo PLIER trabalha com a relação de hibridização correta e hibridização errônea (*Mismatch – MM*), que, no caso, é calculada pela quantidade de amostras que se hibridizam a *spots* do *chip* que contém sequências propositalmente alteradas (mutadas), permitindo o cálculo do ruído presente na análise por essas ligações inespecíficas (Okoniewski & Miller, 2008).

Como o *Exon Array* não possui *spots* contendo MM, a sumarização dos dados obtidos nesse trabalho foi feita com o algoritmo RMA (Okoniewski & Miller, 2008). Após a sumarização, cada *chip* foi analisado individualmente quanto o sucesso de sua hibridização. Para tanto, ainda utilizando o *Affymetrix Expression Console Software 1.2*, foram verificados diferentes controles de qualidade, como: controle de hibridização; de marcação (*labeling*) e controles internos (*housekeeping controls*).

Além dessa análise foram realizadas análises estatísticas de correlação linear para comparar o sinal estimado para cada conjunto de *chips*. Ou seja, nessa análise, onde é avaliada a similaridade de intensidade observada em cada *chip*, espera-se que *chips* pertencentes ao mesmo conjunto de triplicatas sejam mais semelhantes entre si do que à outra triplicata.

Tanto a análise dos controles de hibridização quanto à análise da correlação de valores de intensidade entre os *chips* indicaram uma maior similaridade entre os *chips* pertencentes a cada subgrupo. Ou seja, como era esperado, o padrão de intensidade entre as triplicatas correspondentes à superexpressão de SF2/ASF-FLAG era mais semelhante entre si do que semelhantes à triplicata controle (FLAG-vazio).

3.12. Experimento de Exon Array: clusterização hierárquica

Feitas as análises primárias de qualidade e similaridade entre os *chips*, foi realizada a clusterização hierárquica dos dados.

A clusterização hierárquica é o método mais popular de análise dos dados de expressão de experimentos de microarranjo. Nessa análise, genes com padrão de expressão similar são agrupados e conectados por uma série de “braços”, chamados de árvore de clusterização ou dendrograma.

Além do agrupamento de genes, a clusterização também agrupa experimentos (ou *chips*) que tenham um padrão similar de expressão entre as amostras. Sendo assim, com a finalidade de comprovar a similaridade de expressão entre os *chips* de cada triplicata, já demonstrada utilizando o *Expression Console*, foi utilizado o *software dCHIP* (Li & Wong, 2001). O resultado da clusterização das triplicatas de microarranjo está indicado na Figura 20 na seção 4.3 dos Resultados e Discussão.

3.13. Experimento de Exon Array: gene level analysis X exon level analysis

Feitas todas as análises de controle de qualidade e comprovada a similaridade de expressão entre os *chips* pertencentes à mesma triplicata, seguiu-se com a análise dos resultados dos *Exon Arrays*.

Diferentemente dos demais arrays, que avaliam apenas a expressão diferencial de genes, o *Exon Array* permite análises em duas frentes: *gene level* e *exon level*. A *gene level analysis* se assemelha ao nível de análise existente nos demais tipos de *array*. O algoritmo

usado nesse nível de estudo sumariza os dados de todas as *probes* de um mesmo transcrito, ou seja, fornece dados sobre a expressão diferencial do gene.

Já na *exon level analysis* a sumarização ocorre apenas para as *probes* do mesmo *exon*, ou seja, os sinais obtidos para esse nível de estudo apontam o valor de cada *exon* do transcrito de forma individual. É na *exon level analysis*, por permitir a visualização dos eventos de *splicing*, que está o grande diferencial e a vantagem de se fazer uso de *Exon Array* em análises de *splicing* global. Nesse contexto vale ressaltar que os resultados apresentados nesse trabalho compreendem apenas a *gene level analysis*, sendo, portanto, uma análise primária e ainda carente de maiores confirmações e aprofundamento.

Todas as análises *gene level* dos dados de *array* foram realizadas na Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp em colaboração com a Dr^a Cristiane S. Rocha.

4. Resultados e Discussão

4.1. Busca por alterações no transcrito de SRPK2 em linhagens leucêmicas

Dados de Jang e colaboradores (2008) dão importantes indícios sobre a relevância da quinase SRPK2 para o desenvolvimento e progressão da leucemia. Os autores demonstraram a relevância de SRPK2 para a proliferação da linhagem leucêmica K562 que, ao ser tratada com RNA de interferência para SRPK2, apresentou diminuição significativa em sua taxa de crescimento. Além disso, foram encontradas alterações na sublocalização da quinase em células linfóides e sua expressão aumentada em determinadas linhagens leucêmicas de origem linfóide e mieloide, bem como em pacientes portadores de LMA.

Apesar das interessantes observações de Jang e colaboradores (2008) pouco se sabe sobre as possíveis causas das alterações de expressão e sublocalização da proteína SRPK2. Sendo assim, em busca de possíveis modificações na sequência de SRPK2 que pudessem se relacionar a esse quadro de alteração, partimos para o sequenciamento do seu RNAm em uma série de linhagens leucêmicas. O objetivo dessa análise foi avaliar se os eventos descritos pelos autores citados acima teriam como pano de fundo algum tipo de mutação na sequência de SRPK2 que pudessem implicar na alteração do seu endereçamento dentro da célula, de sua atividade quinase ou expressão.

Foram escolhidas para essa análise por sequenciamento 12 linhagens leucêmicas diferentes, compreendendo linhagens de origem mieloide, linfóide derivada de célula T e linfóide derivada de célula B. A Tabela 1 mostra as linhagens escolhidas para a análise e também o tipo celular do qual são derivadas.

Tabela 1: Linhagens utilizadas para análise de mutações na sequência gênica de SRPK2.

Linhagem	Linhagem Leucêmica
K562*, HL60*, KG1* e U937*/**	Mieloide
Jurkat, Molt-4, TALL e P12	Linfóide de célula T
REH, RS4, 697 e Nalm-6	Linfóide de célula B.

**Linhagens estudadas por Jang e colaboradores (2008).*

***Linhagem celular de origem mieloide isolada a partir de linfoma.*

A análise do RNAm foi realizada através da síntese de DNAs complementares (cDNAs) presentes nas linhagens leucêmicas, seguida da amplificação, por *Polymerase Chain Reaction* (PCR), do cDNA de SRPK2.

Devido a divisão das regiões amplificadas em porções de 600 a 650pb, SRPK2, cuja isoforma canônica possui 2067pb, teve seu cDNA amplificado em 4 porções distintas (maiores detalhes sobre os *primers* podem ser encontrados na seção 3.3 do Material e Métodos). Essas porções foram denominadas de acordo com a posição de anelamento dos *primers*, sendo a região mais próxima à porção 5' UTR denominada de *SRPK2_seq1* e a mais próxima à região 3' UTR chamada de *SRPK2_seq4* (Figura 6).

Como mostra a Figura 8, a amplificação das regiões *SRPK2_seq1*, *SRPK2_seq2* e *SRPK2_seq3* ocorreu no tamanho esperado de, aproximadamente, 600pb. Já na região *SRPK2_seq4* pode ser observada, além da banda esperada de 600pb, a amplificação de duas outras bandas, uma de menor tamanho (aproximadamente 450pb) e outra de maior tamanho (aproximadamente 700pb), indicadas pelas pontas de seta.

Nenhuma mutação foi encontrada para as porções *SRPK2_seq1*, *SRPK2_seq2* e *SRPK2_seq3* após análise por sequenciamento dos *amplicons* obtidos na amplificação das 12 linhagens estudadas. Porém, o padrão diferencial de amplificação da porção *SRPK2_seq4* poderia ser um indício da presença de isoformas do gene de SRPK2 nas linhagens de leucemia. A Figura 9 mostra a repetição da amplificação da porção *SRPK2_seq4*, usando uma enzima DNA polimerase de alta fidelidade.

Buscando analisar o tipo de alteração que resultou na amplificação de produtos com 450pb e 700pb, foi feita a clonagem dos *amplicons* obtidos a partir das linhagens U937, P12 e RS4 no vetor pGEM-T (Promega). Os clones positivos, dois a três por linhagem, foram sequenciados e alinhados usando o programa *Mult Alin* (Corpet, 1988). As Figuras 10 e 11 mostram o resultado do alinhamento apenas para os *amplicon* de 450pb e 700pb obtidos a partir do cDNA da linhagem RS4, já que o mesmo resultado foi encontrado para os *amplicons* oriundos das linhagens U937 e P12.

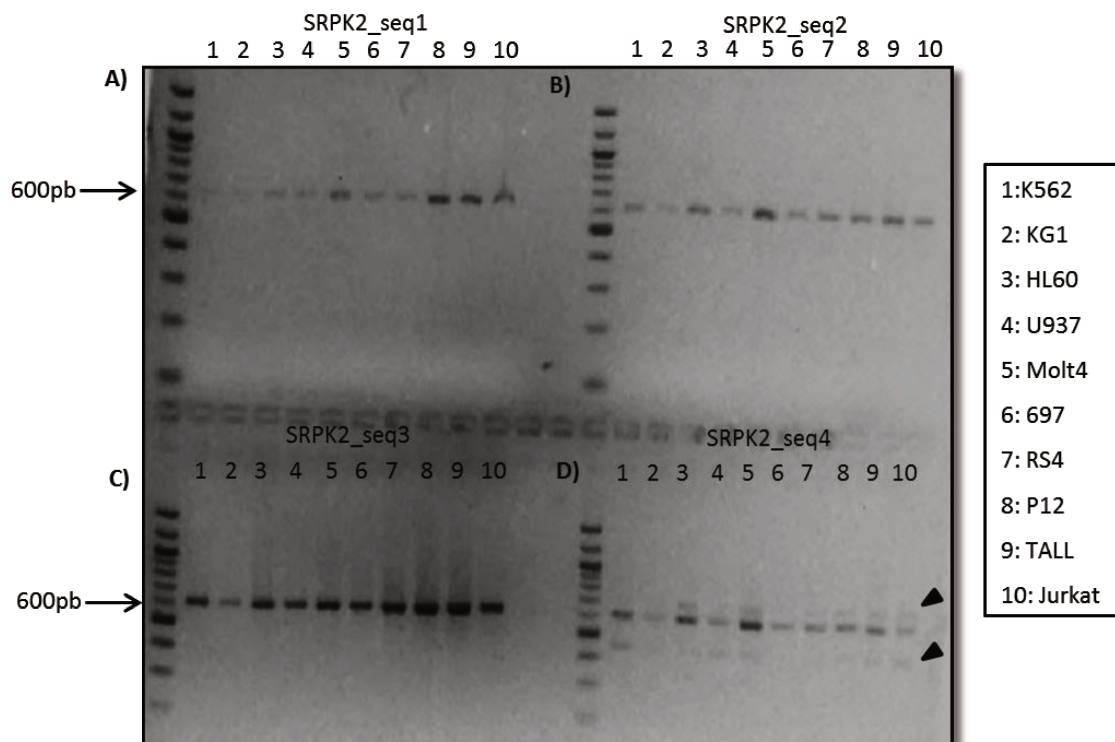


Figura 8: Resultado da amplificação do cDNA de SRPK2 em linhagens leucêmicas. Os diferentes quadrantes mostram o resultado das amplificações do cDNA das linhagens usando 4 pares de *primers* distintos (esquematizados na seção 3.3 dos Materiais e Métodos). Todo o transcrito de SRPK2 foi amplificado em quatro fragmentos de tamanho aproximado de 600-650bp. Bandas extras são observadas no quadrante D (altura indicada pelas pontas de seta pretas), indicando a presença de possíveis isoformas do gene. Cada um dos poços, numerados de 1 a 10, corresponde a uma das linhagens. As linhagens Nalm6 e REH não se encontram nesse gel por terem sido amplificadas previamente (resultado não mostrado).

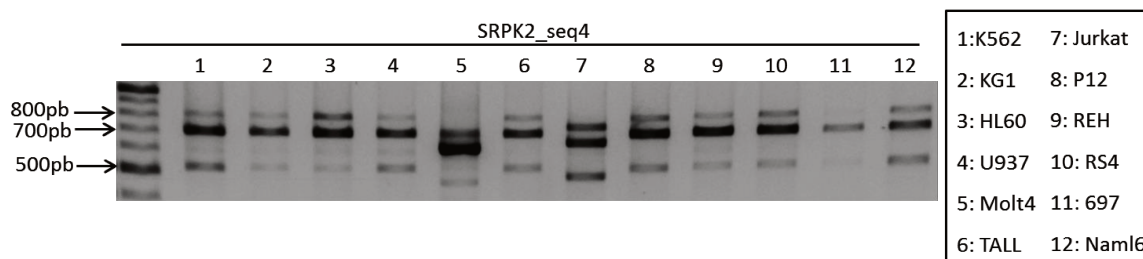


Figura 9: Resultado da nova amplificação da porção SRPK2_seq4 a partir do cDNA de linhagens leucêmicas. Foi realizada uma nova reação de amplificação da porção SRPK2_seq4 a fim de confirmar os resultados obtidos (Figura 8) e permitir a extração das bandas do gel de agarose para posterior purificação e clonagem do DNA. Para aumentar a fidelidade entre a sequência amplificada e o cDNA de origem foi usada uma enzima DNA polimerase com baixa taxa de erro na replicação do DNA.

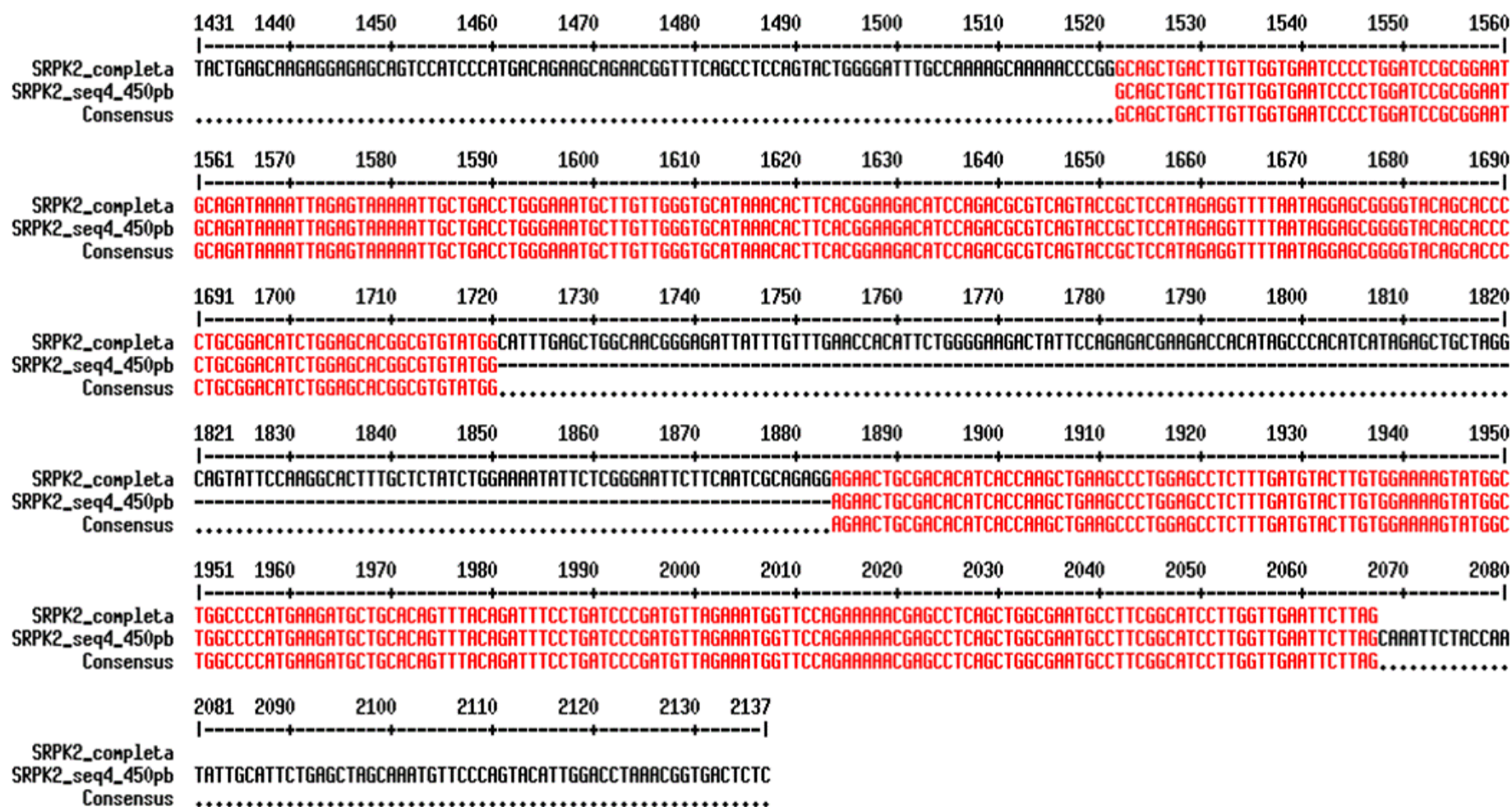


Figura 10: Alinhamento da sequência canônica de SRPK2 com o *amplicon* de 450pb obtido durante a amplificação do cDNA da linhagem leucêmica RS4. A figura mostra o resultado do sequenciamento do *amplicon* de 450pb obtido à partir da amplificação da porção *SRPK2_seq4* do cDNA de SRPK2. O alinhamento corresponde à porção final da sequência de SRPK2, sendo possível observar a similaridade entre as sequências consenso do gene e do *amplicon* de 450pb nas regiões entre as bases 1522 à 1720 e 1884 à 2067 (ambas as regiões marcadas em vermelho). Entre as bases 1721 e 1883 pode ser percebida a perda de similaridade, causada pela deleção de 163pb (em preto) da sequência canônica. Vale ressaltar que o mesmo resultado foi obtido para as linhagens U937 e P12 .

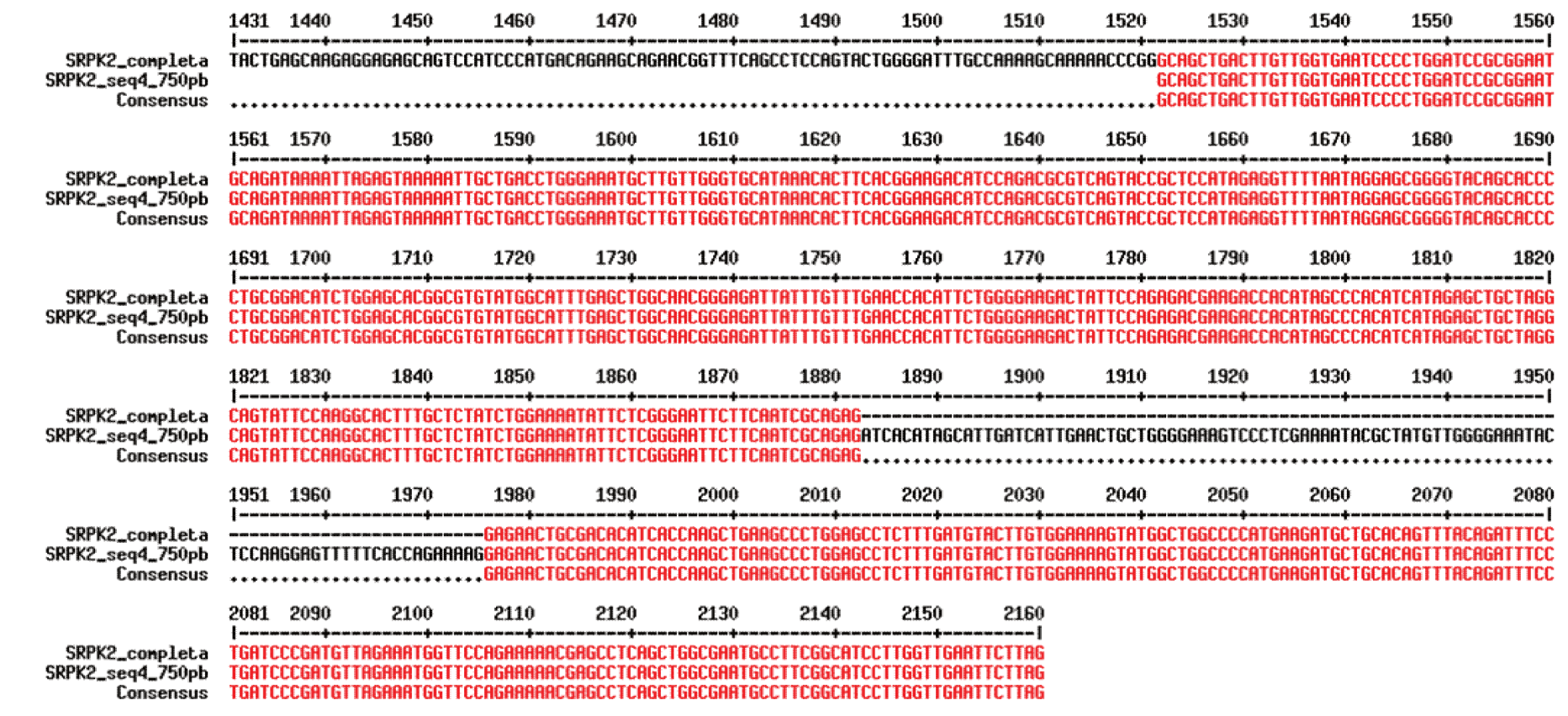


Figura 11: Alinhamento da sequência canônica de SRPK2 com o *amplicon* de 700pb obtido durante a amplificação do cDNA da linhagem leucêmica RS4. A figura mostra o resultado do sequenciamento do *amplicon* de 700pb obtido à partir da amplificação da porção *SRPK2_seq4* do cDNA de SRPK2. O alinhamento corresponde à porção final da sequência de SRPK2, sendo possível observar a similaridade entre as sequências consenso do gene e do *amplicon* de 700pb nas regiões entre as bases 1522 à 1882 e 1976 à 2160 (ambas as regiões marcadas em vermelho). Entre as bases 1883 e 1975 pode ser percebida a perda da similaridade, causada pela inclusão de 93 bases diferentes (em preto) da sequência canônica. Vale ressaltar que o mesmo resultado foi obtido para as linhagens U937 e P12 .

Pode ser observado no alinhamento das sequências, respectivamente, a perda de 163 bases no *amplicon* de 450pb e a adição de 93 bases no *amplicon* de 700pb. Como mostrado na Figura 12, essas alterações comprometem a distribuição dos *exons* de SRPK2. Através da análise da sequência dos *exons* presentes no RNAm de SRPK2 pode ser constatada a perda dos *exons* 13 e 14, da sequência de 450pb, e a introdução de 93pb entre os *exons* 14 e 15 da sequência de 700pb (Figura 12).

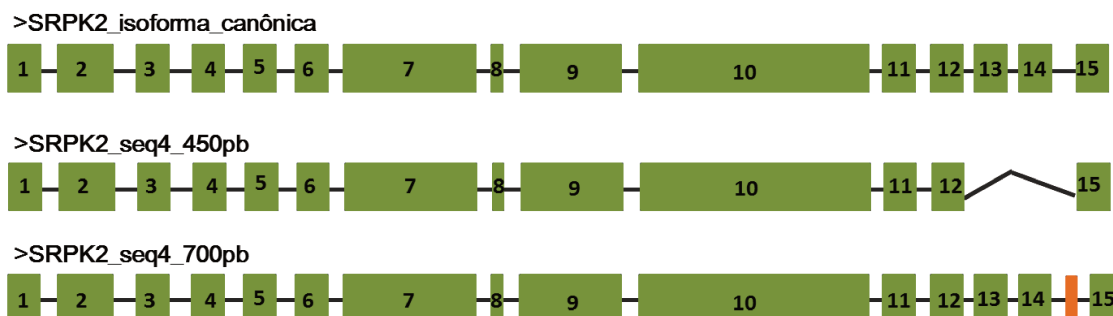


Figura 12: Representação esquemática da distribuição dos *exons* nas sequências canônica de SRPK2 e nos *amplicons* obtidos. A isoforma canônica de SRPK2, cujo RNA mensageiro possui 2067 bases, é composta por 15 *exons*. A figura mostra a perda de 163 bases no *amplicon* SRPK2_seq4_450pb, que correspondem aos *exons* 13 e 14 e resultam no RNA mensageiro formado por 1904 bases. Já o *amplicon* SRPK2_seq4_700pb apresenta a inserção de uma nova sequência (em laranja) entre os *exons* 14 e 15, resultando no aumento da sequência de RNA mensageiro para 2160 bases.

O padrão de alteração observado para o *amplicon* de 450pb, levando a perda dos *exons* 13 e 14, parece característico da ocorrência de *splicing* alternativo. Já que esse fenômeno, ao promover o processamento do pré-RNAm, pode levar a exclusão de partes consideráveis da sequências, correspondendo à perda de *exons*.

Apesar do *splicing* alternativo também ser responsável pelo aumento da sequência de RNAm, seja por inclusão de novos *exons* ou retenção de *introns*, a inclusão de 93 bases na sequência do *amplicon* de 700pb poderia estar relacionada a outros fenômenos de alteração do genoma.

Sabe-se que diversos eventos, muitos deles importantes para a evolução genômica e para o aumento da variabilidade genética, são caracterizados pela inserção de novas sequências no genoma (Chénais *et al.*, 2012). Os *transposons*, sequência de DNA ou RNA que podem se mover livremente no genoma e se inserir entre genes, são os principais causadores de alterações de sequências do genoma, sendo, também, uma das possíveis origens dos *introns* eucarióticos (Chénais *et al.*, 2012; Yenerall & Zhou, 2012). Além desse

fenômeno, as variações observadas nos *amplicons* de SRPK2 também poderiam se relacionar a translocações e fusões cromossômicas, bastante comuns em leucemias. Esses dois fenômenos também são capazes de alterar o genoma da célula, produzindo transcritos híbridos e gerando proteínas aberrantes (Milteman, Johansson & Mertens, 2007; Kennedy & Barabé, 2008).

A fim de buscar a origem da região inserida na porção final da quinase SRPK2 foi utilizada a ferramenta BLAST (do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*), presente na plataforma NCBI (do inglês, *National Center for Biotechnology Information*). A análise por BLAST indicou uma alta similaridade entre a sequência inserida e regiões do cromossomo 7 humano, onde o gene de SRPK2 está localizado.

Os resultados obtidos usando o BLAST levaram a busca pela região do próprio cromossomo 7 que seria retida e, conseqüentemente, seria responsável pelo padrão inesperado da amplificação de SRPK2 a partir do cDNA de linhagens leucêmicas. Interessantemente, os resultados desses alinhamentos indicaram como origem da porção de 93pb (Figura 12) o *intron* existente entre os *exons* 14 e 15, como mostra a Figura 13. Desse modo, a alteração encontrada para o transcrito de 700pb corresponderia também a uma modalidade de *splicing* alternativo, aquela que causa retenção de *introns* durante a edição do pré-RNAm.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
SRPK2_intron_14-15		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SRPK2_intron_14-15	GTAGTACCTCTTCTTTTGAAGAGCGCCACGATGCAGACAGAACTGAAGAGCAGCTGCTGATTTTAGCATTAAATGGTGACAAAGGCATTTCTCTAAATTCGAACGCAACCCAGCAGAAATTCCTATGC													
SRPK2_intron_14-15														
SRPK2_intron_14-15	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
SRPK2_intron_14-15		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SRPK2_intron_14-15	TGATAGAAAATTGTGAGGAGACACATTTAGCCCTGTGCTGCGGTACCCCTGTTCCAGCCCCCTCTCTGTGCCCTCCAGCTCTGGATCCTGAATCCAGCAACGCGAGGAGGCTGTACTTTTGG													
SRPK2_intron_14-15														
SRPK2_intron_14-15	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
SRPK2_intron_14-15		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SRPK2_intron_14-15	TCATTCAAGTTGCGCTCTGTTTCTGTCTGCGCGGGCGGTGGTAGTGCTGCATGCAGTGACTGATTAACTGTCGTGTGTTTCTGTTTGTGGCAATGTTTCCCAATGCA													
SRPK2_intron_14-15														
SRPK2_intron_14-15	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
SRPK2_intron_14-15		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SRPK2_intron_14-15	ATTGAAGTCTGGGGAAGTCCCTCGAAATACGCTATGTTGGGGAATACTCCAGGAGTTTTTCACCAAGAAA													
SRPK2_intron_14-15														
SRPK2_intron_14-15	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
SRPK2_intron_14-15		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SRPK2_intron_14-15	AATTGTGCATTCTGTGATTGGGAGTGGAGAAAGATCTGGAGTTTCACAACTGGGGATTCTCCGAGGAAGCTCTCAGGAATAAACCTGACCATCTGATACCTGGAGTAAGATTTGTAGAGAAC													
SRPK2_intron_14-15														
SRPK2_intron_14-15	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
SRPK2_intron_14-15		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SRPK2_intron_14-15	AGCCTTCCTAACAGCATTTTTCTCTCCGCTTCTCTTTTACTCCAGTTACCAATCTGTATATTATTTATAAAAGGAGTTAGGTGATTGTTAAAGCCAGCTAGACTTATCTTTCCATTTTCATG													
SRPK2_intron_14-15														
SRPK2_intron_14-15	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
SRPK2_intron_14-15		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SRPK2_intron_14-15	GACTCTCTGTAGTAGAACAGAGGTGGCTAGAGACTGGACTTAGGGACGTCAGGGACATTGCTTTTGGTCTGCTGGGTTATTTCTGTAGTGGGTGTAGGCTGTGAATGCTGCGTACCTCACATTC													
SRPK2_intron_14-15														
SRPK2_intron_14-15	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
SRPK2_intron_14-15		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SRPK2_intron_14-15	TTAAATGACATCTACATTCCTATTCCTATGTTATGCCACACTGTATTAGGTGATTATTTTCATGTTGTAGTTCTTACTGATCTTCAACTGTTTATTGCCCAGTATAGTCCCAGTTAGTAATTATA													
SRPK2_intron_14-15														

Figura 13: Alinhamento da sequência genômica de SRPK2 com a sequência de 93pb inserida na região *SRPK2_seq4*. A figura mostra o resultado do alinhamento entre a sequência do *intron* presente entre os exons 14 e 15 (*intron 14*) da sequência genômica de SRPK2 e a porção de 93pb inserida entre os exons 14 e 15 da sequência de SRPK2 amplificada a partir do cDNA de linhagens leucêmicas. A inserção está presente na porção denominada *SRPK2_seq4_700pb*.

Essa modalidade de *splicing* parece estar relacionada ao desenvolvimento de doenças, por, em muitos casos, resultar na perda de funcionalidade da proteína. A retenção de *introns* de um RNAm pode levá-lo à vias de degradação e resultar na diminuição da expressão de genes importantes, como supressores tumorais e genes relacionados ao metabolismo celular (Maciejewski & Padgett, 2012). Funcionalmente, essa degradação mediada por erro no *splicing* alternativo de um determinado RNAm equivale à haplossuficiência de um gene ou sua inativação, sendo, em muitos casos, bastante prejudicial à homeostase celular (Maciejewski & Padgett, 2012).

Os RNAs dotados de sequências intrônicas seriam levados à degradação, ainda no núcleo, pela instabilidade de suas sequências ou pela presença de *stop codons* precoces. Nesse último caso a degradação do RNAm defeituoso ocorreria pela via de *Nonsense-mediated Decay* – NMD (Kervestin & Jacobson, 2012). Essa via de degradação tem função de impedir que RNAs defeituosos e que não levam a informação total para a tradução de uma proteína sejam traduzidos e possam, porventura, causar danos à célula ou organismo (Kervestin & Jacobson, 2012).

Análises *in silico* mostram que, aparentemente, a retenção parcial do *intron* 14 no *amplicon* de 700pb não resulta na inserção de um *stop codon* precoce. A análise de *frame* de leitura, feita através da plataforma *ORF Finder* (NCBI), mostra (Figura 14) o não truncamento da proteína produzida após a retenção parcial do *intron*, indicando, possivelmente, tratar-se de uma isoforma funcional e que, em princípio, não seria degradada pela via de NMD.

Já na sequência de 450pb, surpreendentemente, foi observada a alteração do *frame* de leitura do RNAm após a deleção dos *exons* 13 e 14, resultando na inclusão de um *stop codon* precoce e na perda do *exon* 15. Apesar de não se saber se a isoforma resultante da deleção dos *exons* 13, 14 e 15 seria traduzida quando expressa *in vivo*, já que o RNAm poderia ser degradado pela via NMD, foi feita a análise da provável sequência da proteína formada, como mostra a Figura 14.

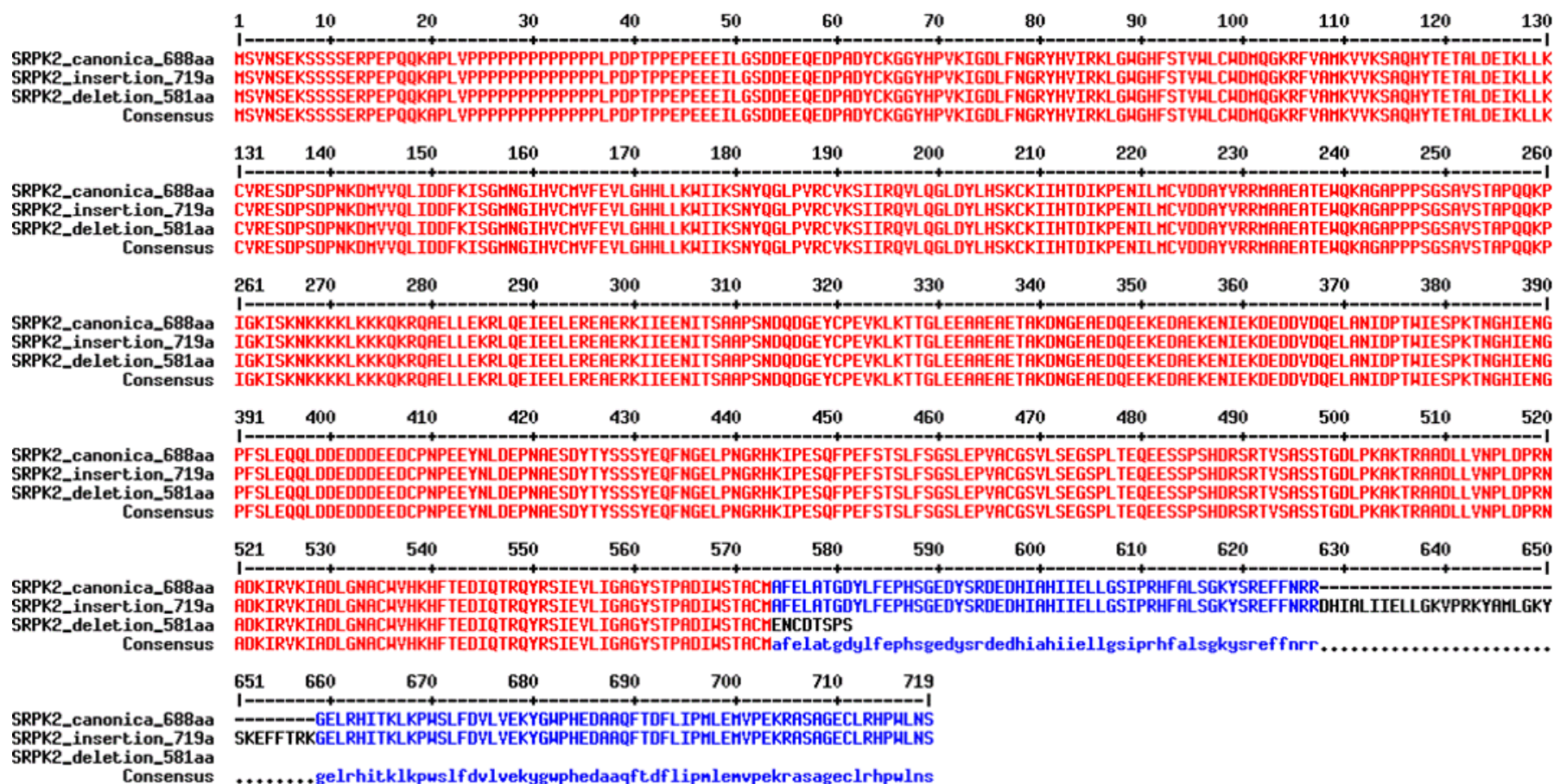


Figura 14: Alinhamento entre as sequencias de proteína SRPK2 canônica e as sequencias resultantes das isoformas amplificadas à partir do cDNA de linhagens leucêmicas. Foram alinhadas, na figura, a sequencia canônica de SRPK2, que contém 688aa e as sequencias resultantes da alteração do RNAm de SRPK2 descritas nesse trabalho. As novas isoformas foram traduzidas e tiveram seu *frame* de leitura analisado através do programa *ORF Finder*. Pode ser percebida a inclusão dos aminoácidos 628 a 658 na sequencia correspondente ao *amplicon* de 700pb (resultando em uma proteína com 719aa) e a deleção dos aminoácidos posteriores ao aminoácido 574 na sequencia correspondente ao *amplicon* de 450pb (resultando em uma proteína com 581aa).

Buscando traçar uma possível relação entre as isoformas encontradas e o possível prejuízo na atividade da proteína traduzida, seguiu-se com a análise dos domínios da proteína que seriam afetados pelas alterações descritas. Primeiramente, foi utilizada a *Conserved Domain Database* (plataforma do NCBI), recurso que permite a anotação funcional dos domínios de uma proteína através da análise da sua similaridade com os domínios depositados no banco de dados (Marchler-Bauer *et al.*, 2013).

A análise, feita através da *Conserved Domain Database* (CDD), apontou as porções entre os aminoácidos 80 a 220 e 500 e 550 como as regiões de localização dos sítios de ligação a ATP e a substratos (Figura 15). Estando localizado, ainda na região entre os aminoácidos 500 e 550, o *loop* de ativação de SRPK2, estrutura importante para a ancoragem e fosforilação de substratos (Nolen, Taylor & Gosh, 2004). Os dados obtidos na plataforma estão de acordo com os estudos de Wang e colaboradores (1998) que descreveram, pela primeira vez, a quinase e apontaram seus domínios funcionais.

Analisando-se a localização dos domínios de SRPK2, através da sequência de aminoácidos, pode-se inferir que as alterações encontradas nesse trabalho não afetariam diretamente a região. Isso porque a deleção dos *exons* 13 a 15 e a retenção de parte do *intron* 14 ocorrem, respectivamente, a partir do resíduo 574 e nos resíduos 628 a 658.

Entretanto, a análise da estrutura cristalográfica de SRPK2 (depositada por Pike e colaboradores em 2010), mostra uma proximidade estrutural entre as regiões catalíticas da proteína e a porção deletada na isoforma amplificada nesse estudo (Figura 16). Além disso, a análise comparada entre os domínios de SRPK1, estudados por Plocinik e colaboradores (2011), e os domínios de SRPK2 mostra a proximidade entre a porção deletada na isoforma (marcada em verde na Figura 16) e domínios importantes para sua atividade quinase, os *loops* catalítico e de ativação (apontados na Figura 16). Sugerindo, dessa forma, que a deleção encontrada poderia ser responsável por modificações conformacionais importantes e que, possivelmente, resultariam na alteração da atividade de SRPK2 dentro da célula.

Apesar de não estar tão próximo a nenhum dos domínios catalíticos, o mesmo raciocínio pode ser empregado na análise dos efeitos da inserção de aminoácidos (Figura 16). A inclusão de 31 resíduos de aminoácidos poderia alterar a conformação da proteína e a distribuição de cargas nas proximidades do domínio catalítico e do sítio de ancoragem da proteína (apontados na Figura 16), favorecendo interações pouco específicas ou comprometendo a interação com ligantes e outras proteínas que sabidamente são fosforiladas por SRPK2.

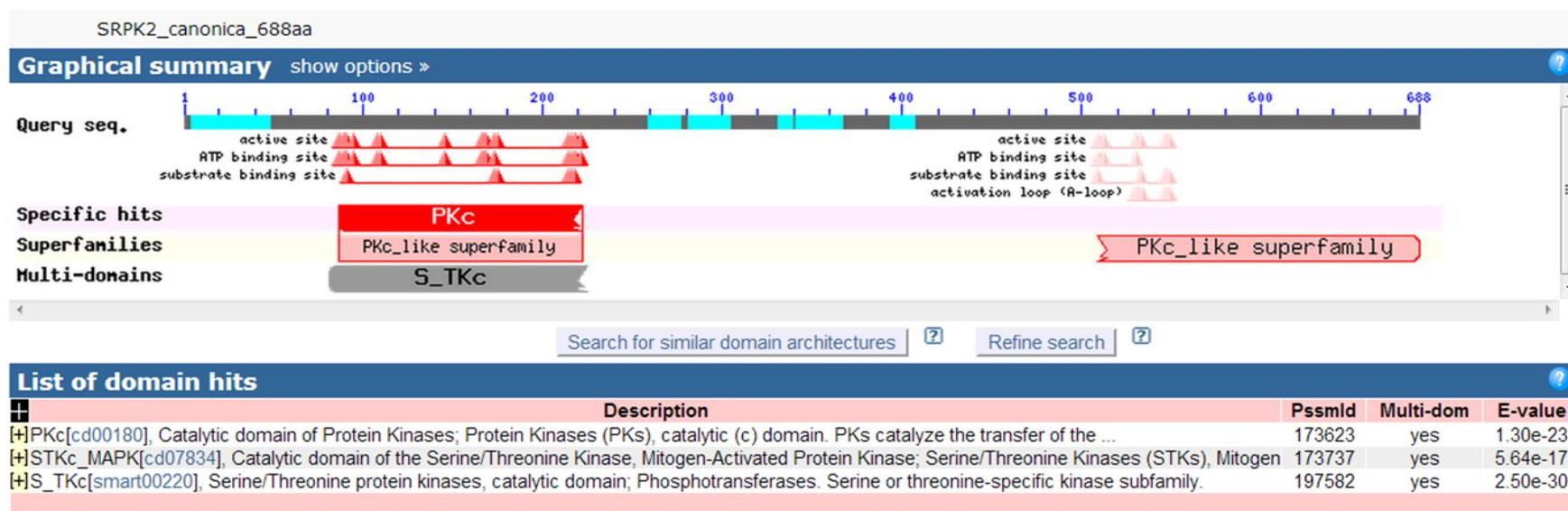


Figura 15: Predição dos domínios funcionais da proteína SRPK2 usando a ferramenta *Conserved Domain Database*. A análise através do banco de dados apontou as regiões entre os aminoácidos 80 a 220 e 500 a 550 como sendo o sítio catalítico da proteína SRPK2. Nessas duas regiões estariam localizados o sítio ativo, o sítio de ligação ao ATP e ao substrato. O domínio localizado entre os aminoácidos 500 a 550 ainda conteriam o *loop* de ativação da proteína. A análise dos domínios foi feita através do nível de significância (caracterizado pelos baixos *e-values*) do alinhamento da sequência em estudo com as sequências depositadas no banco de dados.

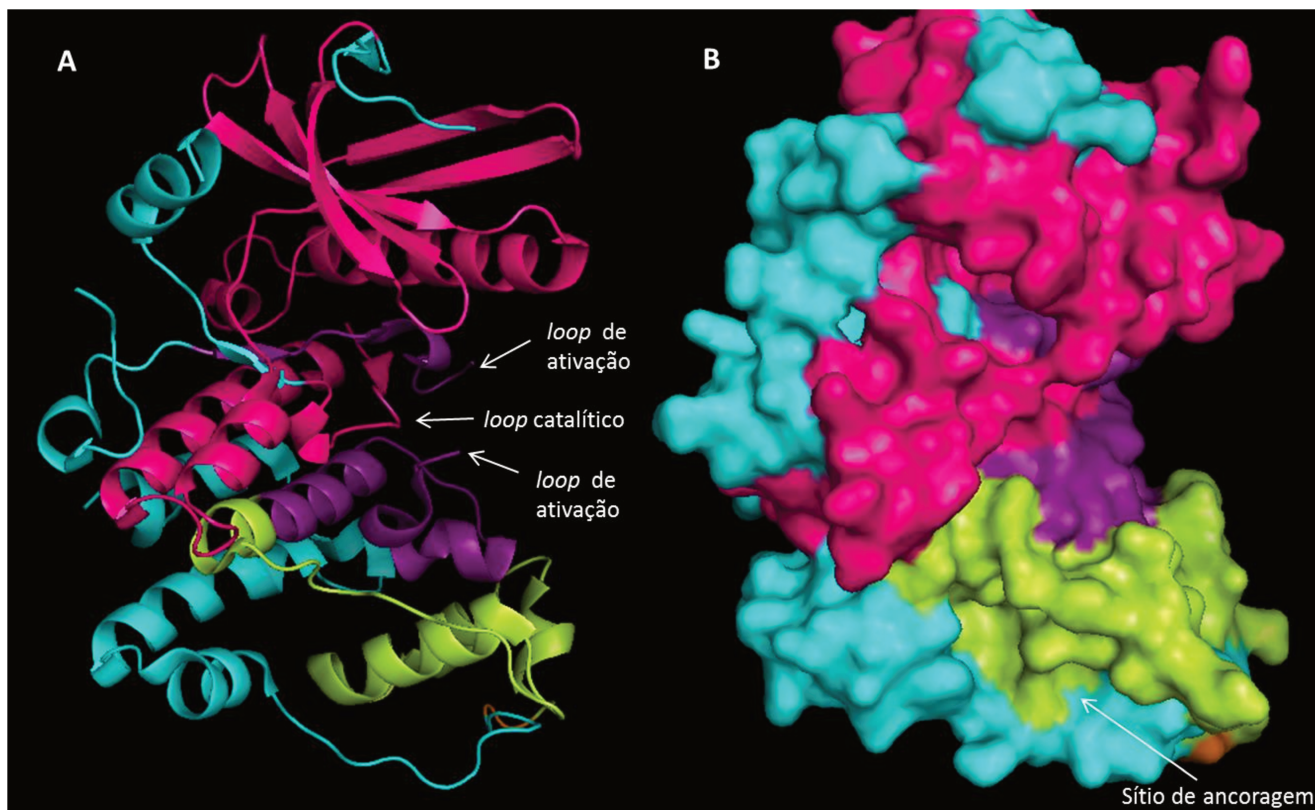


Figura 16: Análise dos domínios da proteína SRPK2 afetados após o *splicing* alternativo diferencial da porção *SRPK2_seq4*. Foram marcadas na estrutura cristalográfica resolvida por Pike e colaboradores (2010) os dois segmentos do sítio ativo da proteína SRPK2, indicados em rosa (domínio quinase entre os aminoácidos 80 e 220) e em roxo (domínio quinase entre os aminoácidos 500 e 550). A análise mostra a proximidade entre a região deletada na isoforma de 450pb (marcada em verde em A e B) e o sítio catalítico e a região de ancoragem da proteína SRPK2 (apontados na figura), que teria como função dar suporte às proteínas fosforiladas pela quinase. A figura ainda mostra a região onde ocorreria a retenção do *intron* (em laranja nas figuras de A a B) e, conseqüentemente, a inserção de 31 novos resíduos de aminoácidos na isoforma de 700pb. Fica evidente nessas marcações como a deleção presente na isoforma de 450pb, bem como a inserção presente na isoforma de 700pb, poderia afetar a atividade da proteína, seja através da alteração da conformação de regiões importantes para o desempenho de sua atividade quinase - como os *loops* catalítico e de ativação - ou da alteração na estrutura e distribuição das cargas na região do sítio de ancoragem. Vale ressaltar que tanto os *loops* quanto o sítio de ancoragem foram marcados através de uma análise comparada entre os domínios da quinase SRPK2 e os domínios presentes em SRPK1, estudados mais profundamente por Plocinik e colaboradores (2011).

Vale lembrar que a análise da estrutura resolvida por Pike e colaboradores deve ser cuidadosa, já que a estrutura depositada contém apenas os domínios catalíticos da proteína SRPK2 e não inclui a região espaçadora, altamente desorganizada. Sendo assim, as inferências funcionais são mais seguras para o domínio quinase localizado entre os aminoácidos 500 e 550, já que a proximidade entre as regiões alteradas e o sítio catalítico localizado entre os aminoácidos 80 a 220 pode ser apenas um artefato de técnica.

Mesmo levando em consideração essa ressalva, são inúmeras as possíveis implicações biológicas resultantes das alterações encontradas em SRPK2. As isoformas encontradas não estão descritas em nenhum banco de dados e, devido a ampla distribuição entre as linhagens estudadas, podem ter uma importante relação com a leucemia. A perda de 107 resíduos de aminoácidos no *amplicon* de 450pb e a inserção de 31 resíduos de aminoácidos no *amplicon* de 700pb pode afetar de forma considerável a conformação da proteína SRPK2, alterando a interação com ligantes e substratos.

Dados publicados por Hong, Jang & Ye (2010) fornecem indícios interessantes sobre a possível implicação biológica da expressão das isoformas alteradas de SRPK2. Os autores já haviam mostrado anteriormente (Jang *et al.*, 2009) que SRPK2 influencia na progressão do ciclo celular e é capaz de induzir apoptose através da super-regulação da ciclina D1. Sendo mecanismo dependente da fosforilação da Thr492 de SRPK2 por Akt, promovendo sua translocação nuclear e o aumento da ciclina D1, além da entrada no ciclo celular e a apoptose neuronal.

O novo trabalho de Hong, Jang & Ye (2010) mostra que a ação de SRPK2 na apoptose é dependente de sua clivagem pela caspase 3 nos resíduos Asp 139 e Asp 403. A clivagem geraria 3 produtos distintos de SRPK2: produto N-terminal (do aminoácido 1 até o 139), um produto intermediário (do aminoácido 139 ao 403) e um produto C-terminal (do aminoácido 403 até o 688).

Ao ser analisada a sublocalização celular, surpreendentemente, o produto N-terminal da clivagem da Asp139 era o único capaz de se translocar para o núcleo, enquanto os demais permaneciam no citoplasma. Essa alteração na sublocalização seria um forte indício de sua atuação nas vias que desencadeiam a morte celular, segundo os autores.

Mutações feitas nos resíduos 139 e 403 diminuíram significativamente a apoptose de células HEK293 tratadas com o agente citotóxico etoposídeo. Entretanto, somente as células transfectadas com os duplos mutantes e com a construção mutada do resíduo 139 (D139A) não apresentavam apoptose ao serem tratadas com o composto citotóxico, demonstrando que o resíduo Asp 139 é essencial para a ocorrência da apoptose.

Segundo os autores, a clivagem de SRPKs mediada por caspases, durante o estágio tardio de estresse celular, diminuiria sua atividade quinase, garantindo que o programa apoptótico fosse completamente executado nas células já condenadas.

Nesse contexto cabem as seguintes indagações: será que a conformação resultante das alterações encontradas nas isoformas de SRPK2 impede o acesso aos sítios de clivagem Asp 139 e Asp 403 pela caspase 3, fazendo com que SRPK2 não tenha sua atividade diminuída e que células comprometidas não entrem em apoptose? Seria esse o mecanismo que leva SRPK2 a contribuir para a proliferação de células leucêmicas, como descrito por Jang e colaboradores (2008)?

O trabalho de Hong, Jang & Ye (2010) torna as indagações sobre os efeitos biológicos da expressão de novas isoformas de SRPK2 ainda mais interessantes, abrindo espaço para estudos funcionais e estruturais que tentem desvendar o mecanismo pelo qual a quinase promove a proliferação de células cancerígenas ao invés de levá-las à apoptose.

Ainda no contexto da atividade quinase vale apontar as observações feitas por Ngo e colaboradores (2007) em relação à quinase SRPK1, paróloga a SRPK2. Os autores mostraram, através do estudo da estrutura cristalográfica da quinase SRPK1, a adoção de uma conformação constitutivamente ativa pela proteína. Ou seja, independente da interação com as proteínas testadas pelos autores, o *loop* de ativação da quinase permaneceria em um estado ativado. E, além disso, a quinase ainda se manteria ativa mesmo com uma série de mutações no seu segmento de ativação. Essa constatação surpreendente teria correlação com a adoção de novas interações dentro da proteína, permitindo a manutenção da competência catalítica da quinase mesmo diante de um quadro de prejuízo causado por mutações.

As constatações de Ngo e colaboradores (2007) dão base para outras indagações com relação à quinase SRPK2 e suas isoformas, descritas nesse estudo. Seria a quinase SRPK2 também constitutivamente ativa? As alterações do RNAm que resultam nas isoformas encontradas seriam capazes de causar prejuízo à sua atividade quinase ou também seriam compensadas pela aquisição de uma nova conformação da proteína? As isoformas, além de não acarretarem prejuízo a atividade da quinase, poderiam de alguma forma levar a um ganho de função, tornando a quinase mais ativa ou menos exigente quanto à especificidade dos seus ligantes?

Os resultados apresentados nesse trabalho somados aos resultados publicados por Ngo e colaboradores (2007) e Hong, Jang & Ye (2010) abrem a possibilidade de uma gama de indagações sobre a importância e o mecanismo com que a quinase SRPK2 favorece a

leucomogênese. Torna-se necessário, a partir de agora, desenvolver as análises experimentais que poderão responder a essas perguntas e permitirão a construção de uma visão mais concreta e fundamentada sobre o papel dessa quinase na leucemia.

4.2. Busca por alterações na expressão das SR quinases SRPK1, SRPK2 e CLK1 em leucemias

Ainda em busca de alterações em SRPK2 que pudessem se relacionar com as observações realizadas por Jang e colaboradores (2008), foi feita a análise do nível de expressão da quinase nas linhagens leucêmicas. Apesar das observações dos autores se referirem apenas à quinase SRPK2, a análise de expressão foi expandida para duas outras quinases, SRPK1 e CLK1.

A quinase SRPK1 foi escolhida pela alta homologia que possui com SRPK2 e também por estar superexpressa em leucemias linfóides e mielóides (Salesse *et al.*, 2004; Hishizawa *et al.*, 2005; Giannakouros *et al.*, 2011). Já CLK1 foi incluída no estudo por ser responsável pela fosforilação do fator de *splicing* proto-oncogênico SF2/ASF, promovendo sua saída dos *speckles* nucleares (Ngo *et al.*, 2005).

No experimento de quantificação, feito por qRT-PCR (do inglês, *quantitative real-time PCR*), foi utilizada a quantificação relativa (RQ), método que permite comparar a diferença de expressão do RNAm dos genes de interesse usando como normalizador um gene constitutivamente expresso. Foram escolhidos dois controles endógenos diferentes, o gene beta-2-microglobulina (B2M) e o gene beta-glucuronidase (GUS). A escolha dos controles se deu a partir dos estudos de Beillard e colaboradores (2003), onde esses genes foram mostrados como sendo os mais estáveis em diferentes amostras de origem leucêmica, sendo, portanto, controles endógenos ideais para o tipo de análise realizada nesse trabalho.

Após a determinação da eficiência dos *primers* e da quantidade de cDNA necessária para a amplificação (experimentos descritos nos Materiais e Métodos) seguiu-se com a amplificação dos genes de interesse. A Figura 17 mostra o resultado da quantificação relativa da expressão dos transcritos de SRPK1, SRPK2 e CLK1 para as diferentes leucemias englobadas nesse estudo.

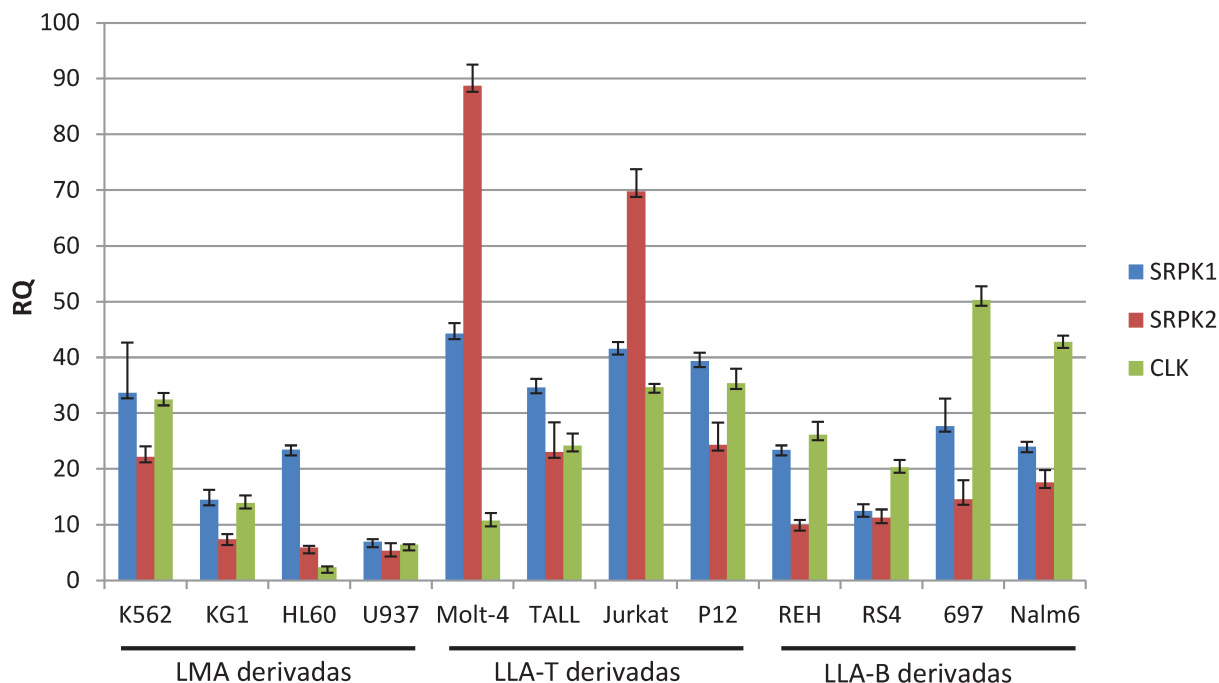


Figura 17: Expressão relativa das quinases SRPK1, SRPK2 e CLK1 em diferentes linhagens derivadas de leucemia. Foram utilizadas na análise 12 linhagens leucêmicas diferentes, divididas entre linhagens derivadas de leucemia mieloide (LMA), leucemia linfóide de célula T (LLA-T) e leucemia linfóide de célula B (LLA-B). O gráfico mostra o resultado da expressão dos transcritos de SRPK1, SRPK2 e CLK1 nas diferentes leucemias. O cálculo da quantificação relativa (RQ) foi feito através da fórmula: $RQ = 2^{-\Delta Ct} \times 100$. A normalização da quantificação relativa foi feita usando-se os controles endógenos GUS e B2M.

Pode-se perceber, através do gráfico, a expressão diferencial das quinases entre os diferentes tipos de leucemia.

Os transcritos de SRPK2 aparecem mais expressos nas linhagens de origem linfóide de célula T (LLA-T), sendo a expressão maior nas linhagens Molt-4 e Jurkat. Já a sua expressão nas linhagens mielóides (LMA) é duas a nove vezes menor do que o observado nas células de LLA-T.

Dados sobre a expressão de SRPK2 em linhagens leucêmicas já haviam sido descritos por Jang e colaboradores (2008). Analisando o nível de expressão da proteína SRPK2, através de *imunoblotting*, os autores observaram uma alta expressão da quinase nas células mielóides U937 e HL60 e nas linfóides de célula B BJAD e DG75. Os dados obtidos na quantificação de SRPK2 por qRT-PCR vão de encontro às observações feitas pelos autores porque mostram que, entre as linhagens mielóides, a expressão de SRPK2 é, aproximadamente, quatro vezes menor nas linhagens U937 e HL60 em comparação com

K562. Linhagem que ainda foi classificada por Jang e colaboradores (2008) como dotada de uma expressão moderada de SRPK2 e, ainda, comparável ao observado para KG1.

Apesar dos dados discordantes entre as observações de Jang e colaboradores (2008) para as LMAs e as quantificações realizadas nesse trabalho, pode ser observada uma maior expressão de SRPK2 nas linhagens derivadas de LLA-B. Assim como mostrado pelos autores nas marcações por *imunoblotting*, a expressão do transcrito de SRPK2 foi muito maior nas linhagens de origem linfóide derivadas de célula B quando comparadas com linhagens mielóides. É importante ressaltar que no estudo feito por Jang e colaboradores (2008) só foram analisadas células linfóides derivadas de célula B, de modo que o alto nível de expressão de SRPK2 nas linhagens de LLA-T permanece como dado inédito.

Com relação à quinase SRPK1 pode-se observar uma alta expressão de seus transcritos na maioria das linhagens, sendo os maiores valores de expressão observáveis nas linhagens LLA-T. A alta expressão de SRPK1 em células de LLA-T já havia sido descrita por Hishizawa e colaboradores (2005) em pacientes adultos portadores da doença. Salesse e colaboradores (2004) também mostraram uma alta expressão da quinase em pacientes portadores de leucemia mieloide crônica (LMC). Apesar de não terem sido analisadas linhagens derivadas de LMC, SRPK1 também parece ter uma alta expressão em outro tipo de leucemia mieloide, a LMA.

Com relação a CLK1, o gráfico mostra uma alta expressão da quinase nas linhagens de leucemia linfóide. O RNAm de CLK1 aparece mais expresso do que o transcrito de SRPK2 em muitas das linhagens analisadas, principalmente as LLA-B. O dado se torna mais interessante pelo fato de não existir nenhum estudo que aponte uma relação entre CLK1 e neoplasias. Sendo a única relação indireta da quinase com a oncogênese o fato dela fosforilar o fator de *splicing* proto-oncogênico SF2/ASF. Desse modo, a alta expressão de CLK1 nas linhagens de leucemia (superando até os níveis de expressão da quinase SRPK2) poderia ser um indício de uma possível relação com a leucomogênese.

Interessantemente, ao ser observado o gráfico com os valores de quantificação relativa, pode ser notado também que a expressão de SRPK1 supera os valores obtidos para SRPK2 na maioria das linhagens (exceto nas linhagens U937, Molt-4 e Jurkat). Fazendo um paralelo entre as alterações descritas para SRPK2 nesse estudo (seção 4.1) e a similaridade de sequência entre as quinases, seria interessante levantar a seguinte questão: será que a maior expressão de SRPK1 nas leucemias seria um mecanismo compensatório para as alterações encontradas em SRPK2? Será que, nas leucemias, SRPK1 poderia desempenhar as funções de SRPK2 como forma de minimizar possíveis danos em sua atividade, decorrentes da expressão de isoformas não canônicas? E, além disso, seria

a maior expressão dessas duas quinases, bem como de CLK1, um indicativo de uma alteração global de mecanismo de *splicing* na leucemia?

Com relação à SRPK1 e SRPK2, sabe-se que a homologia entre as duas quinases é bastante alta, sendo de 90% a similaridade entre seus domínios de quinase (Wang *et al.*, 1998). Além disso, a atividade redundante das duas quinases já foi demonstrada por estudos de Koizumi e colaboradores (1999). Foi observado que, em determinados momentos do ciclo celular, em que SRPK1 não estava ativa ou expressa, a quinase SRPK2 era capaz de interagir e fosforilar o fator de *splicing* SF2/ASF (normalmente ativado por SRPK1). Desse modo, pode-se pensar que, nas células em que o *splicing* diferencial de SRPK2 cause alterações na estrutura e atividade da proteína, SRPK1, possivelmente, exerceria sua função de forma compensatória. E, sendo assim, a quinase SRPK1 apresentaria-se mais ativa ou mais expressa nessas células a fim de exercer uma dupla função.

São diversas as indagações possíveis de serem formuladas a partir dos dados encontrados nesse trabalho. As isoformas de SRPK2 amplificadas a partir do cDNA de linhagens leucêmicas e a expressão diferencial das quinases SRPK1, SRPK2 e CLK1 nas mesmas linhagens reforçam, ainda mais, a relação entre alterações no mecanismo de *splicing* e a oncogênese. E podem, ainda, ser um indicativo de uma modificação global de diferentes genes relacionados ao *splicing* alternativo em células leucêmicas. Apesar da quantidade de conjecturas possíveis a partir dos dados apresentados nesse trabalho, são inúmeros os experimentos necessários para analisar e validar a relação dessas quinases com a leucomogênese. Apesar disso, os dados encontrados dão indícios promissores e animadores sobre o estudo dessas quinases no contexto da leucemia.

4.3. Busca por alterações no *splicing* global de células ectopicamente expressando o fator de *splicing* SF2/ASF

Paralelamente à busca por alterações genéticas e de expressão da quinase SRPK2 em linhagens leucêmicas, foram realizados estudos envolvendo o fator de *splicing* SF2/ASF.

Apesar da caracterização desse fator como proto-oncogênico por Karni e colaboradores (2007) e sua alta expressão em diferentes tipos de tumores sólidos (Karni *et al.*, 2007; Ezponda *et al.*, 2010; Anczuków *et al.*, 2012), são escassas as informações sobre as isoformas que seriam desreguladas mediante a alteração da expressão de SF2/ASF. Diante desse quadro, buscamos nesse trabalho investigar os efeitos da alteração de expressão de SF2/ASF no *splicing* global de células HEK293T, modelo celular bastante

usado e consolidado em estudos que envolvem expressão de proteínas recombinantes (Thomas & Smart, 2005).

Como ferramenta de análise do *splicing* global dessas células foi utilizado o *Exon Array* (Affymetrix GeneChip Exon 1.0 ST), ferramenta capaz de fornecer informações mais detalhadas sobre o transcriptoma por focar não só no nível de expressão de um transcrito, mas também no seu padrão de *splicing* alternativo. Essa tecnologia une a vantagem do uso do microarranjo, ferramenta poderosa no estudo de mecanismos biológicos por possibilitar uma análise *high throughput* dos transcritos presentes em uma célula, órgão ou tecido (Simon, 2009), com a possibilidade de se analisar as isoformas gênicas diferencialmente expressas presentes nas amostras estudadas. Sendo assim, alterações na expressão gênica em resposta a doenças, tratamentos e medicamentos quimioterápicos, que afetam a dinâmica do genoma, podem ser detectadas por estudos de microarranjo (Wiltgen & Tilz *et al.*, 2007), mas podem ser mais profundamente analisadas com o uso do *Exon Array*.

Por essa abordagem mais detalhada no estudo do transcriptoma, diferentes estudos tem se utilizado dessa ferramenta. Muitas publicações podem ser encontradas relacionando eventos de *splicing* alternativo, detectados pelo uso de *Exon Array*, com os mais diferentes tipos de neoplasias, dentre elas a leucemia e o câncer de próstata (Dolnik *et al.*, 2009; Jhavar *et al.*, 2009; Wasim *et al.*, 2010).

Levando-se em consideração o enfoque desse trabalho em um fator de *splicing* e suas principais quinases ativadoras, a análise por *Exon Array* mostrou-se uma ferramenta metodológica bastante adequada para a avaliação dos efeitos da superexpressão de SF2/ASF no *splicing* global de células HEK293T.

Como primeira etapa desse experimento foi realizada a superexpressão de SF2/ASF em células HEK293T, como mostrado na Figura 18, que traz a confirmação, por *Western Blotting*, da superexpressão desse fator de *splicing*. Feita a confirmação, o RNA total das células HEK293T foi extraído e analisado segundo os parâmetros de qualidade exigidos pela Affymetrix (Figura 19), fabricante dos *Exon Arrays*, possibilitando a síntese do cDNA e a hibridização dos *chips*.

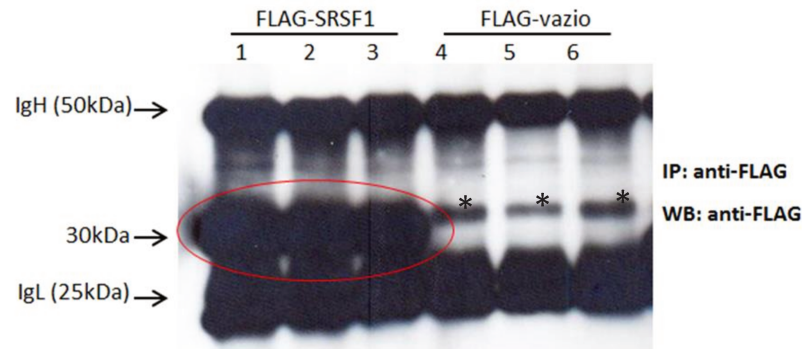


Figura 18: Expressão de SF2/ASF-FLAG em células humanas HEK293T, transfectadas em triplicata. As células foram transfectadas com o reagente PEI e coletadas após 48h. Os lisados celulares foram submetidos à imunoprecipitação com o anticorpo anti-FLAG e corridos em gel de SDS-PAGE 10%. Nota-se clara expressão de SF2/ASF-FLAG na altura de 30 kDa (poços 1, 2 e 3; círculo vermelho). Os poços 4, 5 e 6 estão correspondem à imunoprecipitação das amostras de células transfectadas com o vetor pcDNA3-FLAG-vazio. As bandas de 50 kDa e 25 kDa correspondem, respectivamente, às cadeias pesada (IgH – *heavy*) e leve (IgL – *light*) do anticorpo anti-FLAG, usado na imunoprecipitação das proteínas contendo o referido epítipo. Os asteriscos marcam bandas que, apesar da altura aproximada de 30 kDa correspondem, possivelmente, ao reconhecimento inespecífico feito pelo anticorpo anti-FLAG.

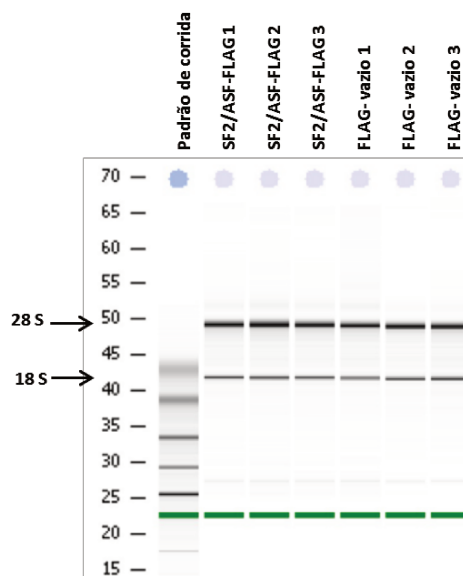


Figura 19: Verificação da qualidade de RNA total, por eletroforese, através do Agilent 2100 Bioanalyser RNA 6000 Nano chip. O RNA total, extraído usando o kit *RNeasy* (Qiagen), foi submetido a uma eletroforese dentro do *chip* da empresa Agilent. São mostrados os padrões de corrida dos RNAs extraídos de células HEK293T transfectadas com o plasmídeo SF2/ASF-FLAG (primeiros 3 poços depois do padrão de corrida) e FLAG-vazio (demais poços). Pode ser percebida a nitidez das subunidades 28S e 18S (apontados pela seta) do RNA ribossomal e a ausência de rastros de degradação do RNA, demonstrando tratar-se de um RNA íntegro e de qualidade.

Após a hibridização e escaneamento dos *chips* foi realizada a clusterização hierárquica dos dados obtidos (Figura 20). Esse método de análise preliminar é bastante popular e permite verificar a similaridade do padrão de expressão presente em cada *chip* presente no experimento. Ou seja, espera-se que, ao se realizar a clusterização, os *chips* representantes de uma mesma triplicata sejam mais semelhantes entre si do que às demais triplicatas do experimento.

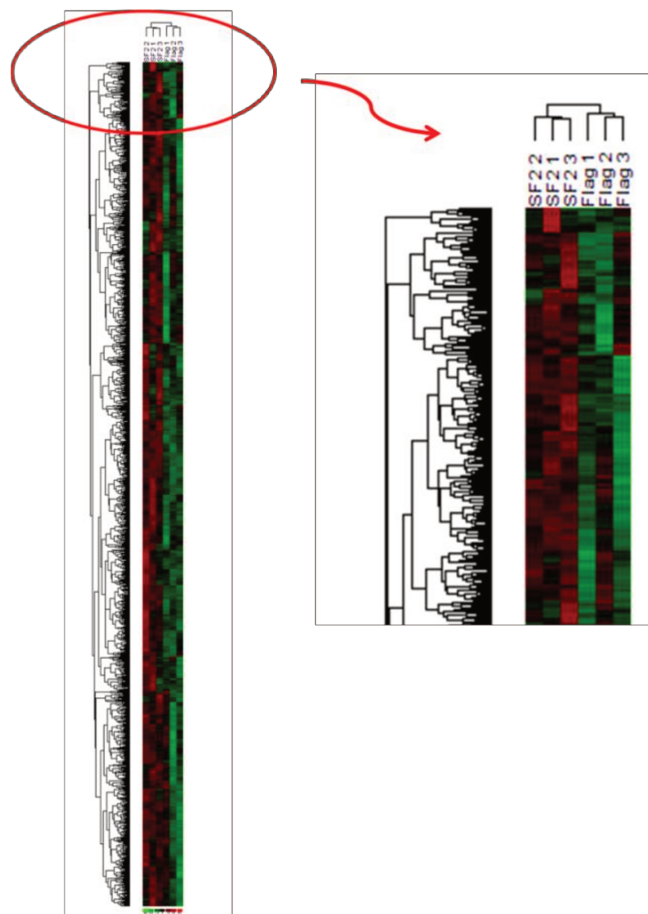


Figura 20: Resultado do *cluster* hierárquico dos genes afetados pela superexpressão de SF2/ASF nas triplicatas experimental e controle. A figura mostra o dendrograma resultante da clusterização, feita com o *software dCHIP*, do resultado de expressão gênica dos *chips* correspondentes à superexpressão de SF2/ASF e dos *chips* controle, contendo apenas o vetor vazio (FLAG-vazio). Pode ser percebida a maior similaridade no padrão de expressão entre os componentes da mesma triplicata biológica, demonstrada pelo padrão de distribuição das cores vermelha (valor de expressão positivo) e verde (valor de expressão negativo). Em destaque (círculo vermelho) está indicado o resultado na clusterização que, através da disposição dos “braços” do dendrograma, mostra o agrupamento diferencial dos *chips* “SF2/ASF” e dos *chips* “FLAG”, comprovando a similaridade entre os microarranjos pertencentes à mesma triplicata biológica.

Como mostra a Figura 20, a clusterização dos dados de superexpressão indicou que o padrão de expressão dos *chips* experimentais (com superexpressão de SF2/ASF) é mais semelhante entre si do que ao grupo controle (células transfectadas com FLAG-vazio), permitindo, dessa forma, o prosseguimento das análises dos dados (maiores detalhes sobre os passos iniciais do experimento de *Exon Array* podem ser encontrados na seção Materiais e Métodos).

A análise dos dados de expressão obtidos no experimento de *Exon Array* foi realizada no ambiente R, usando o *software Bioconductor RankProduct* (Gentleman *et al.*, 2004 e 2005). O *software* apresenta como vantagem uma gama de testes estatísticos e formas de apresentação de dados, permitindo uma maior autonomia do usuário durante a análise dos dados (Okoniewski & Miller, 2008).

Na primeira etapa de análise utilizando o *Bioconductor*, do total de 1,4 milhão de *probe sets* presentes no *array*, foram obtidas 8.653 *probe sets* alterados pela superexpressão de SF2/ASF que continham um *p-value* menor do que 0,01. O *p-value* < 0,1 foi escolhido como parâmetro de corte inicial para minimizar a quantidade de falsos positivos que seriam considerados verdadeiros ao se utilizar um parâmetro de corte menos restrigente, como um *p-value* < 0,05, no enorme conjunto de dados fornecidos por experimentos de *arrays*.

A partir da lista de 8.653 *probe sets* alterados foi feito um segundo corte, utilizando o método estatístico de Benjamini-Hochberg (BH). Esse teste estatístico é utilizado para controlar a proporção de falsos positivos dentro de análises múltiplas, ou seja, dentro de análises estatísticas que avaliam diversos parâmetros ao mesmo tempo, como é o caso das análises envolvendo resultados de *arrays*.

Os valores de BH variam de 0 a 1 e, em termos práticos, podem ser considerados como a porcentagem de falsos positivos que são toleráveis na análise realizada. A lista de 8.653 *probe sets* foi reduzida ao valor de 2.817 *probe sets* alterados, ao serem retiradas as amostras que possuíam um valor de BH superior a 0,2. A Figura 21 traz um esquema ilustrativo sobre as análises estatísticas empregadas e o resultado de *probe sets* encontrados alterados a cada restrição.

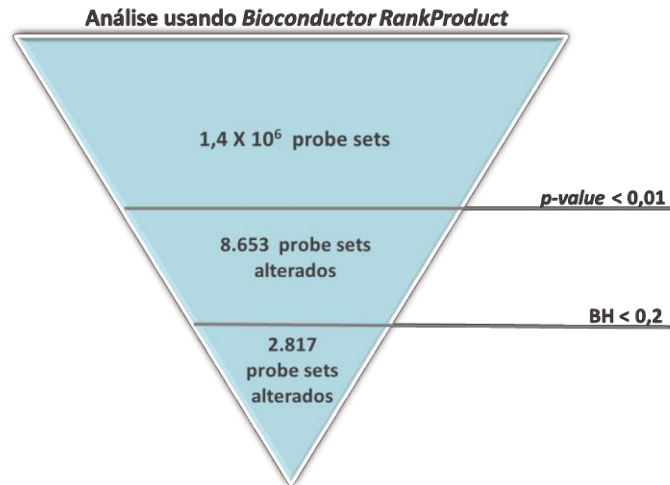


Figura 21: Esquema ilustrativo da análise realizada através do software *Bioconductor RankProduct*. A figura mostra o resultado de cada restrição estatística empregada no valor total de *probe sets* alterados. Ao se utilizar o software *Bioconductor*, o 1,4 milhão de *probe sets* representados no *chip* foi reduzido a 8.653 *probe sets* significantes, representadas pelo *p-value* menor que 1%. Em um segundo corte estatístico, utilizando-se o teste de Benjamini-Hochberg (BH), o valor foi reduzido a 2.817 *probe sets* significantes que, neste caso, possuíam um valor de falso positivo menor do que 20%.

Antes de dar prosseguimento a uma análise mais aprofundada dos genes afetados pela superexpressão de SF2/ASF foi feita uma correlação entre os genes conhecidamente afetados pelo fator de *splicing* e os dados obtidos nas listas contendo 8.653 *probe sets* alterados (lista maior) e 2.817 *probe sets* alterados (lista menor).

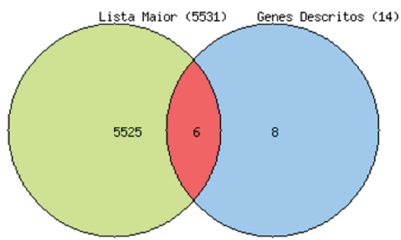
Para tanto foram buscados no NCBI genes cujo *splicing* alternativo sabidamente fosse afetado por SF2/ASF, resultando em 14 genes cujas análises experimentais realizadas pelos autores apontaram para um envolvimento direto de SF2/ASF na expressão de diferentes isoformas. Usando um software online para construção do diagrama de Venn (<http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/venn4.cgi>) foi feita a comparação entre os genes presentes nas duas listas geradas nesse estudo e os genes já descritos por terem o *splicing* afetado por SF2/ASF. A Figura 22 mostra o resultado dessa análise.

A) Genes sob controle de SF2/ASF descritos na literatura

BCL2L1 (Leu <i>et al</i> , 2012)**	LOXL4 (Sebban <i>et al</i> , 2013)**
CASK (Dembowski <i>et al</i> , 2012)	MCL-1 (Gautrey <i>et al</i> , 2012)
GNAS (Pollard <i>et al</i> , 2002)	MNK2 (Adesso <i>et al</i> , 2012)
ICAD (Leu <i>et al</i> , 2012)	RAPTOR (Sun <i>et al</i> , 2009)
INSR (Talukdar <i>et al</i> , 2011)	S6K (Karni <i>et al</i> , 2007)**
KLF6 (Muñoz <i>et al</i> , 2012)**	VEGF (Peiris-Pages <i>et al</i> , 2012)
LMNA (Lopez-Mejia <i>et al</i> , 2011)	

** Outros componentes da mesma família desses transcritos também estão representados nas listas maior e menor resultantes da análise do Exon Array.

B) Lista Maior X Genes Descritos



Comuns = 6

CASK (Dembowski *et al*, 2012)
GNAS (Pollard *et al*, 2002)
KLF6 (Muñoz *et al*, 2012)
LMNA (Lopez-Mejia *et al*, 2011)
VEGFB (Peiris-Pages *et al*, 2012)
VEGFC (Peiris-Pages *et al*, 2012)

C) Lista Menor X Genes Descritos



Comuns = 3

CASK (Dembowski *et al*, 2012)
KLF6 (Muñoz *et al*, 2012)
LMNA (Lopez-Mejia *et al*, 2011)

Figura 22: Esquema ilustrativo da comparação entre genes encontrados alterados nas análises de Exon Array e genes já conhecidos por terem *splicing* modulado pelo fator SF2/ASF. A figura representa, através do Diagrama de Venn, a intersecção entre os dados esperados à partir da alteração de SF2/ASF e os dados obtidos nos Exon Arrays. No diagrama B está o resultado da comparação entre as publicações do NCBI relatando alterações de isoformas gênicas moduladas por SF2/ASF (em A) e o resultado da lista maior de genes alterados na análise de Exon Array. Já no diagrama C está a comparação entre esses mesmos genes e a lista menor obtida nas análises de Exon Array. Vale ressaltar que a diminuição na contagem de genes em cada lista (observável na indicação acima de cada diagrama) tem relação com o agrupamento de dados que se referem ao mesmo gene e estariam repetidos ao longo do array, contribuindo, dessa forma, para uma superestimação na contagem de genes.

Na lista maior obtida nesse trabalho foram encontrados alterados 6 dos 14 genes cujo *splicing* parece ser dependente da ação de SF2/ASF, como mostrado na Figura 22. Já na lista menor, com análise estatística mais restrigente, foram encontrados alterados 3 dos 14 genes.

Apesar de não estarem demonstrados na intersecção do diagrama, genes da mesma família de 4 outros genes cujo *splicing* é dependente de SF2/ASF também foram encontrados nas listas resultantes do experimento de Exon Array (esses genes estão marcados com asterisco na Figura 22). Esses genes não foram contabilizados na construção do diagrama por representarem isoformas gênicas ou genes da mesma família

daqueles que foram descritos, não sendo, portanto, exatamente a sequência descrita como afetada por SF2/ASF. Esse dado mostra-se interessante por, possivelmente, expandir a atuação de SF2/ASF no *splicing* de outros genes componentes de mesma família dos genes listados na Figura 22 e que não foram analisados pelas publicações encontradas no NCBI.

Ainda com relação à pequena correspondência entre os 14 genes já estudados por terem o *splicing* alterado por SF2/ASF e os genes resultantes da análise dos *Exon Arrays*, vale ressaltar que os dados presentes nas duas listas descritas nesse trabalho correspondem apenas à análise *gene level* dos arrays.

Na análise *gene level* são avaliadas as alterações globais de um transcrito, ou seja, o valor de expressão de cada *probe set* é considerado em conjunto. Dessa forma, genes cujas alterações de *splicing* envolvem apenas um ou poucos *exons* dificilmente estariam representados na lista, pela baixa significância que possuiriam na análise *gene level* (para mais detalhes sobre *gene* e *exon level analysis* dos *Exon Arrays* deve-se consultar a seção 3.13 dos Materiais e Métodos). Sendo assim, os demais genes que não foram indicados na intersecção do diagrama de Venn podem ter sido alterados no experimento de *Exon Array*, mas, por uma questão da sumarização dos dados somada a estatística empregada, foram cortados na análise *gene level*.

Dando prosseguimento a *gene level analysis* foi realizada a análise das vias e processo celulares comprometidos pela superexpressão de SF2/ASF. Para tanto foi utilizado o *software* Metacore™, que permite a anotação de dados de microarranjo em vias celulares e vias de processos metabólicos. O diferencial desse *software* é a curadoria manual de suas informações, realizada por um time de especialistas que buscam e adicionam informações tão logo ocorra a publicação de novos dados sobre vias, processos e interações moleculares (Bugrim, Nikolskaya & Nikolsky, 2004).

Apesar do Metacore™ permitir tanto a análise dos dados brutos do *array* quanto a visualização de dados já refinados (Nikolsky *et al.*, 2005), optou-se pela utilização do *software* apenas para analisar os dados já refinados com o uso do *software* Bioconductor, minimizando, assim, a quantidade de falsos positivos provenientes da grande quantidade de informação fornecida pelo *Exon Array*. As anotações dos processos biológicos e vias foram realizadas com as duas listas (menor e maior) geradas a partir da análise com o *software* Bioconductor.

As duas listas foram mantidas pela mesma questão de sumarização de dados discutida acima. Na *gene level analysis* todos os valores de *probe sets* são agrupados em um único valor, fazendo com que transcritos cuja alteração de *splicing* modulada por SF2/ASF envolva um ou poucos *exons* apresentem *p-values* pouco significativos. Esses

transcritos, ao serem submetidos a uma análise estatística muito restrigente, seriam perdidos, resultando na possível exclusão de candidatos interessantes que teriam o *splicing* modulado por SF2/ASF.

As duas listas, ao serem analisadas no Metacore™, também apresentaram redução do número de componentes alterados, como mostra a Figura 23. A redução se deu pelo agrupamento de informações de *probe sets* que correspondem a um mesmo gene e também pelo parâmetro de restrição estatística empregado pelo *software*, a proporção de falsos positivos (PFP) menor do que 5%.

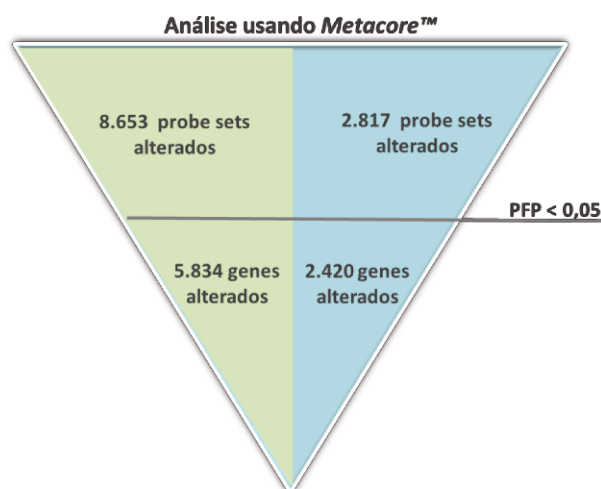


Figura 23: Esquema ilustrativo da análise realizada através do *software* Metacore™. As listas maior (em verde) e menor (em azul), ao serem analisadas pelo *software*, apresentaram redução dos valores de *probe sets* alterados devido, principalmente, ao agrupamento dos dados que se referiam ao mesmo transcrito gênico. A partir desse agrupamento os dados mostrados pelo *software* passaram a corresponder à alteração de genes e não mais *probe sets*. Ainda na figura está indicado o parâmetro de restrição estatística utilizado pelo *software*: proporção de falso positivo (PFP) em 5%.

Como resultado da análise conjunta das duas listas pelo Metacore™ foram encontradas alterações estatisticamente significativas nas vias apresentadas nas Figuras 24 e 25 que correspondem, respectivamente, aos efeitos da superexpressão de SF2/ASF nas listas maior e menor.

Pode ser percebido nas duas figuras que as vias estão classificadas de acordo com os valores de $-\log^{p-value}$. Isso ocorre porque o *software* considera como vias mais significativamente alteradas, no caso, com o maior valor de $-\log^{p-value}$, aquelas vias que possuem a maior parte dos seus componentes encontrados na lista de entrada de dados. Ou seja, quanto mais genes de uma mesma via estiverem alterados nos dados de *Exon Array*, maior é a confiabilidade de alteração dessa via nas análises feitas pelo Metacore™.

É interessante observar que, nas duas listas, são encontrados alterados diversos pontos das vias de resposta imune e também de remodelamento do citoesqueleto e adesão celular. Para a lista maior, das 10 vias mais significativamente alteradas 5 estão relacionadas com a resposta imune e 4 estão relacionadas ao citoesqueleto e adesão celular (Figura 24). Já na lista, menor outras vias aparecem como as mais significativamente alteradas, porém, ainda permanecem alterações significativas nas vias de resposta imune, remodelamento do citoesqueleto e adesão celular. Neste caso, são encontradas na listagem do Metacore™ duas vias celulares alteradas para cada um desses três processos (Figura 25).

Vale ressaltar que as alterações de significância encontradas na análise da lista menor, possivelmente, tem relação com a redução do número total de dados. Ou seja, ao ser diminuído o número total de genes alterados na lista menor, genes de outras vias passaram a ter uma significância maior na análise. Fato possivelmente relacionado à exclusão de muitos dos genes envolvidos na resposta imune durante o corte estatístico que reduziu a lista de 8.653 para 2.817 *probe sets* alterados.

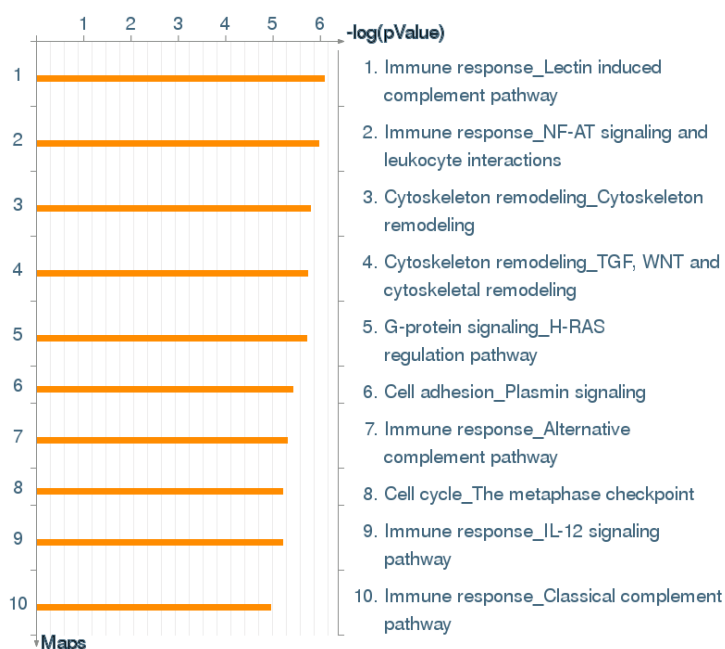


Figura 24: Representação esquemática das vias significativamente alteradas pela superexpressão de SF2/ASF em células HEK293T – dados da lista maior. A figura mostra o resultado na análise da lista maior de dados através do *software* Metacore™. Foram eleitas pelo *software* as 10 vias mais significativamente alteradas no estudo realizado nesse trabalho, sendo a classificação dependente do valor de $-\log^{p-value}$. As vias que ocupam as primeiras posições na classificação representam os processos com mais genes alterados mediante a superexpressão de SF2/ASF.

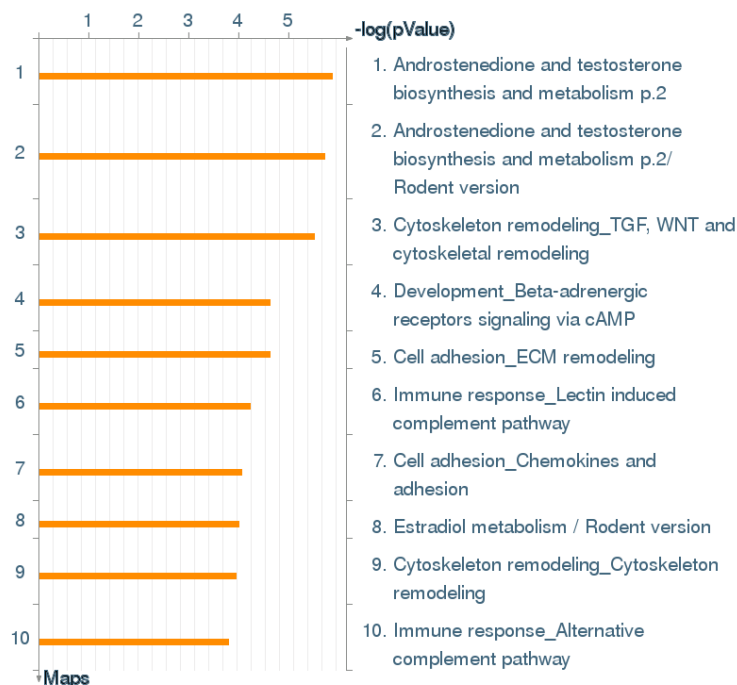


Figura 25: Representação esquemática das vias mais significativamente alteradas pela superexpressão de SF2/ASF em células HEK293T – dados da lista menor. A figura mostra o resultado na análise da lista menor de dados através do *software* Metacore™. Foram eleitas pelo *software* as 10 vias mais significativamente alteradas no estudo realizado nesse trabalho, sendo a classificação dependente do valor de $-\log^{p-value}$. As vias que ocupam as primeiras posições na classificação representam os processos com mais genes alterados mediante a superexpressão de SF2/ASF.

Apesar da análise usando o *software* Metacore™ ainda ser preliminar e necessitar de maior aprofundamento, é interessante observar como os dados preliminares já apontam para alterações de vias que se relacionam com o desenvolvimento e progressão de neoplasias.

A estreita relação entre sistema imunológico e câncer vem sendo estudada há anos e possibilitou o desenvolvimento de terapias imunológicas feitas com anticorpos monoclonais (como o rituximab), mais específicas e menos agressivas aos pacientes (Markiewski *et al.*, 2008). Entretanto, sabe-se também que o sistema imune tem um papel importante no desenvolvimento e na manutenção do câncer.

Existem inúmeros indícios que ligam a ocorrência de longos processos inflamatórios à facilitação da transformação maligna de células e a progressão do câncer (Dunn *et al.*, 2002; Swann *et al.*, 2007). Nesse contexto, o sistema complemento, essencial para a ocorrência da resposta inflamatória e também encontrado afetado nos *Exon Arrays*

(Figura 24, vias 1, 7 e 10; Figura 25, vias 6 e 10), desponta como um dos elementos chaves da associação entre desbalanço do sistema imune e o desenvolvimento de neoplasias.

O complemento é um sistema complexo formado por mais de 30 proteínas de membrana e proteínas solúveis (Kolev *et al.*, 2011). Tradicionalmente sua função era a de “primeira linha de combate” do organismo, sendo responsável apenas por eliminar microrganismos invasivos. Porém, hoje se sabe que sua função é mais ampla, compreendendo a complementação de diversos processos biológicos e inflamatórios (Ricklin *et al.*, 2010).

Com relação ao câncer, sempre se acreditou que o complemento desempenhava a função de proteção do organismo contra células malignas, já que muitos efetores desse sistema foram encontrados na superfície de diversas células tumorais (Ricklin *et al.*, 2010). Porém, a partir da publicação feita por Markiewski e colaboradores (2008) uma nova perspectiva de atuação do sistema complemento na carcinogênese foi vislumbrada.

As observações feitas por Markiewski e colaboradores (2008) sugerem que o sistema complemento contribui para a manutenção tumoral, participando dos mecanismos que levam ao seu crescimento. A molécula chave desse processo seria a partícula C5a do sistema complemento que, ao ser produzida no microambiente do tumor, promoveria seu crescimento por suprimir a atividade antitumoral mediada por células T CD8+. Reforçando esses dados está o fato do bloqueio farmacológico do receptor de C5a restabelecer o crescimento tumoral a níveis muito próximos daquele produzido por drogas anticâncer, como o paclitaxel.

Apesar da necessidade de novos estudos clínicos sobre a descoberta feita por Markiewski e colaboradores (2008), os dados publicados pelo grupo dão consistência à visão já aceita de que processos inflamatórios e infecciosos podem provocar ou aumentar o crescimento de tumores (Loveland & Cebon, 2008).

O citoesqueleto, outro componente celular bastante importante para o desenvolvimento do câncer, também foi alterado pela superexpressão do fator de *splicing* SF2/ASF, juntamente com processos de adesão celular, como mostram as Figuras 24 (vias 4, 5, 6 e 8) e 25 (vias 3, 5, 7 e 9).

O citoesqueleto corresponde à estrutura básica responsável pela morfologia e mobilidade das células, sendo composto por microtúbulos, filamentos intermediários e filamentos de actina (Jiang, Emonoto & Takahashi, 2009). No contexto do câncer, o desbalanço da regulação do citoesqueleto está relacionado com a ocorrência de metástase. A metástase corresponde ao fenômeno pelo qual as células cancerígenas, por modificação das interações célula-célula e também na sua morfologia, adquirem a

capacidade de se desprender do tumor (sítio primário) e se alojar em outra região do organismo (sítio secundário), resultando na formação de tumores em locais diferentes do sítio primário (Yilmaz & Christofori, 2009).

A reorganização do citoesqueleto de actina, a alteração das adesões focais (ligação da célula à matriz extracelular) e mudanças na resposta ao microambiente são alguns dos fatores que facilitam a invasão de tecidos próximos ao câncer e, por fim, a ocorrência da metástase (Jiang, Emonoto & Takahashi, 2009).

Muitas vias de sinalização celular são responsáveis pela modulação do citoesqueleto, principalmente aquelas que envolvem ativação por fatores humorais como quimiocinas, fatores de crescimento e citocinas (Jiang, Emonoto & Takahashi, 2009). Evidências indicam que a via de sinalização por PI3K/Akt é responsável por promover a movimentação de fibroblastos e de células tumorais, apesar de ser desconhecido o mecanismo com que a via atua sobre a polimerização da actina (Meili *et al.*, 1999; Jiang, Emonoto & Takahashi, 2009).

Dados interessantes de Irie e colaboradores (2005) mostram efeitos distintos de duas isoformas de Akt na perda de interação entre células epiteliais (fenômeno chamado de transição epitélio-mesenquimal - alteração chave para a ocorrência de metástase) e no mecanismo de migração celular. Enquanto a diminuição de expressão da isoforma Akt1 estimula a migração de células de câncer de mama e altera dramaticamente sua morfologia, a isoforma Akt2 reverte o quadro de conversão morfológica e reduz a proliferação das células. Sabe-se ainda que a superexpressão de Akt1 em células de câncer de mama leva a fosforilação e posterior degradação do supressor tumoral TSC2, possivelmente facilitando a progressão desse tipo de câncer (Jiang, Emonoto & Takahashi, 2009).

Apesar dos dados de *Exon Array* não mostrarem a alteração do *splicing* de Akt (resultado não mostrado), é interessante apontar que a análise das vias celulares alteradas pela superexpressão de SF2/ASF mostra diferentes proteínas pertencentes à via de PI3K/Akt/mTOR. Foram encontrados com expressão aumentada em relação ao controle os RNAs de PDK1, RICTOR e S6K, além da própria actina (a Figura 26 traz maiores detalhes sobre a via de PI3K/Akt).

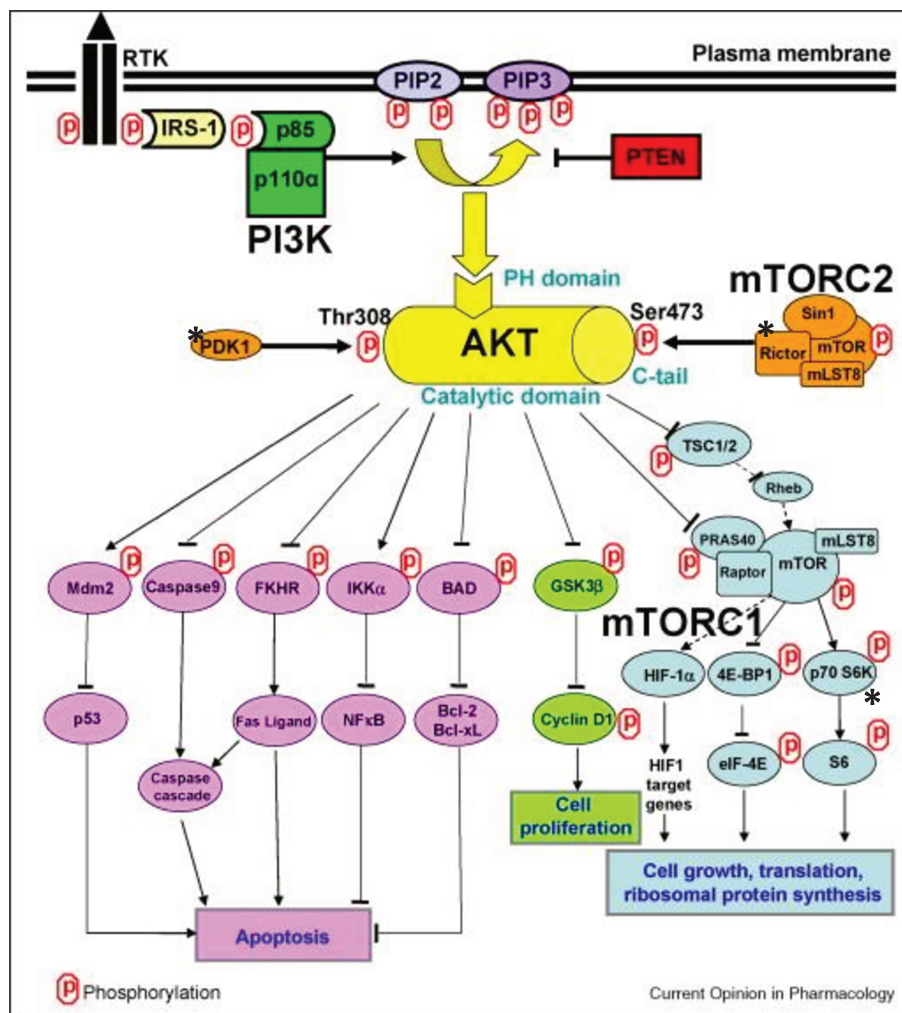


Figura 26: Representação esquemática das vias de PI3K/mTOR/AKT (Yap *et al.*, 2008). Essa via biológica está ligada ao balanço entre apoptose e crescimento celular, passo inicial para a proliferação. Está destacado com um asterisco a proteína p70-S6K, componente da via mTORC1 (em azul) encontrado com expressão alterada nos *Exon Arrays*. Segundo Karni e colaboradores (2008), a proteína p70-S6K (efetor final da via de mTORC1), teria o *splicing* de suas isoformas alterado por SF2/ASF e, através delas, promoveriam a ativação da via de Akt (em amarelo). Também foram encontrados alterados nos *Exon Arrays* o gene PDK1 (em laranja) e o gene RICTOR (ambos marcados com asterisco), sendo este componente da via de mTORC2 (em laranja), capaz de ativar Akt e levar à inibição de mTORC1.

Os dados publicados por Karni e colaboradores (2008) já apontavam uma relação entre o fator de *splicing* e a via de Akt/mTOR. Os autores mostraram que a superexpressão de SF2/ASF em células resultava na maior fosforilação dos substratos da via de mTORC1 S6K1 e 4E-BP1 (Figura 26), mas não afetavam a fosforilação de Akt, sugerindo que a ativação da via de mTORC1 por SF2/ASF ocorre abaixo de Akt.

Apesar do mecanismo exato de ocorrência dessa ativação ser desconhecido, os autores sugerem um mecanismo de ativação indireto, envolvendo o *splicing* alternativo de proteínas ativadoras ou inibidoras da via de mTOR. A favor desse cenário está a descoberta feita pelo mesmo grupo da expressão de uma nova isoforma de S6K induzida por SF2/ASF (Karni *et al.*, 2008). Segundo os autores, essa nova isoforma, sabidamente oncogênica, poderia, em determinado contexto celular e através de *feedback* positivo, ativar a via mTOR.

Dados mais recentes de Anczuków e colaboradores (2012) somam indícios a esse quadro ao apontar que o crescimento elevado de glândulas acinosas, observado em células de mama superexpressando SF2/ASF, é dependente da ativação da via de mTOR, sendo diminuído em células tratadas com rapamicina, inibidor da via mTOR.

Apesar de necessitarem de maior aprofundamento e confirmações estatísticas, os primeiros resultados obtidos na análise *gene level* dos efeitos de superexpressão do fator de *splicing* SF2/ASF abrem perspectivas promissoras da sua relação com a oncogênese.

Apesar de não existirem dados que indiquem a influência direta de SF2/ASF na resposta imunológica, muitas das vias alteradas no estudo de *Exon Array* têm relação com a resposta imune, e principalmente com a ativação do sistema complemento. Demonstrando uma possível e importante relação entre o *splicing* modulado por SF2/ASF e essa importante via biológica que, sabidamente, tem relação com o desenvolvimento de neoplasias.

Já com relação ao remodelamento do citoesqueleto foram confirmados dados já publicados por Karni e colaboradores (2008). E, além disso, foram observadas na análise dos resultados do *Exon Array* alterações de outros componentes da via de Akt/mTOR, indicando que, possivelmente, o fator de *splicing* SF2/ASF tem influência direta nessa via por modular o *splicing* alternativo de seus componentes, hipótese anteriormente levantada por Karni e colaboradores (2008).

Vale ressaltar que, apesar de interessantes, os dados mostrados e discutidos nesse trabalho precisam ser confirmados e analisados mais profundamente, permitindo, assim, a eleição de gene candidatos e a discussão mais aprofundada sobre o comprometimento biológico causado pela alteração de expressão de SF2/ASF. Além disso, precisam ser realizadas as análises em nível de *exon*, a *exon level analysis*, que permitirão a visualização das isoformas que são alteradas pela superexpressão de SF2/ASF e, assim, possibilitarão um estudo mais aprofundado da influência do *splicing* alternativo na perda de homeostase celular.

5. Conclusão e Perspectivas

Esse trabalho teve como objetivo tentar elucidar a relação entre a maquinaria de *splicing* e o desenvolvimento do câncer, buscando possíveis alterações no fator de *splicing* proto-oncogênico SF2/ASF e nas SR quinases SRPK1, SRPK2 e CLK1 que pudessem se relacionar à leucomogênese.

Foram encontradas duas novas isoformas da quinase SRPK2, isoladas a partir do cDNA de diferentes linhagens leucêmicas. Uma das isoformas apresenta a deleção de 163pb, enquanto a outra possui a retenção parcial de um *intron*, totalizando a inserção de 93pb. Essas alterações, em nível de proteína, parecem afetar de forma significativa a atividade da quinase SRPK2 por se localizarem em regiões próximas ao seu sítio catalítico.

Também foi observada a expressão diferencial das SR quinases SRPK1, SRPK2 e CLK1 nas diferentes leucemias estudadas, sugerindo um papel particular de cada quinase nessas leucemias. Essa análise também indicou a expressão elevada de SRPK1 em relação a SRPK2 em grande parte das linhagens, podendo ser um indício da atividade compensatória de SRPK1 na presença das isoformas de SRPK2 encontradas nesse estudo. Além disso, o quadro de alteração da expressão dessas SR quinases, somado à descoberta dessas isoformas, podem ser um indicativo da alteração global da maquinaria de *splicing* na leucemia.

Os resultados obtidos no experimento de *Exon Array*, que buscou avaliar os efeitos globais no *splicing* de células superexpressando o fator de *splicing* SF2/ASF, ressaltam a relação entre a maquinaria de edição do RNAm e o câncer. A análise *gene level* indicou alterações significativas nas vias de resposta imune e de remodelamento do citoesqueleto, sendo que esta possui relação já conhecida com o fator SF2/ASF por ele ser responsável pelo *splicing* de componentes da via de Akt/mTOR.

Como perspectiva desse trabalho, pretendemos quantificar a expressão das isoformas encontradas em linhagens leucêmicas e em células de pacientes, buscando uma correlação entre sua expressão e características biológico-clínicas da leucemia. Além disso, pretendemos realizar estudos funcionais com as isoformas de SRPK2 e também com as quinases SRPK1 e CLK1, tentando elucidar o possível papel dessas proteínas e das alterações encontradas na leucomogênese.

Já com relação ao experimento de *Exon Array*, é necessária a confirmação dos resultados obtidos na análise *gene level* e a realização da análise *exon level* dos dados, permitindo visualizar os eventos de *splicing* alterados pela superexpressão de SF2/ASF. E, dessa forma, possibilitar o maior esclarecimento sobre o mecanismo pelo qual esse fator de *splicing* se relaciona com o câncer.

6. Referências

ADESSO, L. *et al.* Gemcitabine triggers a pro-survival response in pancreatic cancer cells through activation of the MNK2/eIF4E pathway. *Oncogene*, Jul 16 2012.

ANCZUKOW, O. *et al.* The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. *Nat Struct Mol Biol*, v. 19, n. 2, p. 220-8, Feb 2012.

AUBOL, B. E. *et al.* Processive phosphorylation of alternative splicing factor/splicing factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, n. 22, p. 12601-6, Oct 28 2003.

BEILLARD, E. *et al.* Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia*, v. 17, n. 12, p. 2474-86, Dec 2003.

BLACK, D. L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem*, v. 72, p. 291-336, 2003.

BUGRIM, A.; NIKOLSKAYA, T.; NIKOLSKY, Y. Early prediction of drug metabolism and toxicity: systems biology approach and modeling. *Drug Discov Today*, v. 9, n. 3, p. 127-35, Feb 1 2004.

CASNICI, C. *et al.* Out of frame peptides from BCR/ABL alternative splicing are immunogenic in HLA A2.1 transgenic mice. *Cancer Lett*, v. 276, n. 1, p. 61-7, Apr 8 2009.

CHENAIS, B. Transposable elements and human cancer: A causal relationship? *Biochim Biophys Acta*, v. 1835, n. 1, p. 28-35, Jan 2013.

CHENAIS, B. *et al.* The impact of transposable elements on eukaryotic genomes: from genome size increase to genetic adaptation to stressful environments. *Gene*, v. 509, n. 1, p. 7-15, Nov 1 2012.

COOPER, T. A.; WAN, L.; DREYFUSS, G. RNA and disease. *Cell*, v. 136, n. 4, p. 777-93, Feb 20 2009.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*, v. 16, n. 22, p. 10881-90, Nov 25 1988.

DEMBOWSKI, J. A. *et al.* Alternative Splicing of a Novel Inducible Exon Diversifies the CASK Guanylate Kinase Domain. *J Nucleic Acids*, v. 2012, p. 816237, 2012.

DOLNIK, A. *et al.* Genome-wide analysis of alternative splicing points to novel leukemia relevant genes in acute Myeloid Leukemia. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts), p: 114:2391, 2009.

DUNN, G. P. *et al.* Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, v. 3, n. 11, p. 991-8, Nov 2002.

EZPONDA, T. *et al.* The oncoprotein SF2/ASF promotes non-small cell lung cancer survival by enhancing survivin expression. *Clin Cancer Res*, v. 16, n. 16, p. 4113-25, Aug 15 2010.

GARCIA-MANERO, G. Myelodysplastic syndromes: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*, v. 87, n. 7, p. 692-701, Jul 2012.

GAUTREY, H. L.; TYSON-CAPPER, A. J. Regulation of Mcl-1 by SRSF1 and SRSF5 in Cancer Cells. *PLoS One*, v. 7, n. 12, p. e51497, 2012.

GENTLEMAN, R. Reproducible research: a bioinformatics case study. *Stat Appl Genet Mol Biol*, v. 4, p. Article2, 2005.

GENTLEMAN, R. C. *et al.* Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*, v. 5, n. 10, p. R80, 2004.

GIANNAKOUROS, T. *et al.* Serine-arginine protein kinases: a small protein kinase family with a large cellular presence. *FEBS J*, v. 278, n. 4, p. 570-86, Feb 2011.

GROSSO, A. R.; MARTINS, S.; CARMO-FONSECA, M. The emerging role of splicing factors in cancer. *EMBO Rep*, v. 9, n. 11, p. 1087-93, Nov 2008.

GUI, J. F.; LANE, W. S.; FU, X. D. A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature*, v. 369, n. 6482, p. 678-82, Jun 23 1994.

HALLEGGER, M.; LLORIAN, M.; SMITH, C. W. Alternative splicing: global insights. *FEBS J*, v. 277, n. 4, p. 856-66, Feb 2010.

HAYES, G. M.; CARRIGAN, P. E.; MILLER, L. J. Serine-arginine protein kinase 1 overexpression is associated with tumorigenic imbalance in mitogen-activated protein kinase pathways in breast, colonic, and pancreatic carcinomas. *Cancer Res*, v. 67, n. 5, p. 2072-80, Mar 1 2007.

HAYES, J. *et al.* A role for protein kinase A and protein kinase M zeta in muscarinic acetylcholine receptor-initiated persistent synaptic enhancement in rat hippocampus in vivo. *Neuroscience*, v. 151, n. 2, p. 604-12, Jan 24 2008.

HISHIZAWA, M. *et al.* Serological identification of adult T-cell leukaemia-associated antigens. *Br J Haematol*, v. 130, n. 3, p. 382-90, Aug 2005.

HONG, Y.; JANG, S. W.; YE, K. The N-terminal fragment from caspase-cleaved serine/arginine protein-specific kinase2 (SRPK2) translocates into the nucleus and promotes apoptosis. *J Biol Chem*, v. 286, n. 1, p. 777-86, Jan 7 2011.

HU, A.; FU, X. D. Splicing oncogenes. *Nat Struct Mol Biol*, v. 14, n. 3, p. 174-5, Mar 2007.

INCA. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, Brasil: Divisão de Tecnologia da Informação (DTI), 2011. 118 ISBN 978-85-7318-194-4.

IRIE, H. Y. *et al.* Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*, v. 171, n. 6, p. 1023-34, Dec 19 2005.

JANG, S. W. *et al.* Interaction of Akt-phosphorylated SRPK2 with 14-3-3 mediates cell cycle and cell death in neurons. *J Biol Chem*, v. 284, n. 36, p. 24512-25, Sep 4 2009.

JANG, S. W. *et al.* Serine/arginine protein-specific kinase 2 promotes leukemia cell proliferation by phosphorylating acinus and regulating cyclin A1. *Cancer Res*, v. 68, n. 12, p. 4559-70, Jun 15 2008.

JHAVAR, S. *et al.* Integration of ERG gene mapping and gene-expression profiling identifies distinct categories of human prostate cancer. *BJU Int*, v. 103, n. 9, p. 1256-69, May 2009.

JIANG, P.; ENOMOTO, A.; TAKAHASHI, M. Cell biology of the movement of breast cancer cells: intracellular signalling and the actin cytoskeleton. *Cancer Lett*, v. 284, n. 2, p. 122-30, Nov 1 2009.

KARNI, R. *et al.* The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol*, v. 14, n. 3, p. 185-93, Mar 2007.

KARNI, R. *et al.* The splicing-factor oncoprotein SF2/ASF activates mTORC1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105, n. 40, p. 15323-7, Oct 7 2008.

KENNEDY, J. A.; BARABE, F. Investigating human leukemogenesis: from cell lines to in vivo models of human leukemia. *Leukemia*, v. 22, n. 11, p. 2029-40, Nov 2008.

KERVESTIN, S.; JACOBSON, A. NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 13, n. 11, p. 700-12, Nov 2012.

KOIZUMI, J. *et al.* The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by direct interaction with SR protein kinases (SRPKs). *J Biol Chem*, v. 274, n. 16, p. 11125-31, Apr 16 1999.

KOLEV, M.; TOWNER, L.; DONEV, R. Complement in cancer and cancer immunotherapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, v. 59, n. 6, p. 407-19, Dec 2011.

KRUMMEL, D. *et al.* Crystal structure of human spliceosomal U1 snRNP at 5.5 Å resolution. *Nature*, v. 458, p. 475-481, Mar 2009.

LEU, S. *et al.* Loss of Pnn expression results in mouse early embryonic lethality and cellular apoptosis through SRSF1-mediated alternative expression of Bcl-xS and ICAD. *J Cell Sci*, v. 125, n. Pt 13, p. 3164-72, Jul 1 2012.

LI, C.; WONG, W. H. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, n. 1, p. 31-6, Jan 2 2001.

LOPEZ-MEJIA, I. C. *et al.* A conserved splicing mechanism of the LMNA gene controls premature aging. *Hum Mol Genet*, v. 20, n. 23, p. 4540-55, Dec 1 2011.

LOVELAND, B. E.; CEBON, J. Cancer exploiting complement: a clue or an exception? *Nat Immunol*, v. 9, n. 11, p. 1205-6, Nov 2008.

MACIEJEWSKI, J. P.; PADGETT, R. A. Defects in spliceosomal machinery: a new pathway of leukaemogenesis. *Br J Haematol*, v. 158, n. 2, p. 165-73, Jul 2012.

MAEDER, C.; GUTHRIE, C. Modifications target spliceosome dynamics. *Nat Struct Mol Biol*, v. 15, n. 5, p. 426-8, May 2008.

MARKIEWSKI, M. M. *et al.* Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol*, v. 9, n. 11, p. 1225-35, Nov 2008.

MEILI, R. *et al.* Chemoattractant-mediated transient activation and membrane localization of Akt/PKB is required for efficient chemotaxis to cAMP in Dictyostelium. *EMBO J*, v. 18, n. 8, p. 2092-105, Apr 15 1999.

MITELMAN, F.; JOHANSSON, B.; MERTENS, F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer*, v. 7, n. 4, p. 233-45, Apr 2007.

MUNOZ, U. *et al.* Hepatocyte growth factor enhances alternative splicing of the Kruppel-like factor 6 (KLF6) tumor suppressor to promote growth through SRSF1. *Mol Cancer Res*, v. 10, n. 9, p. 1216-27, Sep 2012.

NGO, J. C. *et al.* Interplay between SRPK and Clk/Sty kinases in phosphorylation of the splicing factor ASF/SF2 is regulated by a docking motif in ASF/SF2. *Mol Cell*, v. 20, n. 1, p. 77-89, Oct 7 2005.

NGO, J. C. *et al.* SR protein kinase 1 is resilient to inactivation. *Structure*, v. 15, n. 1, p. 123-33, Jan 2007.

NIKOLAKAKI, E. *et al.* Cloning and characterization of an alternatively spliced form of SR protein kinase 1 that interacts specifically with scaffold attachment factor-B. *J Biol Chem*, v. 276, n. 43, p. 40175-82, Oct 26 2001.

NIKOLSKY, Y. *et al.* A novel method for generation of signature networks as biomarkers from complex high throughput data. *Toxicol Lett*, v. 158, n. 1, p. 20-9, Jul 28 2005.

NOLEN, B.; TAYLOR, S.; GHOSH, G. Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell*, v. 15, n. 5, p. 661-75, Sep 10 2004.

OKONIEWSKI, M. J.; MILLER, C. J. Comprehensive analysis of affymetrix exon arrays using BioConductor. *PLoS Comput Biol*, v. 4, n. 2, p. e6, Feb 2008.

PEIRIS-PAGES, M. The role of VEGF 165b in pathophysiology. *Cell Adh Migr*, v. 6, n. 6, p. 561-8, Nov 1 2012.

PEKOVA, S. *et al.* Identification of a novel, transactivation-defective splicing variant of p53 gene in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*, v. 32, n. 3, p. 395-400, Mar 2008.

PLOCINIK, R. M. *et al.* Regulating SR protein phosphorylation through regions outside the kinase domain of SRPK1. *J Mol Biol*, v. 410, n. 1, p. 131-45, Jul 1 2011.

POLLARD, A. J. *et al.* Alternative splicing of the adenylyl cyclase stimulatory G-protein G alpha(s) is regulated by SF2/ASF and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNPA1) and involves the use of an unusual TG 3'-splice Site. *J Biol Chem*, v. 277, n. 18, p. 15241-51, May 3 2002.

QUERY, C. C. Structural biology: Spliceosome subunit revealed. *Nature*, v. 458, n. 7237, p. 418-9, Mar 26 2009.

RICKLIN, D. *et al.* Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*, v. 11, n. 9, p. 785-97, Sep 2010.

SALESSE, S.; DYLLA, S. J.; VERFAILLIE, C. M. p210BCR/ABL-induced alteration of pre-mRNA splicing in primary human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Leukemia*, v. 18, n. 4, p. 727-33, Apr 2004.

SEBBAN, S. *et al.* Alternatively spliced lysyl oxidase-like 4 isoforms have a pro-metastatic role in cancer. *Clin Exp Metastasis*, v. 30, n. 1, p. 103-17, Jan 2013.

SIMON, R. Analysis of DNA microarray expression data. *Best Pract Res Clin Haematol*, v. 22, n. 2, p. 271-82, Jun 2009.

SKOTHEIM, R. I.; NEES, M. Alternative splicing in cancer: noise, functional, or systematic? *Int J Biochem Cell Biol*, v. 39, n. 7-8, p. 1432-49, 2007.

SUN, C.; SOUTHARD, C.; DI RIENZO, A. Characterization of a novel splicing variant in the RAPTOR gene. *Mutat Res*, v. 662, n. 1-2, p. 88-92, Mar 9 2009.

SWANN, J. B.; SMYTH, M. J. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest*, v. 117, n. 5, p. 1137-46, May 2007.

TALUKDAR, I. *et al.* hnRNP A1 and hnRNP F modulate the alternative splicing of exon 11 of the insulin receptor gene. *PLoS One*, v. 6, n. 11, p. e27869, 2011.

VENABLES, J. P. Unbalanced alternative splicing and its significance in cancer. *Bioessays*, v. 28, n. 4, p. 378-86, Apr 2006.

VISCONTE, V. *et al.* Emerging roles of the spliceosomal machinery in myelodysplastic syndromes and other hematological disorders. *Leukemia*, v. 26, n. 12, p. 2447-54, Dec 2012.

WANG, G. S.; COOPER, T. A. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet*, v. 8, n. 10, p. 749-61, Oct 2007.

WANG, H. Y. *et al.* SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J Cell Biol*, v. 140, n. 4, p. 737-50, Feb 23 1998.

WARD, A. J.; COOPER, T. A. The pathobiology of splicing. *J Pathol*, v. 220, n. 2, p. 152-63, Jan 2010.

WASIM, M. *et al.* PLZF/ZBTB16, a glucocorticoid response gene in acute lymphoblastic leukemia, interferes with glucocorticoid-induced apoptosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v. 120, n. 4-5, p. 218-27, Jun 2010.

WIEMELS, J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chem Biol Interact*, v. 196, n. 3, p. 59-67, Apr 5 2012.

WILTGEN, M.; TILZ, G. P. DNA microarray analysis: principles and clinical impact. *Hematology*, v. 12, n. 4, p. 271-87, Aug 2007.

YAP, T. A. *et al.* Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Curr Opin Pharmacol*, v. 8, n. 4, p. 393-412, Aug 2008.

YENERALL, P.; ZHOU, L. Identifying the mechanisms of intron gain: progress and trends. *Biol Direct*, v. 7, p. 29, 2012.

YILMAZ, M.; CHRISTOFORI, G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*, v. 28, n. 1-2, p. 15-33, Jun 2009.

YOSHIDA, K. *et al.* Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*, v. 478, n. 7367, p. 64-9, Oct 6 2011.

ZHANG, S. X. *et al.* Alternative promoter usage and alternative splicing contribute to mRNA heterogeneity of mouse monocarboxylate transporter 2. *Physiol Genomics*, v. 32, n. 1, p. 95-104, Dec 19 2007.

ZHONG, X. Y. *et al.* SR proteins in vertical integration of gene expression from transcription to RNA processing to translation. *Mol Cell*, v. 35, n. 1, p. 1-10, Jul 10 2009.

7. Anexos

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: SF2/ASF e suas quinases: relação entre splicing alternativo e o desenvolvimento da leucemia.

Pesquisador responsável: Jörg Kobarg

Experimentador: Germanna Lima Righetto

Nível do treinamento do experimentador: []-Iniciação científica, [X]-mestrado, []-doutorado,

[]-doutorado direto, []-pós-doutorado, []-nível técnico, []-outro, especifique: _____

Resumo do projeto:

O processo de splicing alternativo é responsável por orquestrar a junção de éxons, criando uma grande diversidade de isoformas gênicas. Alterações no processamento da fita de pré-mRNA podem causar ou contribuir para uma infinidade de doenças, dentre elas o câncer. O fator de splicing SF2/ASF foi o primeiro a ser caracterizado como proto-oncogênico, estando superexpresso ou amplificado em diferentes tipos de neoplasias (Karni et al. 2007). Sabe-se que a ativação desse fator é mediada por proteíno-quinases específicas, conhecidas como splicing-quinases. A quinase SRPK1, responsável pela fosforilação de SF2/ASF, tem conhecida superexpressão em leucemias, além de uma modulação negativa da eficácia de quimioterápicos conhecidos. Outra quinase relacionada ao fator SF2/ASF, a SRPK2, também parece estar relacionada com a proliferação de células leucêmicas e sua diferenciação. Através de análises de células superexpressando SRPK1 e SRPK2 por Exon Arrays (Affymetrix), da quantificação da expressão dessas quinases em amostras de pacientes portadores de leucemia por qRT-PCR e do sequenciamento de seus cDNAs em células leucêmicas, pretendemos nesse projeto buscar possíveis alterações que estejam associadas a essas SR quinases e seu contexto no desbalanço genético e bioquímico de uma célula tumoral, como a leucêmica.

A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 7.12.2010.

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

Jörg Kobarg
Presidente de CIBio - ABTLuS
Prof. Dr. Jörg Kobarg

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

Andrea Balan
Membro da CIBio - ABTLuS
Prof. Dr. Andrea Balan



CEP, 26/05/09.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 404/2009 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0004.0.144.146-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "A ATIVIDADE DE SPLICING DE PRÉ-MRNA E A SUA RELEVÂNCIA PARA A ONCOGÊNESE".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: José Andrés Yunes.

INSTITUIÇÃO: Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Domingos A. Boldrini – SP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 08/05/2009

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 26/05/10 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Obter novas respostas para o papel oncogênico do desbalanço na atividade de splicing dos fatores SF2/ASF, SRPK1 E CLK/STY, bem como a sua relação com a leucemia infantil.. Avaliar de forma retrospectiva a expressão de ASF/SF2 e das SR quinases SRPKC1 e CLK/STY, por RO-PCR, EM bastos de crianças com leucemia mieloide aguda e leucemia linfóide aguda, buscando tecer associações entre os níveis de expressão desses genes e características biológico/clinicas dos pacientes

III - SUMÁRIO

Em amostras consecutivas retrospectivas (DNA E cDNA do banco de biologia molecular do centro Boldrini) de crianças com LMA e LLA onde se investigará translocações cromossômicas e mutações, comparando com casos normais, e com estas análises buscar um padrão dentre as alterações que possa justificar os achados clínicos e patológicos das patologias descritas.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trabalho de grande relevância pois a análise das cadeias de DNA e cDNA, quer por PCR, PCR quantitativo, análise de associações gênica, mutações e os dados clínicos dos pacientes, produção viral, tradução e transporte de medula óssea murina, vão tentar catalogar as mudanças e as expressões clinica e biológicas. Os critérios de inclusão são claros e a dispensa do termo de consentimento pelos argumentos de utilizar material do banco de biologia molecular do Boldrini, com autorização previa da coleta anterior, com cópia anexa da autorização.

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, bem como ter aprovado a dispensa do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim 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.

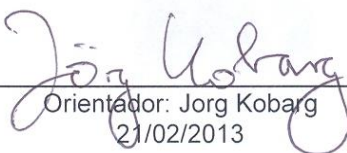
VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de maio de 2009.

Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

DECLARAÇÃO

Eu, Jorg Kobarg, declaro a existência de vínculo entre o trabalho apresentado na tese de mestrado da aluna Germana Lima Righetto, intitulada: “**SF2/ASF e SRPK2: relação entre a maquinaria de *splicing* alternativo e o desenvolvimento da leucemia**”, e o projeto “**A atividade de *splicing* de pré-mRNA e sua relevância para a oncogênese**”, aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas (CEP), em 26/05/09, número do parecer 404/2009.


Orientador: Jorg Kobarg
21/02/2013