

FABÍOLA TRAINA

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA PROTEÍNA
COM REPETIÇÕES DE ANQUIRINA, ANKHD1, NA
HEMATOPOESE NORMAL E LEUCÊMICA**



UNICAMP

Campinas

2007

FABÍOLA TRAINA

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA PROTEÍNA
COM REPETIÇÕES DE ANQUIRINA, ANKHD1, NA
HEMATOPOESE NORMAL E LEUCÊMICA**

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

Orientadora: Sara Teresinha Olalla Saad

Campinas

2007

*FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044*

Txxx	<p>Traina, Fabíola</p> <p>Caracterização de uma nova proteína com repetições de anquirina, ANKHD1, na hematopoese normal e leucêmica / Fabíola Traina. Campinas, SP : [s.n.], 2007.</p> <p>Orientador : Sara Teresinha Ollala Saad</p> <p>Tese(Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p>1. Leucemia. 2. Proteína tirosina Fosfatase . 3. Citoesqueleto.</p> <p>I. Saad , Sara Teresinha Ollala. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</p>
------	---

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Sara Teresinha Olalla Saad

Professora Doutora Irene Lorand Metze

Professor Doutor Lício Augusto Velloso

Professora Doutora Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille

Professor Doutor Eduardo Magalhães Rego

Professora Doutora Sara Teresinha Olalla Saad

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

Data: 15/02/2007

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus estimados e queridos pais, Jaime e Marilda, exemplos de primeira grandeza na minha vida, e às minhas queridas irmãs, Évelyn e Andréia, minhas melhores e eternas amigas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jaime e Marilda, e às minhas irmãs, Évelyn e Andréia, pelo constante apoio, incentivo, carinho, amizade, compreensão, amor e pela linda família que compomos. Agradeço por compartilharem de minhas conquistas, dos momentos de incertezas e de alegria. Ao meu cunhado, Marcelo, agradeço a alegria que nos trouxe.

À minha orientadora Profa. Dra. Sara Saad, por sua orientação na realização deste trabalho, na minha vida pessoal e profissional. Agradeço a sua compreensão, confiança, as oportunidades oferecidas e o privilégio de trabalhar ao seu lado; um exemplo de pessoa, médica, professora e orientadora. A finalização deste trabalho é mais uma conquista que compartilhamos juntas, fruto de sua orientação.

Ao Prof. Dr. Mário Saad, pela sua orientação no projeto de iniciação científica, realizado durante minha graduação, e pela disponibilidade de seu laboratório. Agradeço à sua equipe que participou da minha introdução à medicina experimental; em especial, ao amigo e Prof. Dr. José Barreto Carvalheira, à amiga Dra. Leila M. Romantini, à Profa. Dra. Carla R. O. Carvalho e ao biólogo Sr. Luiz Janeri.

Ao Prof. Dr. Kleber Franchini, pela disponibilidade de seu laboratório.

Ao Dr. Jörg Kobarg, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS). Agradeço ao Dr Jörg e ao seu aluno Alexandre Quaresma por me receberem e me ajudarem a desvendar alguns mistérios da metodologia do duplo híbrido.

Ao Prof. Dr. Aníbal E. Vercesi, pela disponibilidade de seu laboratório. À doutoranda Giovanna R. Degasperi, agradeço a excelente recepção e auxílio nos experimentos.

À minha amiga Patrícia Favaro, pela presença constante, força e incentivo durante a realização deste trabalho. Agradeço a sua sincera amizade.

Aos alunos e equipe de trabalho da Dra. Sara que me auxiliaram em diferentes momentos durante a realização deste trabalho; em especial à Tereza, que sempre me incentivou e me guiou na resolução dos mistérios de cada experimento. A todos os alunos, Adriana, Carol, Luciene, Maria Teresa, Mariana, Sheila, Marianinha, Patrícia Rodrigues,

Cláudia, Paulo e Marcelo, agradeço a oportunidade de compartilhar as experiências e o carinho.

Aos alunos de graduação e amigos Samuel, Paula e Bruno, que compartilharam diferentes momentos da realização deste trabalho e me permitiram opinar na realização de seus trabalhos. Agradeço a nossa orientadora Dra Sara por me conceder a oportunidade do contato com os alunos.

Às amigas Nicola Conran e Andréia Canalli, pela oportunidade de compartilhar as experiências acadêmicas e pessoais.

Aos queridos médicos e amigos Margareth, Gislaine, Aranha, Katinha e Daniela que sempre me apoiaram na realização deste trabalho, na minha vida pessoal e profissional.

Agradeço aos médicos e colegas de trabalho André, Márcia, Fernanda, Erich, Malu, Simone, Afonso, Kátia Eid, Marcelo e Vagner por participarem de minha vida profissional sempre com muito incentivo.

Aos docentes da disciplina de Hematologia da UNICAMP, Dr. Fernando F. Costa, Dra. Irene Lorand-Metze, Dr. Cármino A. de Souza e Dra. Joyce M. Annichino-Bizzacchi, pela participação na minha formação médica.

Aos pacientes, um agradecimento especial, pois sem eles este trabalho não teria sido idealizado nem realizado.

À Eliana Miranda pelo auxílio estatístico.

À Arlete e ao Leonardo pelo apoio didático durante a realização deste trabalho.

Às secretárias Patrícia e Raquel pela disponibilidade no serviço burocrático e amizade.

Às agências financiadoras, FAPESP, CNPq e CAPES.

Agradeço a Deus a oportunidade da vida, da saúde, de uma família feliz, de ter conhecido todas as pessoas aqui citadas, de ter seguido este caminho e, mais uma vez, conquistar um objetivo.

“PARA SER GRANDE, sê inteiro: nada

Teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa. Põe quanto és

No mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda

Brilha, porquê alta vive.”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vii
RESUMO	xxvii
ABSTRACT	xxxix
INTRODUÇÃO.....	35
Citoesqueleto de Espectrina e Estrutura das Anquirinas	38
ANKHD1	40
Tirosina Fosfatase SHP2	43
OBJETIVOS.....	49
Objetivos gerais	51
Objetivos específicos	51
MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
Casuística e Linhagens Celulares	55
Tecidos humanos normais	55
Células hematopoéticas normais	55
Células hematopoéticas de pacientes com diagnóstico de Leucemia Aguda	55
Exames para diagnóstico de Leucemia Aguda	56
Linhagens celulares	57
Métodos	58
Análise Computacional	58
Extração do RNA total	58
Tratamento do RNA total com DNase I	59
Transcrição em cDNA	59
RT-PCR em tempo real	59
Produção do anticorpo anti-ANKHD1	60
<i>Western Blotting</i>	61
Extração de proteínas citoplasmáticas e nucleares	63
Microscopia confocal	63
Sistema de duplo híbrido em levedura	64

Linhagens de bactérias e leveduras utilizadas	65
Vetores utilizados	66
Preparação da isca ANKHD1	67
Transformação da isca na AH109	68
Teste de toxicidade da isca	69
Teste da ativação da transcrição ou auto-ativação.....	69
Ensaio para verificar a expressão e estabilidade da proteína híbrida na levedura.....	69
Rastreamento	70
Titulação da biblioteca.....	71
Viabilidade do rastreamento e número de colônias rastreadas.....	71
Ensaio de beta-galactosidase	72
Mini-preparação de DNA de levedura.....	72
Seqüenciamento de DNA	73
Análise das seqüências	73
Teste de co-transformação em levedura para confirmação da interação ANKHD1 e SIVA	73
RNA de interferência.....	74
Estudo da apoptose celular	75
Análise Estatística	75
RESULTADOS	77
1. Análise da expressão gênica de ANKHD1 em leucemias agudas, através da técnica de RT-PCR em tempo real	79
2. Análise da expressão da proteína ANKHD1 em células hematopoéticas normais e linhagens de células leucêmicas, através da técnica de <i>Western Blotting</i>	81
3. Análise da expressão da proteína ANKHD1 em diferentes tecidos humanos normais, através da técnica de <i>Western Blotting</i>	82
4. Estudo da localização celular de ANKHD1 através da técnica de microscopia confocal e separação de frações celulares	83
5. Estudo da associação de ANKHD1 com SHP2 em células leucêmicas	85
6. Estudo da fosforilação de ANKHD1	88
7. Ensaio de duplo-híbrido em levedura.....	88

8.	Confirmação da interação de ANKHD1 com SIVA1 e SIVA2	92
9.	Estudo da função de ANKHD1 na apoptose, após sua inibição por RNAi.....	93
DISCUSSÃO		97
CONCLUSÃO.....		107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		111
ANEXOS		123
	Anexo I	125
	Anexo II.....	128
APÊNDICES		131
	Apêndice I.....	133
	Apêndice II	141

LISTA DE ABREVIACÕES

4E-BP3 – *4E-binding protein 3*

4E-BPs – *eIF4E-binding proteins*

ANKHD1 – *Ankyrin Repeat Single KH Domain containing 1*

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

cDNA – *complementary DNA*

CSW – *Corkscrew*

DNA – *Desoxiribonucleic Acid*

DO – *Densidade Óptica*

EIF4EBP3 – *Eukaryotic Initiation Factor 4E-Binding-Protein 3*

EST – *Expression Sequence Tags*

FAB – *French-American-British*

FITC - *Fluorescein Isothiocyanate*

HA – *Hemagglutinin*

hMASK – *Human MASK*

hMASK-BP3^{ARF} – *Human MASK-4E-Binding Protein 3 Alternative Reading Frame*

KH – *K homology domain*

LLA – *Leucemia Linfóide Aguda*

LMA – *Leucemia Mielóide Aguda*

LMMC – *Leucemia Mielomonocítica Crônica*

LMC – *Leucemia Mielóide Crônica*

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

ORESTES – *Open Reading frame ESTs*

PE – *Phycoeritrine*

PerCP – *Peridinin-chlorophyll-protein Complex*

RNA – *Ribonucleic Acid*

RNAi – *RNA interference*

RT-PCR – *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*

SHP2 – *Src homology-2 domain-containing protein tyrosine phosphatase*

SP – *Sangue Periférico*

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Pacientes com diagnóstico de Leucemia Aguda.....	57
Tabela II: Resultado do BLAST das seqüências obtidas do ensaio de duplo híbrido com a isca ANKHD1 e a biblioteca de medula óssea humana normal.	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura protéica primária de ANKHD1.....	40
Figura 2: Representação esquemática do DNA genômico do cromossomo 5 e dos transcritos resultantes de clivagem alternativa.....	42
Figura 3: Representação esquemática simplificada da estrutura protéica primária e ativação de SHP2.....	44
Figura 4: Representação esquemática da participação de SHP2 na ativação da via RAS e AKT.....	46
Figura 5: Representação da predição da imunogenicidade da sequência de aminoácidos 2423 a 2437 de ANKHD1.....	61
Figura 6: Representação esquemática do ensaio de duplo híbrido em levedura.....	65
Figura 7: Representação esquemática dos vetores pGBKT7, pACT2 e pGADT7 utilizados no ensaio de duplo híbrido em levedura.....	66
Figura 8: Representação esquemática da estrutura protéica primária de ANKHD1 e a localização da região protéica de ANKHD1 utilizada no ensaio de duplo-híbrido em levedura.....	67
Figura 9: Representação esquemática das construções de SIVA1, SIVA2, e de diferentes regiões da SIVA1 fusionadas ao vetor pGADT7, utilizadas para co-transformar leveduras AH109 com a isca ANKHD1.....	74
Figura 10: Expressão do RNAm de ANKHD1 em linhagens de células leucêmicas.....	79
Figura 11: Expressão do RNAm de ANKHD1 em células leucêmicas de pacientes.....	80
Figura 12: Expressão protéica de ANKHD1 em células hematopoéticas normais e leucêmicas.....	82
Figura 13: Análise por Western Blotting da expressão protéica de ANKHD1 em tecidos humanos normais.....	83
Figura 14: Imunolocalização fluorescente de ANKHD1 em células hematopoéticas normais.....	84
Figura 15: Imunolocalização fluorescente de ANKHD1 em células leucêmicas.....	84
Figura 16: Análise por Western Blotting da expressão de ANKHD1 em frações celulares.....	85

Figura 17: Estudo da associação de ANKHD1 e SHP2 em células K562 e LNCaP.	86
Figura 18: Estudo da associação de ANKHD1 e SHP2 em células Daudi.	87
Figura 19: Expressão protéica de SHP2 em linhagens de células leucêmicas.	87
Figura 20: Estudo da fosforilação de ANKHD1 em células K562 e Jurkat.	88
Figura 21: Alinhamento da seqüência protéica obtida a partir do seqüenciamento do DNA obtido da levedura que cresceu na triagem do ensaio de duplo híbrido realizado entre isca ANKHD1 e a biblioteca de medula óssea humana (clone), da proteína SIVA1 (número de acesso NP006418) e da proteína SIVA2 (número de acesso NP068355).	91
Figura 22: Representação esquemática da proteína SIVA1 e SIVA2.	92
Figura 23: Resultado do teste de co-transformação em levedura.	93
Figura 24: Inibição da expressão protéica de ANKHD1 através de RNAi em células leucêmicas.	94
Figura 25: Apoptose celular após inibição de ANKHD1 por RNAi.	95
Figura 26: Representação esquemática da suposta função anti-apoptótica da ANKHD1 através de sua associação com a SIVA.	106

RESUMO

Importante passo para a compreensão dos processos fisiopatológicos das neoplasias é a identificação de genes ativamente expressos e das funções biológicas de cada proteína codificada por estes genes. *Ankyrin Repeat Single KH Domain containing 1* (ANKHD1) foi inicialmente identificada em células de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP), no ano de 2003. Entretanto, seu padrão de expressão e sua função ainda não haviam sido caracterizados. A ANKHD1 é uma proteína ortóloga à *Multiple Ankyrin repeat and single KH domain* (Mask) da *Drosophila melanogaster*. Mask foi identificada através de um rastreamento genético utilizado para detectar novas proteínas associadas à proteína tirosina fosfatase *Corkscrew* (CSW), homóloga à *Src Homology-2 domain-containing protein tyrosine Phosphatase-2* (SHP2) humana. SHP2 é uma fosfatase de tirosina citoplasmática codificada pelo gene *PTPN11* e exerce papel fundamental no desenvolvimento da hematopoese normal e leucêmica. Os objetivos gerais do presente estudo foram caracterizar o padrão de expressão gênica e protéica de ANKHD1 em células hematopoéticas normais e leucêmicas e sua participação nas vias de sinalização celular.

Neste estudo, foi demonstrada a elevada expressão gênica e protéica de ANKHD1 em linhagens de leucemias agudas humanas (KG-1, HEL, K562, NB4, HL-60, Jurkat, MOLT4, Raji, Daudi e Namalwa) e em amostras de 38 pacientes com diagnóstico de leucemia aguda, quando comparadas às células hematopoéticas normais. A expressão protéica de ANKHD1 em diferentes tecidos humanos normais (rim, baço, estômago, intestino delgado, músculo esquelético, fígado, pulmão e linfonodo) foi detectada em intensidades variáveis. A associação da ANKHD1 com SHP2 foi identificada, através de *Western Blotting*, em células de leucemia mielóide crônica em fase blástica (K562) e células LNCaP. Entretanto, esta associação não foi detectada nas linhagens leucêmicas KG1, HL60, Daudi e Jurkat. A ANKHD1 foi localizada no citoplasma de células hematopoéticas normais e leucêmicas. Detectou-se a fosforilação de ANKHD1 em serina em células leucêmicas, mas não em células hematopoéticas normais.

Através de ensaio de duplo híbrido em levedura, utilizando-se uma biblioteca de cDNA de medula óssea humana normal, detectou-se a interação de ANKHD1 com as proteínas SIVA1 e SIVA2, proteínas pró-apoptóticas altamente expressas em linhagens de

leucemia linfóide aguda. Análises preliminares indicaram que a inibição da expressão protéica de ANKHD1, através de RNAi, induziu à apoptose celular em células leucêmicas, sugerindo uma função anti-apoptótica à ANKHD1.

Em conclusão, o presente estudo identificou ANKHD1 como uma nova proteína altamente expressa em leucemias agudas, associada à SHP2 e SIVA em diferentes células, e, possivelmente, envolvida com o fenótipo anormal da célula leucêmica através de uma função anti-apoptótica. Os achados aqui descritos sugerem que ANKHD1 pode ser uma molécula alvo para a terapia da leucemia no futuro, e permitirão direcionar novos estudos com o objetivo de melhor elucidar as funções específicas de ANKHD1 em diferentes células hematopoéticas normais e leucêmicas.

ABSTRACT

One step in the path towards building a comprehensive molecular portrait of human cancer is the definition of actively expressed genes and the function of their coding proteins. The Ankyrin Repeat Single KH Domain containing 1 protein (ANKHD1) was first described in humans in a prostate carcinoma cell line LNCaP, in 2003; however, its expression pattern and its function have not yet been described. ANKHD1 is an orthologous protein of the *Drosophila melanogaster*, MASK (Multiple Ankyrin repeat and single KH domain), where it was first identified using a genetic screen designed to discover proteins that interact with the protein tyrosine phosphatase Corkscrew (CSW), which is a homolog to the SH2-containing protein tyrosine phosphatase (SHP2) in humans. SHP2 is a cytoplasmic protein-tyrosine phosphatase, coded by the *PTPN11* gene and plays an important role in the development of normal hematopoiesis and leukemogenesis. The aim of the present study was to characterize the gene and protein expression pattern of ANKHD1 in normal hematopoietic cells and in leukemia cells, and its role in signaling pathways.

In the present study, the overexpression of *ANKHD1* mRNA and its protein was demonstrated in human leukemia cell lines (KG-1, HEL, K562, NB4, HL-60, Jurkat, MOLT4, Raji, Daudi and Namalwa) and in 38 patients with a diagnosis of acute leukemia, compared to normal hematopoietic cells. The ANKHD1 protein was found to have a variable expression in different normal tissues (kidney, spleen, stomach, small intestine, skeletal muscle, liver, lung and lymph node). An association of ANKHD1 and SHP2 was found, through immunoprecipitation and Western Blotting, in the chronic myeloid leukemia blastic phase cell line (K562) and in LNCaP cells. However, this association was not detected in the leukemia cell lines, KG1, HL60, Daudi and Jurkat. ANKHD1 was found located in the cytoplasm of normal hematopoietic cells and leukemia cells. ANKHD1 was found to be phosphorylated at serine in leukemic cells, but not in normal hematopoietic cells.

Through the yeast two-hybrid system, using a cDNA library from normal human bone marrow, the interaction of ANKHD1 with SIVA1 and SIVA2 was detected. SIVA isoforms are pro-apoptotic proteins, overexpressed in acute lymphoblastic leukemia cell lines. Preliminary studies showed that the inhibition of ANKHD1 expression, through RNAi,

resulted in increased apoptosis in leukemic cells, which suggests an anti-apoptotic function for ANKHD1.

In conclusion, the present study identified ANKHD1 as a new protein that is overexpressed in leukemic cells. The protein interacts with SHP2 and SIVA in different cells and is probably associated with the abnormal phenotype of the leukemia cell through its anti-apoptotic function. These findings suggest that ANKHD1 may be a molecular target for a rational therapy for leukemia in the near future, and open a new field of investigation to better define the specific roles of ANKHD1 in different normal and leukemic hematopoietic cells.

INTRODUÇÃO

Neoplasias resultam de mutações genéticas ou alterações epigenéticas no genoma das células somáticas do indivíduo (Martinez-Climent et al. 2006), as quais exercem seus efeitos através de mudanças nas funções protéicas celulares. Importante passo para a compreensão dos processos fisiopatológicos das neoplasias é a identificação de genes ativamente expressos e das funções biológicas de cada proteína codificada por estes genes. Técnicas de hibridização como *microarrays* identificam muitos genes expressos em neoplasias e são amplamente utilizadas para mensurar a expressão gênica (Margalit et al. 2005). A análise de *Expression Sequence Tags* (ESTs) permite que genes expressos em diferentes tecidos humanos sejam identificados de forma alternativa, fornece informações adicionais sobre os transcritos e isoformas variantes, e representa uma nova ferramenta para o estudo de genes ainda não caracterizados (Brentani et al. 2003).

O Projeto Genoma Humano do Câncer, desenvolvido pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo e Instituto Ludwig, realizou o seqüenciamento de ESTs de tecidos humanos neoplásicos através de uma estratégia denominada *Open Reading Frame* ESTs (ORESTES), que gerava seqüências localizadas na região central dos transcritos (Dias Neto et al. 2000). O objetivo deste Projeto Genoma foi identificar novos genes de forma a suscitar novas descobertas e hipóteses que poderiam acelerar o conhecimento necessário para melhorar o diagnóstico, tratamento e entendimento do câncer em humanos. A era pós-genoma busca as funções biológicas de cada proteína codificada pelos novos genes descritos e pretende melhorar o entendimento dos processos celulares que ocorrem em diferentes organismos.

Com o objetivo de estudar novas proteínas do citoesqueleto relacionadas às neoplasias, uma EST com similaridade à proteína anquirina do citoesqueleto de espectrina, EST RC3-CT0255-200100-024-c05 (número de acesso AW854359), identificada em neoplasia de cólon, foi selecionada através das informações geradas pelo Projeto Genoma Humano do Câncer. Através de análise por similaridade, a partir da EST em estudo, utilizando-se programas disponibilizados pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, identificou-se a proteína humana denominada *Ankyrin Repeat Single KH Domain containing 1* (ANKHD1) (número de acesso AF521882), inicialmente denominada *Human Multiple Ankyrin repeat and single KH*

domain (hMASK), depositada no NCBI por Poulin e colaboradores em dezembro de 2003 (Poulin et al. 2003).

Citoesqueleto de Espectrina e Estrutura das Anquirinas

O citoesqueleto é uma importante estrutura celular composta por um extenso complexo protéico oligomérico (Beck et al. 1997) presente na superfície citoplasmática das membranas celulares (Beck e Nelson 1998). O citoesqueleto dá suporte estrutural à membrana, limita a difusão das proteínas integrais no plano da membrana e regula a formação de domínios funcionais distintos nas membranas (Beck et al. 1997). A composição de proteínas do citoesqueleto difere nos diversos compartimentos e nos diversos tipos celulares, refletindo a diversidade de funções das diferentes membranas. Existem diferentes classes de proteínas capazes de se associarem para formar uma rede oligomérica bidimensional (Bennett e Gilligan 1993; Pascual et al. 1997). Uma importante classe destas proteínas é a classe das espectrinas.

O citoesqueleto de espectrina é acoplado intimamente à membrana através da interação com uma diversidade de proteínas da membrana. Em muitos casos, esta interação é mediada pela proteína citoesquelética anquirina. A anquirina é uma molécula bifuncional com sítios de ligação separados para as proteínas da membrana e para a beta-espectrina (Peters e Lux 1993). O domínio de ligação às proteínas da membrana é dividido em quatro subdomínios interativos que atuam em diferentes combinações para gerar sítios de ligação para diversas proteínas da membrana (Michaely e Bennett 1993), indicando que a anquirina funciona como um adaptador molecular, mediando as interações entre diferentes proteínas integrais da membrana (transportadores, receptores e proteínas adesivas) e componentes do citoesqueleto (Peters e Lux 1993).

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

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

As anquirinas são proteínas globulares de cerca de 220 kDa e possuem características estruturais altamente conservadas, caracterizadas por um domínio amino-terminal de cerca de 90 kDa cuja função é realizar a ligação com os domínios citoplasmáticos de uma variedade de proteínas de membrana. Este domínio amino-terminal de ligação à membrana é especialmente interessante porque ele contém 24 repetições de 33 aminoácidos, dos quais 15 são evolutivamente bem conservados e 18 são variáveis (Lux et al. 1990). Estas repetições são denominadas "repetições de anquirina" e são encontradas em um grande número de proteínas evolutiva e funcionalmente muito diferentes, bem como em diversos organismos pertencentes a diferentes filos (Bork 1993; Peters e Lux 1993). Esta ampla distribuição filogenética inclui: a) os domínios citoplasmáticos das proteínas de membrana envolvidas na diferenciação celular, como as proteínas Lin12 e Glp-1 de *Caenorhabditis elegans* e a proteína Notch de *Drosophila* (Austin e Kimble 1989); b) proteínas citoplasmáticas envolvidas na regulação do ciclo celular, como as proteínas SW16 e SW14 de *Saccharomyces cerevisiae* e CDC10 de *Saccharomyces pombe*, onde estas repetições foram observadas pela primeira vez (Breedon e Nasmyth 1987) e c) proteínas envolvidas na regulação da transcrição, como o fator de transcrição GABP50 e a proteína IκB, inibidor da proteína NF-κB, um fator de transcrição ubíquo (Blank et al. 1992; Jacobs e Harrison 1998). Uma proteína com um domínio protéico semelhante ao domínio de repetição da anquirina e com atividade oncogênica foi descrita no fígado e, quando altamente expressa, reduz a estabilidade da proteína RB1 (Higashitsuji et al. 2000). Esta proteína foi denominada ganquirina e parece ser crucial para regulação do ciclo celular nos hepatócitos, sugerindo que este domínio específico da anquirina pode ser importante no controle do ciclo celular e levar à transformação oncogênica. Outra proteína que contém repetições de anquirina e pode estar envolvida com o controle do ciclo celular é a proteína

53BP2, que se liga à proteína supressora de tumores p53 (Gorina e Pavletich 1996). Muitas outras proteínas incluem estas repetições (Peters e Lux 1993). O sucesso evolutivo destas repetições se deve, provavelmente, ao fato de constituírem um módulo versátil de geração de interfaces de dimerização altamente específicas, que têm sido moldadas pela evolução para interagir com diferentes proteínas e até mesmo com o DNA (Peters e Lux 1993).

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

ANKHD1

O cDNA completo da *ANKHD1* possui 8120 pb com a cauda poli-A, apresenta um quadro aberto de leitura de 7614 pb, com códon de iniciação no nucleotídeo 61. O gene encontra-se no cromossomo 5 (banda 5q31.3) e possui 34 exons. A proteína ANKHD1 é constituída de 2542 aminoácidos, com peso molecular de 270 kDa; possui 20 repetições de anquirina, distribuídas em 5 blocos de 4 repetições, e um domínio KH (K homology domain) na região C-terminal (Poulin et al. 2003; Santos Duarte et al. 2005) (Figura 1). Esta proteína apresenta similaridade com a proteína Mask da *Drosophila melanogaster* (Smith et al. 2002) e as regiões mais conservadas correspondem às regiões de repetições de anquirina e do domínio KH. O domínio KH foi inicialmente descrito em proteínas com capacidade de interagir com ácidos nucleicos (Gibson et al. 1993; Siomi et al. 1993).



Figura 1: Representação esquemática da estrutura protéica primária de ANKHD1. As repetições de anquirina (ANK), o domínio KH (KH), e a posição dos aminoácidos correspondentes a cada domínio (numeração descrita na parte superior) estão indicados na figura. A proteína ANKHD1 é constituída de 2542 aminoácidos, com peso molecular de 270 kDa, conforme indicado.

Em humanos, o gene *ANKHD1* foi identificado por Poulin e colaboradores (Poulin et al. 2003) a partir da observação de que uma sonda constituída pelo cDNA completo do gene *Eukaryotic Initiation Factor 4E-Binding-Protein 3 (EIF4EBP3)* (número de acesso AC005214), codificador do 4E-binding protein 3 (4E-BP3), identificava um transcrito de 8,2 kb. Poulin e colaboradores observaram que o transcrito de 8,2 kb resultava da fusão do gene *EIF4EBP3* com o gene homólogo humano à *Mask* da *Drosophila melanogaster* (Smith et al. 2002). *EIF4EBP3* também está localizado no cromossomo 5, na mesma região de *ANKHD1*, banda 5q31.3, contém 4 exons (0, A, B e C) e 3 introns (Figura 2). O produto da fusão foi inicialmente denominado *Human MASK-4E-Binding Protein 3 Alternative Reading Frame (hMASK-BP3^{ARF})* (número de acesso AF521883) e a sequência sem fusão foi denominada *Human MASK (hMASK)* (número de acesso AF521882) (Figura 2). Na fusão da *hMASK* com o gene *EIF4EBP3* houve a perda do exon 34 da *hMASK* e ganho dos exons 0, B e C do *EIF4EBP3*, caracterizando a *hMASK-BP3^{ARF}* com 36 exons. O transcrito *hMASK-BP3^{ARF}* codifica uma proteína de 2617 aminoácidos. Os primeiros 2523 resíduos são idênticos aos da *hMASK* e os últimos aminoácidos resultam da tradução do exon 0 e de um alternativo quadro de leitura dos exons B e C do gene *EIF4EBP3* (Poulin et al. 2003). Subseqüentemente, um novo transcrito de 2,5 kb foi identificado (Santos Duarte et al. 2005). Esta sequência havia sido depositada como *PP2500* (accession number AF258557) e quando comparada ao gene *hMASK-BP3^{ARF}* e *hMASK*, apresentava homologia nos seus 10 primeiros exons com exceção do exon 10A o qual não se encontrava presente na sequência do transcrito de *hMASK-BP3^{ARF}* e *hMASK*, provavelmente pela ocorrência de uma clivagem alternativa nesse exon (Santos Duarte et al. 2005) (Figura 2). A sequência *PP2500* mostra 11 exons. Posteriormente, baseando-se na nomenclatura de novos genes e proteínas aprovada pelo *Gene Nomenclature Committee HUGO* (Povey et al. 2001), a denominação *hMASK* foi substituída pela denominação *ANKHD1*.

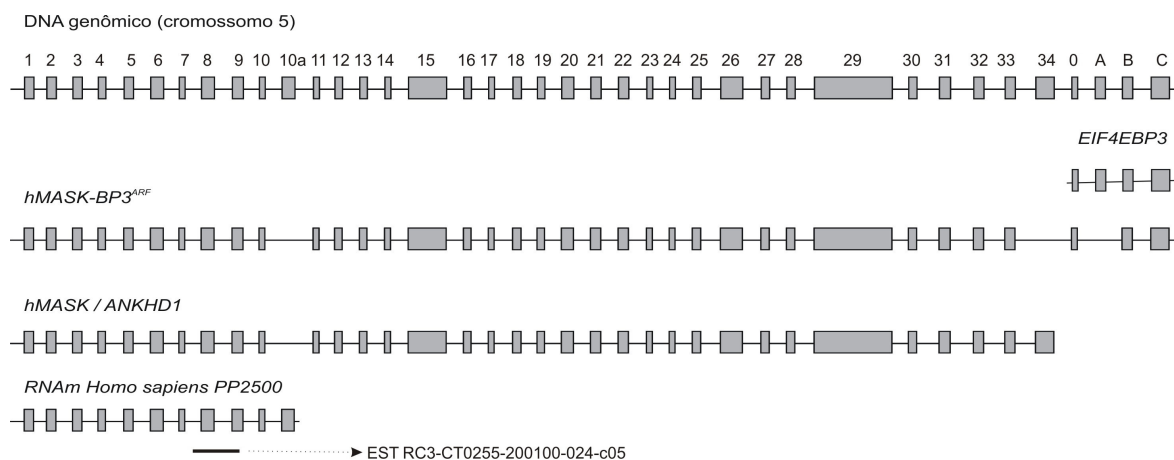


Figura 2: Representação esquemática do DNA genômico do cromossomo 5 e dos transcritos resultantes de clivagem alternativa. Os retângulos representam exons, as linhas representam introns. A numeração dos exons do cromossomo 5 está indicada na parte superior da figura. *EIF4EBP3* contém 4 exons (0, A, B e C) e 3 introns. Na fusão da *ANKHD1* com o gene *EIF4EBP3* houve a perda do exon 34 da *ANKHD1* e ganho dos exons 0, B e C do *EIF4EBP3*, caracterizando a *hMASK-BP3^{ARF}* com 36 exons. A sequência *PP2500* mostra 11 exons e, quando comparada ao gene *hMASK-BP3^{ARF}* e *ANKHD1*, apresenta homologia nos seus 10 primeiros exons com exceção do exon 10A. A sequência da EST RC3-CT0255-200100-024-c05 e sua similaridade com os exons 8 e 9 da *ANKHD1*, estão indicados na parte inferior da figura.

Em *Drosophila melanogaster*, Mask foi inicialmente identificada através de uma metodologia desenhada para detectar novas proteínas que interagem com a proteína tirosina fosfatase *Corkscrew* (CSW), homóloga a *Src Homology-2 domain-containing protein tyrosine Phosphatase-2* (SHP2) humana. A caracterização fenotípica da Mask em *Drosophila* sugere que esta é uma nova proteína envolvida em vias de sinalização de tirosina quinase e sua atividade é essencial para a proliferação e diferenciação celular nos olhos da *Drosophila* (Smith *et al.* 2002).

Tirosina Fosfatase SHP2

SHP2 é uma fosfatase de tirosina citoplasmática codificada pelo gene *PTPN11*, participa de vias de sinalização celular de fatores de crescimento e citocinas, e exerce importantes funções na regulação da proliferação, diferenciação e migração celular (Feng 1999; Neel et al. 2003). SHP2 é constituída de dois domínios com homologia à Src (SH2) na porção N-terminal (N-SH2 e C-SH2), um domínio catalítico com atividade fosfatase na região central, *Phospho-Tyrosine-Phosphatase Domain* (PTP), e uma cauda C-terminal contendo dois sítios de fosforilação em tirosina e uma região rica em prolina (Neel et al. 2003). Em condições basais, SHP2 apresenta baixa atividade catalítica, sendo que o domínio catalítico está inibido pela ligação intramolecular com o domínio N-SH2. A ligação dos domínios SH2 da SHP2 a outras proteínas fosforiladas em tirosina induz a uma mudança conformacional da proteína SHP2, sendo desfeita a ligação auto-inibitória entre o domínio N-SH2 e o domínio catalítico. A proteína SHP2 torna-se ativa e adquire a capacidade de desfosforilar substratos (Figura 3).

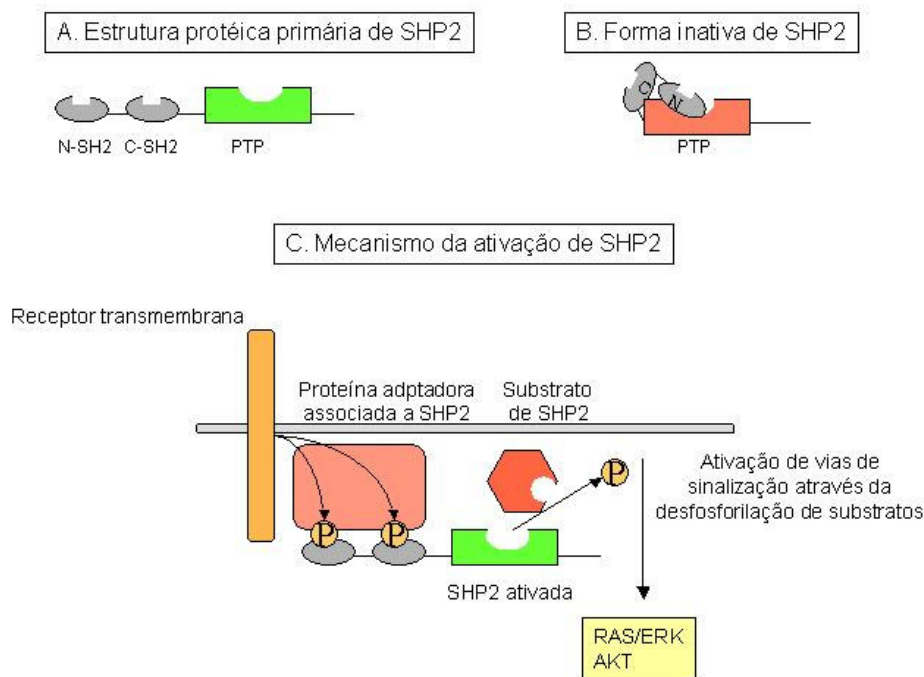


Figura 3: Representação esquemática simplificada da estrutura protéica primária e ativação de SHP2. (A) A figura indica a estrutura protéica primária de SHP2, com a representação dos dois domínios SH2, SH2 N-terminal (N-SH2) e SH2 C-terminal (C-SH2), do domínio catalítico *PhosphoTyrosine-Phosphatase* (PTP) com atividade fosfatase na região central e uma cauda C-terminal. (B). Em condições basais, SHP2 apresenta baixa atividade catalítica, sendo que o domínio PTP está inibido pela ligação intramolecular com o domínio N-SH2. (C) A partir da ativação de receptores transmembrana (receptores com atividade tirosina quinase ou receptores de citocinas), proteínas adaptadoras e fosforiladas em tirosina (P) são recrutadas. A ligação dos domínios SH2 da SHP2 a estas proteínas adaptadoras induz a uma mudança conformacional da proteína SHP2, sendo desfeita a ligação auto-inibitória. SHP2 é ativada e adquire a capacidade de desfosforilar substratos, ativando diferentes vias de sinalização (RAS/ERK e AKT).

A fosfatase SHP2 exerce um papel fundamental no desenvolvimento da hematopoese normal (Chan et al. 2003; Qu et al. 1997; Qu et al. 1998). Estudos de diferenciação hematopoética *in vitro* demonstraram que células embrionárias com mutação

homozigota *Shp2*^{*Δ46-110*} não apresentaram diferenciação para série eritróide e mielóide (Qu et al. 1997). Estes resultados *in vitro* foram apoiados pelos estudos *in vivo*, onde não foram observadas células progenitoras eritróides ou mielóides em fígado e medula óssea de animais resultantes de quimera derivadas de células embrionárias mutantes *Shp2*^{*Δ46-110*} e não mutantes (Qu et al. 1998). Experimentos subsequentes, utilizando blastocistos deficientes de Rag-2 (*Recombinant Activating Protein-2*), demonstraram a função de SHP2 na linfopoiese, sendo que a diferenciação das células linfóides em camundongos quimeras *Shp2*^{-/-}/*Rag-2*^{-/-} foi bloqueada antes do estágio de pró B e pró T (Qu et al. 1998). Esses achados sugerem que a integridade do SHP2 é essencial para o desenvolvimento da hematopoese normal em mamíferos.

Análises genéticas e bioquímicas em *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, *Xenopus* e mamíferos demonstraram que SHP2 promove ativação de RAS via fatores de crescimento e citocinas (Feng 1999; Gutch et al. 1998; Milarski e Saltiel 1994; Noguchi et al. 1994; Perkins et al. 1992; Qu et al. 1999; Shi et al. 1998; Tang et al. 1995). SHP2 associa-se a receptores de tirosina quinase ativos ou a receptores de citocinas que não contêm atividade quinase intrínseca, seja diretamente através da ligação a resíduos de tirosina ou indiretamente através de proteínas adaptadoras ou ancoraduras (Pawson e Scott 1997). Embora diferentes mecanismos tenham sido propostos, envolvendo mecanismos dependentes e independentes de fosfatase, a maioria das evidências sugere que a atividade catalítica de SHP2 é necessária para a sinalização através da via RAS-ERK (Cunnick et al. 2002). Vários estudos sugerem que SHP2 desfosforila e inibe RASGAP (Hanafusa et al. 2004; Neel et al. 2003), regulador negativo da ativação de RAS. Alternativamente, SHP2 induz à desfosforilação de SRC quinases, direta ou indiretamente, promovendo ativação de SRC e conseqüente ativação de RAS (Neel et al. 2003; Zhang et al. 2004). SHP2 participa também da desfosforilação e inativação de proteínas inibitórias *Sprouty*, facilitando a ativação da via de receptores tirosina quinase (Hanafusa et al. 2004). Adicionalmente, SHP2 exerce também um papel estimulatório na via de sinalização da AKT, que promove a proliferação celular e inibe a apoptose (Hakak et al. 2000; Wu et al. 2001; Zhang et al. 2002). A Figura 4 ilustra, de forma simplificada, a participação da SHP2 na ativação das vias RAS e AKT.

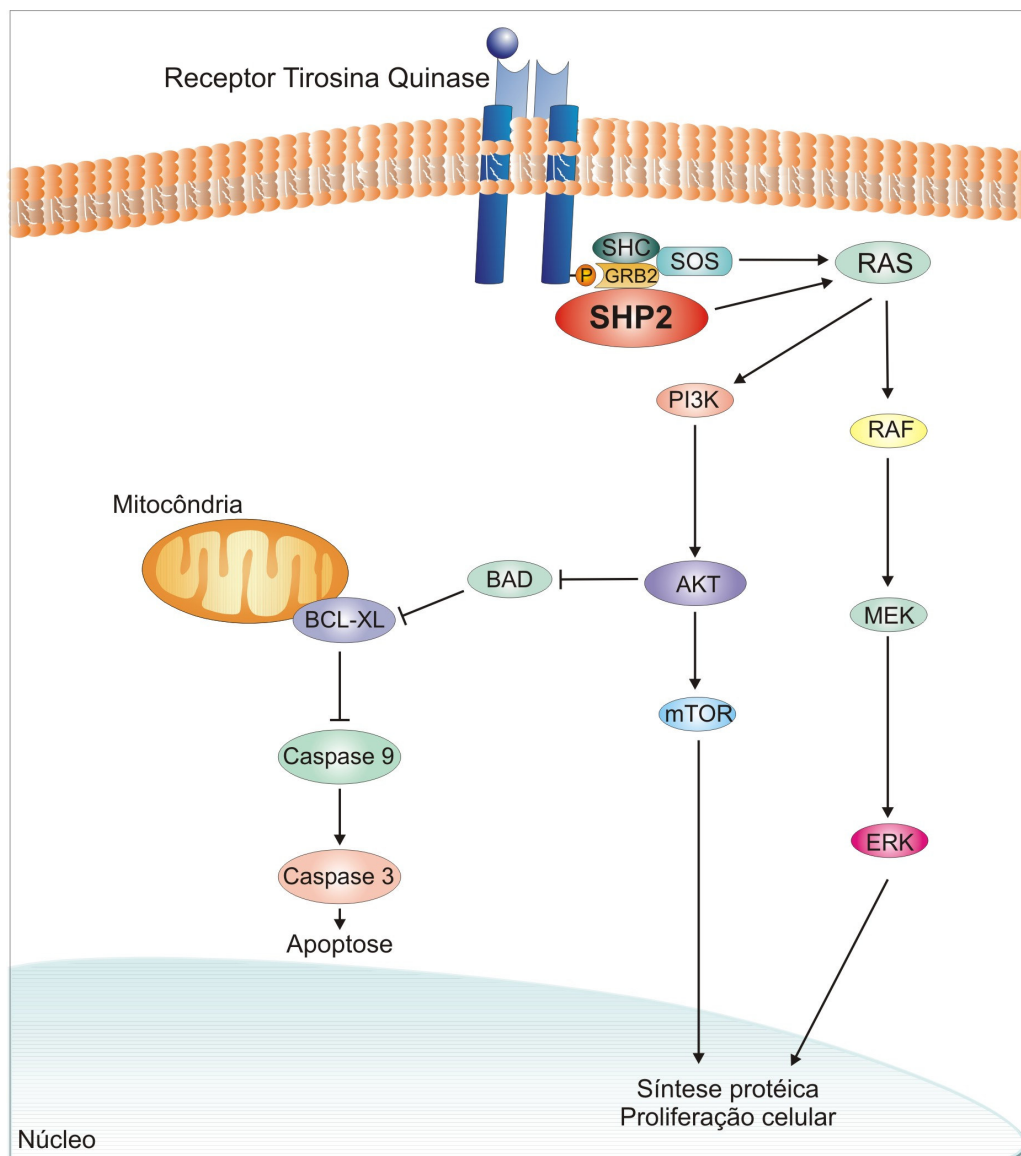


Figura 4: Representação esquemática da participação de SHP2 na ativação da via RAS e AKT. A ativação de um receptor tirosina quinase, por um ligante, resulta na auto-fosforilação do receptor em tirosina, permitindo o recrutamento e/ou a fosforilação de proteínas adaptadoras, como GRB2, SHC e SHP2. A associação GRB2/SOS resulta na ativação de RAS. A fosfatase SHP2 ativa RAS através da desfosforilação de proteínas inibitórias. A ativação de RAS resulta na ativação subsequente de RAF/MEK/ERK, e PI3K/AKT/mTOR, ativando a síntese protéica e proliferação celular. Simultaneamente, a ativação da AKT inibe a função pró-apoptótica de BAD, resultando na inibição das caspases e da apoptose.

O envolvimento da SHP2 em doenças humanas tornou-se evidente quando mutações no gene *PTPN11* foram identificadas em indivíduos com Síndrome de *Noonan* (Tartaglia et al. 2001), uma desordem autossômica caracterizada pela presença de alterações faciais, defeitos cardíacos, anomalias esqueléticas e retardo do crescimento. Alterações hematológicas incluindo hepatoesplenomegalia e, raramente, leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) juvenil, são também observadas em pacientes com esta síndrome.

Tartaglia e colaboradores (Tartaglia et al. 2003) foram os pioneiros a descrever a presença de mutações somáticas no gene *PTPN11* em LMMC juvenil não associada a Síndrome de *Noonan*. Recentes estudos de diferentes autores indicam que mutações somáticas no gene *PTPN11* ocorrem em 35% dos casos de LMMC juvenil, e também em leucemia mielóide aguda (LMA) da infância (4%), síndromes mielodisplásicas (10%) e leucemia linfóide aguda (LLA) (7%) (Bentires-Alj et al. 2004; Loh et al. 2004; Tartaglia et al. 2004a; Tartaglia et al. 2003; Tartaglia et al. 2004b). Diferentes mutações no gene *PTPN11* têm sido descritas e a maioria destas mutações localiza-se na região de ligação do domínio N-SH2 ao domínio catalítico, resultando na liberação da ligação auto-inibitória entre estes domínios e a ativação da atividade catalítica da SHP2 (Keilhack et al. 2005).

Embora mutações no gene *PTPN11* estejam raramente presentes em LMA do adulto, recentemente Xu e colaboradores demonstraram que SHP2 está altamente expressa e constitutivamente fosforilada em células leucêmicas de indivíduos adultos com LMA, comparado às células mononucleares de indivíduos normais (Xu et al. 2005). As células mononucleares normais apresentaram baixos níveis de SHP2 fosforilada, entretanto, o estímulo mitogênico com fitohemaglutinina induziu ao aumento da fosforilação de SHP2, indicando que a proliferação das células hematopoéticas normais está associada ao aumento na fosforilação da SHP2. A fosforilação da SHP2 confere ativação de sua atividade catalítica (Lu et al. 2001). Em células leucêmicas, a inibição da expressão da SHP2 induziu apoptose e inibição do crescimento celular (Xu et al. 2005). Estes achados indicam que a alta expressão e a ativação constitucional de SHP2 é um fenótipo comum a várias leucemias e está associada à proliferação das células leucêmicas.

Em vista dos dados da literatura que indicam a importância das repetições de anquirina em sinalização celular, a associação entre a proteína MASK e CSW da *Drosophila melanogaster*, homólogas a ANKHD1 e SHP2 em humanos, e a participação da SHP2 em leucemias agudas, as seguintes perguntas foram formuladas: (1) Estaria a ANKHD1 presente em células hematopoéticas normais e leucêmicas? (2) Haveria associação de ANKHD1 com SHP2? (3) Em que vias de sinalização celular ANKHD1 poderia estar envolvida? Para responder a estas questões surgem os objetivos deste trabalho.

OBJETIVOS

Objetivos gerais

Caracterizar o padrão de expressão gênica e protéica de ANKHD1 em células hematopoéticas normais e leucêmicas e sua participação nas vias de sinalização celular.

Objetivos específicos

1. Investigar a expressão gênica de *ANKHD1* em células hematopoéticas normais e leucêmicas.
2. Investigar a expressão protéica da ANKHD1 em tecidos humanos normais, células hematopoéticas normais e leucêmicas.
3. Estudar a localização subcelular da ANKHD1 em células hematopoéticas normais e leucêmicas.
4. Verificar a participação de ANKHD1 em vias de sinalização celular na hematopoese normal e leucêmica.
5. Avaliar o envolvimento de ANKHD1 na apoptose, após a sua inibição por RNAi.

MATERIAIS E MÉTODOS

Casuística e Linhagens Celulares

Tecidos humanos normais

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

Células hematopoéticas normais

As células hematopoéticas normais foram obtidas de sangue periférico (n=4) ou de medula óssea (n=7) de doadores normais do Hemocentro da Unicamp com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e consentimento informado. As células mononucleares de sangue periférico foram obtidas através de um gradiente de separação, *Ficoll-Hypaque* (Sigma, St. Louis, MO). As células hematopoéticas totais de medula óssea foram obtidas através da lise de hemáceas com tampão contendo cloreto de amônio. A seguir, as células foram submetidas a *Western Blotting* ou extração de RNA.

Células hematopoéticas de pacientes com diagnóstico de Leucemia Aguda

As células leucêmicas foram obtidas de amostras de medula óssea de pacientes atendidos no ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e consentimento informado. As amostras foram coletadas no momento do diagnóstico de leucemia aguda, antes de qualquer tratamento. Utilizamos neste estudo as amostras que foram coletadas entre o período de fevereiro de 2001 a dezembro de 2005, e que apresentavam os dados hematológicos do diagnóstico, confirmação do diagnóstico de leucemia aguda através de mielograma, citoquímica e imunofenotipagem, e que apresentavam RNA de boa qualidade no momento da realização dos experimentos. Foi incluído um total de 38 pacientes com diagnóstico de Leucemia Aguda (mediana de idade de 47 anos, variando de 18–83 anos), incluindo 7 LLA, 1 leucemia aguda bifenotípica e 30 LMA (1 M0, 5 M1, 6 M2, 3 M3, 10 M4, 3 M5, 1 M6, 1 M7) de acordo com a classificação *French-American-British* (FAB) (Bain 2003). Os dados clínicos estão descritos na Tabela I.

As informações clínicas detalhadas de cada paciente, incluindo os dados do diagnóstico e do seguimento, avaliado até a data de 12 de dezembro de 2006, estão descritas no Apêndice II. As células de medula óssea foram coletadas em EDTA e logo após submetidas à lise de hemácias com tampão contendo cloreto de amônio. A seguir, as células foram submetidas à extração de RNA.

Exames para diagnóstico de Leucemia Aguda

Os exames para diagnóstico de leucemia aguda foram realizados de acordo com a rotina do serviço de Hematologia da Unicamp, incluindo avaliação do sangue periférico e do mielograma corados com Leishmann e citoquímica incluindo as colorações de Sudan Black, Esterase inespecífica e Esterase NaF. As amostras foram simultaneamente submetidas a exame de imunofenotipagem com os seguintes marcadores: CD3 FITC, CD19 PE, CD45 PerCP, CD7 FITC, CD13 PE, HL-DR FITC, CD33 PE. A partir do resultado obtido com este painel primário, os casos definidos como LMA foram submetidos à ampliação do painel com os seguintes marcadores: CD15 FITC, CD34 PE, CD14 FITC, Cd11b PE e Cd117 PE. Os casos com suspeita de LMA M6 foram submetidos a marcação com CD71 FITC e glicoforina A PE. Os casos com suspeita de LMA M7 foram submetidos a marcação com CD61 FITC e CD41 PE. Os casos definidos como LLA de linhagem B, a partir do painel primário, foram submetidos à ampliação do painel com os seguintes marcadores: CD10 FITC e CD20 PE e para pesquisa de expressão de imunoglobulina de membrana e citoplasma foram utilizados os marcadores Kappa FITC e Lambda PE. Para os casos de LLA-T realizou-se apenas o painel primário. Os casos com suspeita de LMA M3 foram submetidos a RT-PCR para pesquisa da t(15;17). A maioria dos casos de LLA foram submetidos a RT-PCR para pesquisa de t(9;22) p190 e p210. Todos os pacientes foram submetidos a coleta de material de medula óssea para análise de cariótipo por banda G, sendo avaliadas vinte metáfases.

Tabela I: Pacientes com diagnóstico de Leucemia Aguda.

	Número de pacientes
Pacientes estudados	38
Sexo	
Masculino/ Feminino	25/13
Idade (anos), mediana (variação)	47 (18-83)
FAB	
LMA	30
M0	1
M1	5
M2	6
M3	3
M4	10
M5	3
M6	1
M7	1
LLA	7
LLA T	5
LLA pré-B	2
LA Bifenotípica	1

Abreviações. FAB: French-American-British; LMA: Leucemia Mielóide Aguda; LLA: Leucemia Linfóide Aguda; LA: Leucemia Aguda.

Linhagens celulares

Linhagens celulares de leucemias agudas humanas foram adquiradas no ATCC, Philadelphia, USA: KG-1, HEL (eritroleucemias), K562 (leucemia mielóide crônica em fase blástica, t(9;21)), NB4 (leucemia promielocítica aguda, t(15;17)), HL-60 (leucemia promielocítica aguda), Jurkat, MOLT4 (LLA T), Raji, Daudi e Namalwa (LLA B/Linfoma de *Burkitt*) e a linhagem celular de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP).

Métodos

Análise Computacional

A EST RC3-CT0255-200100-024-c05 foi selecionada a partir das seqüências do banco de dados ORESTES (estas seqüências estão disponíveis no NCBI) que apresentavam homologia com domínios protéicos presentes nas proteínas anquirinas do citoesqueleto de espectrina. Para obter a seqüência completa do cDNAs da EST de interesse foi usado o pacote de algoritmos de busca BLAST (disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Para avaliação da seqüência protéica foram realizadas buscas no banco de dados *Prosite* no endereço <http://expasy.cbr.nrc.ca/tools>, usando a ferramenta de busca *InterPro Scan*. A ferramenta *Protscale* (disponível no endereço eletrônico www.expasy.org) foi utilizada para o estudo da imunogenicidade de seqüências de peptídeos para produção de anticorpos específicos para a proteína ANKHD1.

Extração do RNA total

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

Tratamento do RNA total com DNase I

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

Transcrição em cDNA

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

RT-PCR em tempo real

Amplificação em tempo real foi realizada no ABI 5700 Sequence Detector System (Applied Biosystems) utilizando-se SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). Quinze ng de cada amostra de cDNA foram utilizados na reação com os seguintes iniciadores: (1) 600 nM de iniciador da *β -actina* sense e antisense; (2) 400 nM de iniciador da *ANKHD1* sense e antisense (FW: 5'-CCTGCTTGGAACCCTCTGATAAA-3'; RW: 5'-

CGTGCCAGGCCAAATCTG-3'). Um controle negativo, sem adição de cDNA, foi realizado para cada par de iniciadores. O protocolo de dissociação foi realizado no final de cada reação para verificar amplificações não específicas. Cada reação foi repetida três vezes no mesmo experimento. A expressão de *β-actina* foi utilizada como controle endógeno e uma amostra de cDNA contendo células de 3 medulas ósseas normais foi utilizada como a amostra Calibradora. A quantificação relativa da expressão gênica da *ANKHD1* foi calculada utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen 2001).

Produção do anticorpo anti-ANKHD1

Através da ferramenta ProtScale, disponível no endereço eletrônico www.expasy.org, foi escolhida uma sequência de 16 aminoácidos, com capacidade antigênica: HPMHQQLSDPSTFSQ (aa 2423 – 2437) (Figura 5). A escolha do peptídeo é baseada em sua imunogenicidade e podem-se utilizar vários parâmetros para fazer essa predição através da ferramenta ProtScale. No entanto, a escolha de dois parâmetros já é suficiente para que todos os outros corroborem com a imunogenicidade do peptídeo escolhido. Nesse caso, foi utilizado o caráter hidrófobo de Kyte e Doolittle (Kyte e Doolittle 1982) e a predição da estrutura secundária *β-turn* de Chou e Fasman (Chou e Fasman 1979). No primeiro parâmetro, quanto menos hidrófobo for o peptídeo, mais imunogênico. Já no segundo parâmetro, quanto maior a probabilidade do peptídeo apresentar uma *β-turn*, maior a probabilidade de ser imunogênico. Assim, os parâmetros descritos acima revelaram que uma das sequências de peptídeos escolhida pela sua imunogenicidade (HPMHQQLSDPSTFSQ) era a mesma sequência usada pelo grupo de Dr. Francis Poulin (Department of Genome Sciences, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA), que descreveu a proteína ANKHD1 (Poulin et al. 2003), e que, gentilmente, nos cedeu uma alíquota para teste do anticorpo policlonal produzido em coelhos. Após a escolha da região antigênica de 16 aminoácidos, a produção do anticorpo policlonal purificado anti-ANKHD1 foi solicitada a Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Outro anticorpo produzido a partir de uma sequência da ANKHD1 em fusão com o GST (RC 2335), foi gentilmente cedida pelo Dr. Francis Poulin (Poulin et al. 2003).

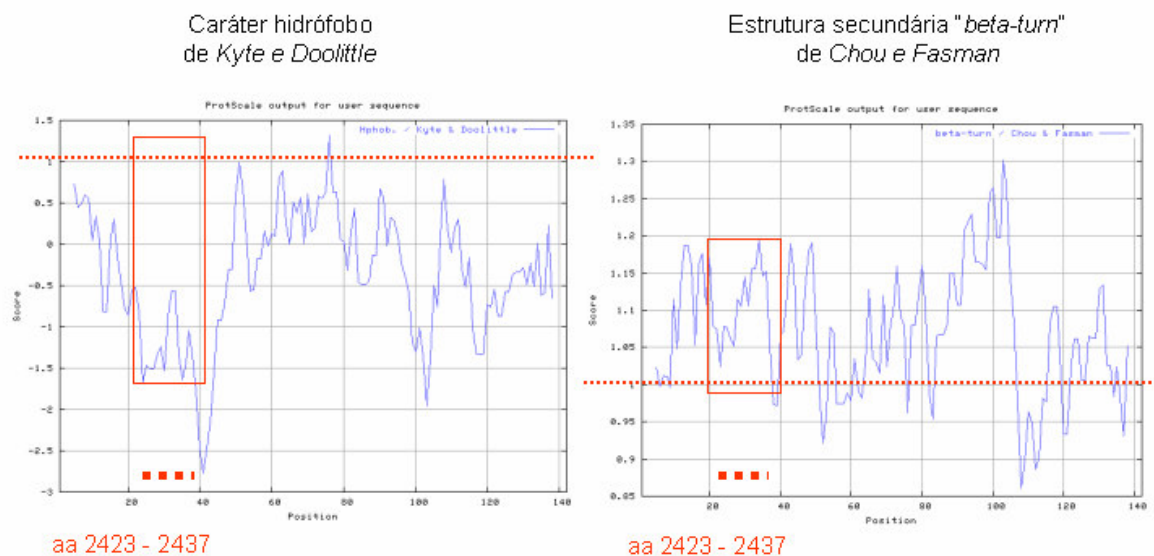


Figura 5: Representação da predição da imunogenicidade da sequência de aminoácidos 2423 a 2437 de ANKHD1. O gráfico a esquerda representa a visualização da predição do caráter hidrófobo de Kyte e Doolittle da região de aminoácidos de ANKHD1 escolhida para a produção do anticorpo anti-ANKHD1, obtidas através da ferramenta *ProtScale* (disponível no endereço eletrônico www.expasy.org). O gráfico à direita representa a visualização da predição da estrutura secundária β -turn de Chou e Fasman desta sequência. A representação da região dos 16 aminoácidos escolhidos (aa 2423 – 2437) está indicada na parte inferior da figura. A linha pontilhada em vermelho indica o *score* 1. O retângulo vermelho indica o baixo caráter hidrófobo e a alta probabilidade da sequência de 16 aminoácidos apresentar uma β -turn, indicando a sua imunogenicidade.

Western Blotting

Ao precipitado celular contendo 5×10^6 a 1×10^7 células foi acrescentado tampão de extração de proteínas contendo 100 mM Tris (pH 7.6), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 0,1 mg Aprotinina, 35 mg PMSF/mL, 10 mM Na_3VO_4 , 100 mM NaF, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, e 4 mM EDTA. As amostras foram homogeneizadas até que se tornassem bastante fluidas. Após 30 minutos a 4°C , essas amostras passaram por um processo de centrifugação a 4°C durante 20 minutos para remoção dos restos celulares. Alíquotas com mesma concentração protéica foram usadas para produção do extrato total protéico ou para imunoprecipitação.

Para produção do extrato total proteico, adicionou-se às alíquotas tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditioneitol e aqueceu-se em água fervente por 4 minutos. Após isso, as amostras foram submetidas à eletroforese ou armazenadas a -80°C . Para produção de imunoprecitado, adicionou-se às alíquotas o anticorpo anti-ANKHD1 ou anticorpo de interesse e proteína A-Sepharose 6MB. Após o término da incubação e da lavagem, os precipitados foram ressuspensos em tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditioneitol e aquecidas em água fervente por 4 minutos. Em seguida, as proteínas imunoprecipitadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 8%-SDS-PAGE em aparelho de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 90 minutos a 120 V (constante) em aparelho miniaturizado de transferência da Bio-Rad. A ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 1 hora com tampão de bloqueio (5% leite em pó magro, 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, and 0.02% Tween 20) a 4°C . A membrana de nitrocelulose foi então incubada com anticorpos específicos diluídos em tampão de bloqueio (0.3% de leite em pó magro) por 12 horas a 4°C e então lavadas 3 vezes com solução basal (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, and 0.02% Tween 20). Os anticorpos primários utilizados foram: anti-fosfotirosina (sc-508), anti-SHP2 (sc-280), anti-actina (sc-1616), anti-histona (sc-11419) da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), anti-fosfoserina (catálogo 612547) da BD Biosciences Pharmingen (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Os anticorpos anti-ANKHD1 utilizados nos experimentos de Western Blotting foram o anti-ANKHD1 desenvolvido pela Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), a partir da escolha do peptídeo antigênico de 16 aminoácidos, e o RC 2335 cedido pelo Dr. Francis Poulin (Department of Genome Sciences, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA). O sistema de revelação usado foi o baseado em quimioluminescência, de acordo com as instruções no kit ECLTM Western Blotting Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Em suma, as membranas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário, conjugado à HRP (*Horseradish peroxidase*), lavadas novamente, e então submetidas ao substrato da enzima, resultando num produto luminescente, detectado por auto-radiografias em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY).

Extração de proteínas citoplasmáticas e nucleares

Aproximadamente 5×10^7 células Jurkat foram lavadas com tampão PBS 0,1 M, pH 7,4, e ressuspensas com tampão hipotônico (10 mM Hepes pH 7,9; 1,4 mM $MgCl_2$; 10 mM KCl) acrescido de inibidores de proteases. As células foram incubadas nesse tampão por 10 minutos a 4°C. Em seguida, essas células foram submetidas ao rompimento da membrana celular através de uma constante homogeneização, com a ajuda de um homogeneizador pré-resfriado, as quais foram submetidas à centrifugação para coleta da fração citoplasmática e fração de membrana no sobrenadante. O precipitado celular foi lavado com um tampão de baixa concentração de sal (20 mM Hepes pH 7,9; 25% Glicerol; 1,5 mM $MgCl_2$; 20 mM KCl; 0,2 mM EDTA) e então ressuspendido em um tampão de alta concentração de sal (20 mM Hepes pH 7,9; 25% Glicerol; 1,5 mM $MgCl_2$; 1 M KCl; 0,2 mM EDTA). Essa suspensão foi incubada, a 4°C por 30 minutos, em agitação, e em seguida centrifugada. O sobrenadante contém a fração nuclear. As diferentes frações celulares foram submetidas ao gel de poliacrilamida 8%-SDS-PAGE.

Microscopia confocal

As células K562 e Jurkat ou células mononucleares de sangue periférico normal foram aderidas às lamínulas pré-tratadas com poli-L-lisina, e fixadas com uma solução de paraformaldeído. Em seguida, foram feitos o bloqueio e a permeabilização das células com uma solução com 3% de caseína e 0,6% de triton. O anticorpo primário purificado anti-ANKHD1, produzido pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), foi diluído a 10 µg/mL em solução 1% de caseína e incubado com as células, em câmara úmida a 4°C, durante 18 horas. Após 3 lavagens com PBS, seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário marcado com Alexa488 (Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit antibody/Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) por 2 horas à temperatura ambiente.

Células mononucleares de sangue periférico normal foram lavadas com 2X SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M citrato de sódio, pH 7,0), incubadas com 100 µg/mL Dnase-Rnase em 2X SSC por 20 minutos a 37°C, lavadas com 2X SSC e incubadas com Iodeto de Propídio (Propidium Iodide/Molecular Probes, Leiden, The Netherlands), que se liga ao DNA, por 5 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram montadas utilizando-se Vectashield

(Vector Labs, Irvine, CA) e acondicionadas a 4°C, no escuro.

As células K562 e Jurkat foram incubadas com TRITC-conjugated phalloidin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) à temperatura ambiente e montadas com lamínulas com ProLong Gold antifade reagent com DAPI (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands).

As lâminas foram analisadas por escaneamento a laser em um LSM-510 montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando-se a objetiva de 63x de imersão em água. Em todos os experimentos foram feitos controles negativos, somente com anticorpo secundário, os quais não apresentaram fluorescência.

Sistema de duplo híbrido em levedura

O sistema de duplo híbrido em levedura é um ensaio genético realizado em levedura (*yeast-based genetic assay*) usado para detectar interações proteína-proteína (Guarente 1993). As interações proteína-proteína formam a base de ampla variedade de reações bioquímicas. A identificação de proteínas que interagem com a proteína de interesse é um aspecto essencial para a elucidação do funcionamento e regulação da mesma. Além de identificar interações protéicas, este sistema pode também ser usado para definir domínios ou resíduos de aminoácidos que estão envolvidos ou são necessários para a interação. A base para o sistema de duplo-híbrido em levedura está na estrutura de um fator de transcrição particular que tem dois domínios fisicamente separados: o domínio de ligação ao DNA e o domínio de ativação da transcrição (Keegan et al. 1986; Ma e Ptashne 1987). O domínio de ligação ao DNA se liga a uma sequência promotora específica de um gene repórter enquanto que o domínio de ativação atrai os componentes críticos do complexo de iniciação da transcrição. No sistema do duplo-híbrido em levedura, a proteína de interesse é fusionada ao domínio de ligação ao DNA da proteína GAL4 da levedura, enquanto uma biblioteca de cDNAs, codificando as proteínas potencialmente interativas a serem identificadas, é fundido ao domínio de ativação da transcrição da proteína GAL4 da levedura (Figura 6).

Se ocorrer uma interação entre a proteína de interesse e uma proteína interativa da biblioteca, o domínio de ativação da transcrição é recuperado, ou seja, os genes “repórteres” são transcritos e traduzidos. No sistema utilizado neste trabalho, os “genes

repórteres” foram ADE2, HIS3, MEL1 e LacZ que conferem às leveduras a auxotrofia para adenina e histidina, e a capacidade de formar colônias azuis na presença de α -galactosidase ou β -galactosidase, respectivamente.

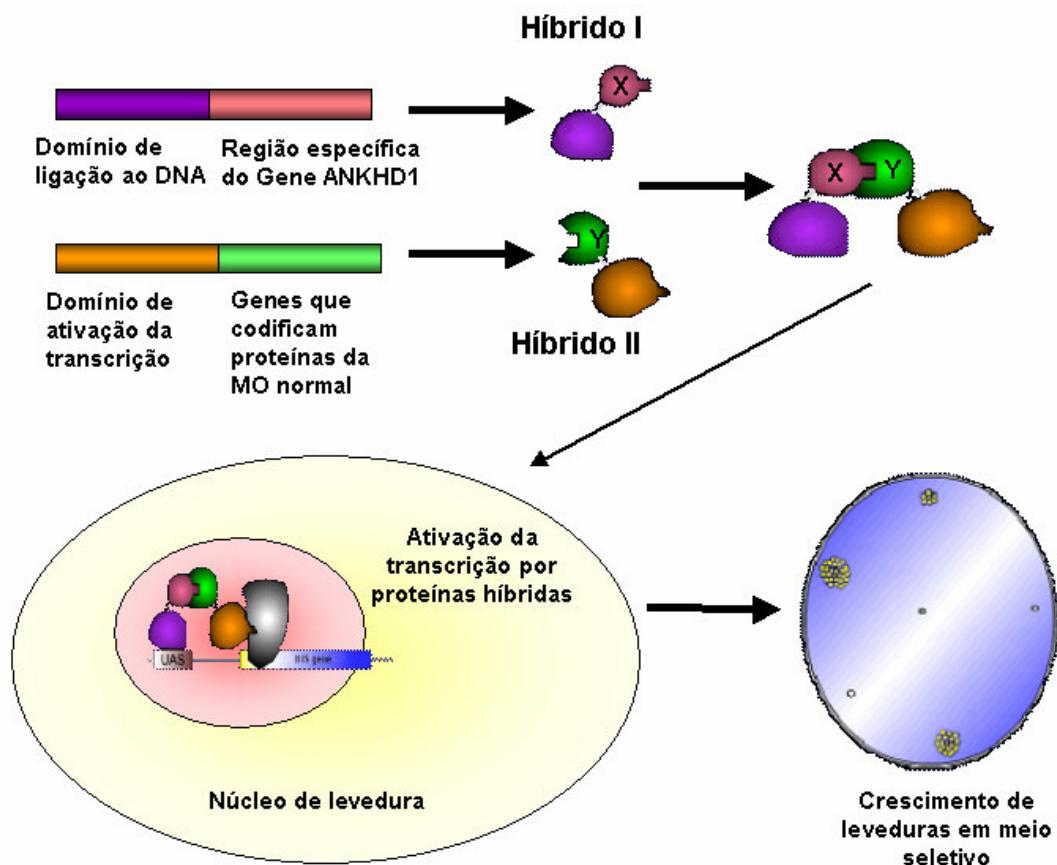


Figura 6: Representação esquemática do ensaio de duplo híbrido em levedura.

Assim, os clones que cresceram em meio seletivo e se tornaram azuis no teste da α -galactosidase ou β -galactosidase, foram considerados como clones potenciais que possuem o plasmídeo da biblioteca de cDNA que codifica uma proteína que interage com ANKHD1. Estes clones foram isolados e seqüenciados. As seqüências de DNA obtidas identificaram, por comparação em bancos de dados, as proteínas que interagem com ANKHD1.

Linhagens de bactérias e leveduras utilizadas

Escherichia coli DH5 α (*E. coli* DH5 α).

Saccharomyces cerevisiae, linhagem AH109.

Saccharomyces cerevisiae, linhagem Y187.

Vetores utilizados

Os vetores utilizados no ensaio de duplo híbrido em levedura foram obtidos da Clontech (Clontech, Palo Alto, CA):

pGBKT7: vetor para clonagem da isca. Codifica o domínio de ligação ao DNA da proteína GAL4 da levedura, seguido do epítipo c-Myc, em fusão com a proteína utilizada como isca. Este vetor confere resistência à kanamicina e prototrofia ao triptofano.

pACT2: vetor da biblioteca de cDNA. Codifica o domínio de ativação da transcrição da proteína GAL4 da levedura, seguido do epítipo HA, em fusão com a biblioteca de cDNA. Este vetor confere resistência à ampicilina e prototrofia à leucina.

pGADT7: Codifica o domínio de ativação da transcrição da proteína GAL4 da levedura, seguido do epítipo HA, em fusão com uma proteína suspeita de interagir com a isca. Este vetor confere resistência à ampicilina e prototrofia à leucina.

A representação esquemática desses vetores está na Figura 7.

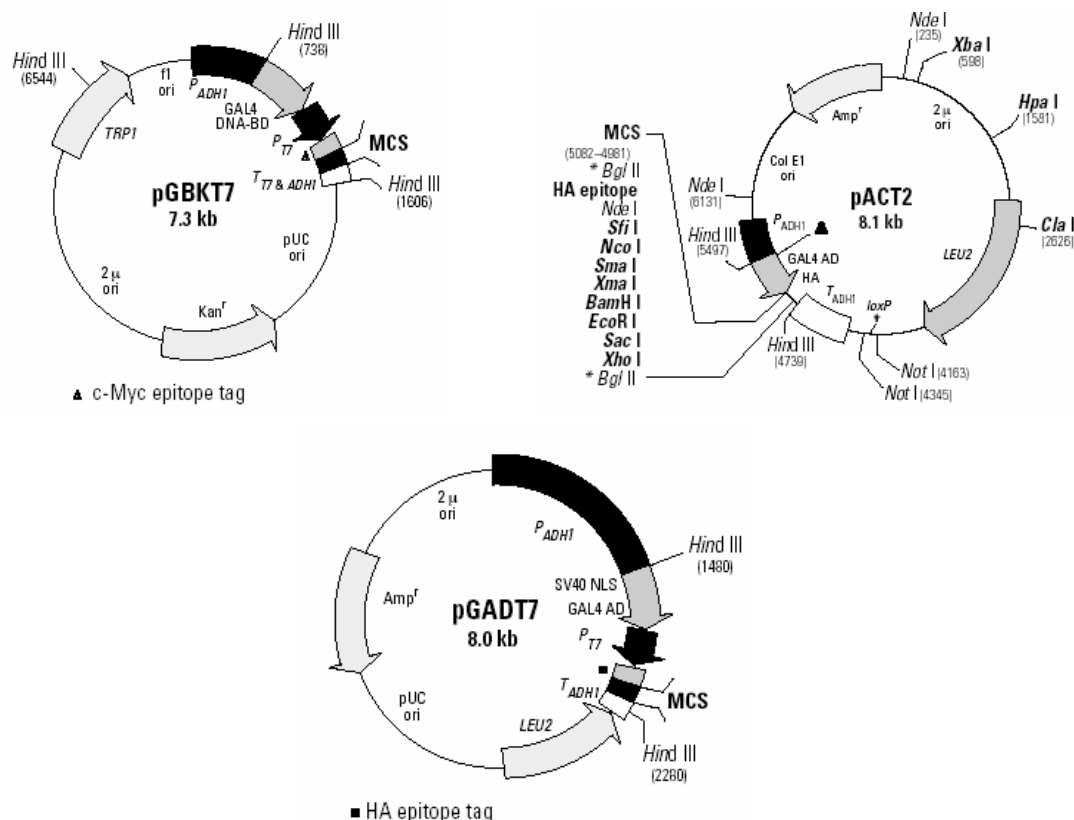


Figura 7: Representação esquemática dos vetores pGBKT7, pACT2 e pGADT7 utilizados no ensaio de duplo híbrido em levedura.

Preparação da isca ANKHD1

Para a realização do ensaio de duplo híbrido foi inicialmente realizada a preparação da isca que consiste de um fragmento de cDNA da *ANKHD1*, amplificado por PCR, usando oligonucleotídeos com seqüências adaptadas para enzimas de restrição. A escolha da região do cDNA da *ANKHD1* que foi utilizada como isca priorizou a inclusão de seqüências codificadoras de domínio de anquirina e na exclusão de trechos com cargas muito negativas. A presença de trechos carregados negativamente por dez ou mais aminoácidos nas seqüências peptídicas utilizadas pode ser uma das causas mais freqüentes da auto-ativação da isca (Ruden 1992; Ruden et al. 1991). A análise das cargas foi feita através do programa Gene Runner versão 3.05 (<http://www.generunner.com>). O iniciador sense compreende o sítio de restrição da enzima EcoRI alinhada ao códon de início do aminoácido 1130 da ANKHD1: FW: 5'-GaattcTGTCTGGTGGACGTCAGGA-3'. O iniciador anti-sense compreende o último resíduo da isca, o aminoácido 1243 da ANKHD1, e o sítio de restrição da enzima BamHI: RW: 5'-GgatccAGCAAACCTCACTACTTCTGC-3'. O fragmento amplificado de 341pb está situado entre os nucleotídeos 3448 a 3788 da seqüência de cDNA, e compreende a região protéica de ANKHD1 do aminoácido 1130 – 1243, totalizando 114 aminoácidos correspondentes a três repetições de anquirina do quarto bloco de repetição de anquirina. A representação esquemática da localização da isca ANKHD1 está na Figura 8.

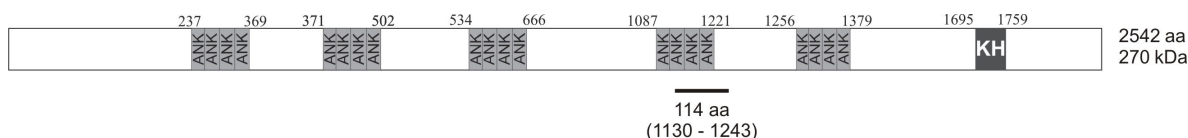


Figura 8: Representação esquemática da estrutura protéica primária de ANKHD1 e a localização da região protéica de ANKHD1 utilizada no ensaio de duplo-híbrido em levedura.

A isca foi amplificada a partir de 1µg de cDNA de linhagem celular K562. O fragmento obtido (341pb) foi subclonado em células competentes *E. coli DH5α* usando o original TA Cloning kit R (Invitrogen, Groningen, Holanda). Os plasmídios das colônias positivas foram isolados usando o kit QIAprepR Spin Miniprep (QUIAGEN, Hiden, Alemanha) e então digeridos com as enzimas de restrição EcoRI e BamHI para isolar o

inserto, ou seja, a isca. Todas as enzimas de restrição usadas foram adquiridas da MBI Fermentas, Lithuania.

O fragmento digerido foi extraído do gel de agarose 1% em TEB usando o kit QUIAEX II Gel Extraction (QUIAGEN , Hilden, Alemanha) e então foi ligado (T4 DNA Ligase, GIBCO_BRLR Rockville, MD) no vetor do pGBKT7 do MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 (Clontech, Palo Alto, CA) que foi usado para transformar células competentes *E. coli DH5α*.

Os plasmídeos das colônias positivas foram isolados e seqüenciados para descartar possíveis mutações causadas pela Taq DNA polimerase. Após certificar que os fragmentos estavam livres de mutações, o plasmídeo contendo a isca foi finalmente utilizado para transformar a linhagem AH109 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, usando o protocolo do YEASTMAKER™ Yeast Transformation System da Clontech, para expressar nestas células a região escolhida da ANKHD1 em fusão com o domínio de ligação ao DNA da proteína GAL4 da levedura.

Transformação da isca na AH109

A isca foi transformada em levedura AH109 de acordo com o protocolo do YEASTMAKER™ Yeast Transformation System da Clontech. Em um tubo de 1,5 mL foi colocado 1 µL da isca e 10 µL de DNA carreador (*Herring Teste Carrier DNA, Desnaturated*). Em outro tubo, foi colocada uma colônia de AH109 em 100 µL de solução TE/LiAc contendo buffer TE 1x (0,01 M Tris-HCl, 1 mM EDTA) e LiAc 1x (0,1 M acetato de lítio). Ao conteúdo do tubo contendo a isca e o DNA carreador foi adicionada a levedura preparada em 100 µL de solução TE/LiAc, 600 µL da solução PEG/LiAc (40% polietileno glicol, buffer TE 1x, LiAc 1x), seguido de incubação a 200 rpm por 30 minutos a 30°C. A seguir foram adicionados 70 µL de DMSO (dimetil sulfoxido), seguido de incubação em banho-maria por 15 minutos a 42°C, e incubação no gelo para choque térmico. Após centrifugação por 5 segundos a 16000 x g, o precipitado foi ressuspensionado em 200 µL de solução TE/LiAc e 100 µL foram distribuídos em placas de Petri contendo meio SD (synthetic dropout) (Clontech, Palo Alto, CA) sem suplemento de triptofano (Trp) (SD-Trp). As placas foram incubadas a 30°C por 2 a 4 dias.

Teste de toxicidade da isca

Uma colônia da isca transformada em AH109 foi inoculada em 700 μ L de meio SD-Trp, e incubada a 200 rpm, a 30°C, durante 16 horas. A seguir, 350 μ L desta cultura foram transferidos para tubos contendo 2,7 mL de meio SD-Trp e foi lida a DO₆₀₀ inicial, após 3 horas e 5 horas de incubação a 200 rpm a 30°C. O controle do crescimento utilizado foi a levedura transformada com o vetor pGBKT7 vazio. A DO₆₀₀ obtida após 5 horas é o indicador de toxicidade da isca para as leveduras. Idealmente, a isca não deve ser tóxica a levedura, sendo que a levedura transformada com a isca no vetor pGBKT7 deve apresentar um ritmo de crescimento (DO₆₀₀/hora) igual ou superior ao ritmo de crescimento da levedura transformada com o plasmídeo pGBKT7 vazio. Caso a levedura transformada com a isca apresente crescimento inferior à levedura transformada com o vetor vazio, a isca é considerada tóxica.

Teste da ativação da transcrição ou auto-ativação

As leveduras AH109 transformadas com a isca no vetor pGBKT7 foram cultivadas em meio sólido SD sem suplemento de histidina e triptofano (SD-His/-Trp), SD sem suplemento de adenina e triptofano (SD-Ade/-Trp) e sem suplemento de adenina, histidina, leucina e triptofano (SD-Ade/-His/-Leu/-Trp). Idealmente a levedura transformada com a isca no vetor pGBKT7 não deve apresentar auto-ativação e não deve apresentar crescimento em meios seletivos SD-His/-Trp, SD-Ade/-Trp e SD-Ade/-His/-Leu/-Trp.

Ensaio para verificar a expressão e estabilidade da proteína híbrida na levedura

Uma colônia da isca transformada em levedura AH109 foi inoculada em 5 mL de meio SD-Trp e incubada a 200 rpm a 30°C durante 16 horas. A seguir, esta cultura foi inoculada em 50 mL de meio YPD (*yeast extract, peptone, dextrose*) (Clontech, Palo Alto, CA), incubada a 200 rpm a 30°C até a DO₆₀₀ alcançar 0,4 –0,6 (4-8 horas). O valor da DO₆₀₀ de 1 mL de amostra foi multiplicado pelo volume final da cultura (55 mL) para obter o valor da DO₆₀₀ total. A cultura foi resfriada rapidamente com incubação a 4°C e

centrifugada a 1000 x g por 5 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspensionado em 50 mL de água gelada e centrifugado novamente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi congelado a -80°C. Ao precipitado de células foi adicionado Cracking Buffer (Clontech) (100 µL para cada 7,5 DO₆₀₀) pré aquecido a 60°C suplementado com PMSF (1 µL de PMSF 100x para cada 100 µL de Cracking Buffer). A amostra foi incubada a 70°C durante 10 minutos, submetida à homogeneização e centrifugação a 10620 x g, 4°C, durante 10 minutos. As amostras foram incubadas a 98°C e 50 µL de cada amostra foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 8%-SDS-PAGE para *Western Blotting*. A detecção da expressão protéica foi realizada através da incubação com anticorpo monoclonal anti-cMyc (Clontech).

Rastreamento

A linhagem de levedura AH109 contendo a isca foi “cruzada” com outra linhagem de levedura Y187 pré-transformada com uma biblioteca de cDNA de medula óssea humana normal, em um plasmídeo pACT2, construído para expressar as proteínas do tecido em fusão com o domínio de ativação da transcrição da proteína nativa de levedura GAL4 (Pretransformed Human Bone Marrow MATCHMAKER cDNA Library, Clontech, Palo Alto, CA).

Em 50 mL de meio SD-Trp líquido com 50 mg/mL kanamicina e 800 µL de adenina 0,2%, foi adicionada uma colônia da linhagem transformada com a isca e incubada no agitador a 260 rpm a 30°C de 16 a 20 horas. Após crescimento, a cultura foi centrifugada por 5 minutos a 1000 x g e o precipitado ressuspensionado em 5 mL do sobrenadante. A biblioteca pré-transformada de medula óssea foi descongelada em banho-maria à temperatura ambiente e uma alíquota de 10 µL foi utilizada para titulação. Em 50 mL de meio YPD foi adicionado 1 mL de adenina 2%, 80 µL de kanamicina, 5 mL da linhagem da isca transformada e 1 mL da biblioteca. Em seguida, esta cultura foi incubada em agitador a 50 rpm a 30°C de 20 a 24 horas. Após este período de incubação, a cultura contendo as duas linhagens de leveduras “cruzadas” foi centrifugada por 10 minutos a 1000 x g, o precipitado ressuspensionado em 10 mL de YPD e uma alíquota de 33 µL foi separada para o teste de viabilidade. Cinco mL da suspensão foram distribuídos em 50 placas de Petri

grandes contendo meio SD-Ade/-His/-Leu/-Trp. As placas foram incubadas a 30°C de 5 a 20 dias. As colônias que cresceram em meio seletivo foram submetidas ao teste da beta-galactosidase.

Titulação da biblioteca

Para titular a eficiência da biblioteca foram seguidas as etapas descritas a seguir. Em 1 mL de meio YPD foram adicionados 10 µL da biblioteca pré-transformada de medula óssea (diluição A 10^{-2}). Em 1 mL de meio YPD foram adicionados 10 µL da diluição A (diluição B 10^{-4}). Em 50 µL de meio YPD foram adicionados 10 µL da diluição A (dil A + YPD). Foram distribuídos 50 e 100 µL da diluição B e 50 µL da diluição A + YPD em placas contendo meio SD/-Leu (SD sem suplemento leucina). As placas foram incubadas a 30°C de 2 a 4 dias. O cálculo da titulação da biblioteca foi feito de acordo com as orientações contidas no manual Pretransformed MATCHMAKER Libraries, User Manual (Clontech, Palo Alto, CA).

Viabilidade do rastreamento e número de colônias rastreadas

Para calcular a viabilidade do “cruzamento” foram seguidas as etapas descritas a seguir. Em 300 µL de YPD foram adicionados 30 µL da suspensão do “cruzamento” (1ª diluição 1:10). Em 300 µL de YPD foram adicionados 30 µL da 1ª diluição (2ª diluição 1:100). Em 300 µL de YPD foram adicionados 30 µL da 2ª diluição (3ª diluição 1:1000). Em 300 µL de YPD foram adicionados 30 µL da 3ª diluição (4ª diluição 1:10000). Foram distribuídos 100 µL de cada diluição em placas SD/-Leu, SD/-Trp e SD/-Leu/-Trp. As placas foram incubadas a 30°C de 2 a 4 dias. O cálculo da viabilidade do rastreamento e do número de colônias rastreadas foi feito de acordo com as orientações contidas no manual Pretransformed MATCHMAKER Libraries, User Manual (Clontech, Palo Alto, CA).

Ensaio de beta-galactosidase

Após a seleção em meio SD-Ade/-His/-Leu/-Trp, os clones de levedura co-transformados foram crescidos em placas de meio SD-Leu/-Trp e transferidos para um papel de filtro whatman nr.1 por contato. O papel de filtro foi congelado em nitrogênio líquido para lisar as células. Em seguida, o papel de filtro foi incubado a 37°C durante 90 minutos, sobre um outro papel de filtro previamente umedecido com tampão Z (87 mM Na₂HPO₄, 47 mM NaH₂PO₄, 19 mM KCl, 1,38 mM MgSO₄) contendo 100 uL de solução de X-α-gal 20 mg/mL (5-Bromo-4-cloro-3-indolyl-α-D-galactopyranosideo, Clontech) e 16 uL de uma solução de beta-mercaptoetanol 1 M. Ao término do período de incubação, a membrana foi seca e o resultado visualizado. O resultado foi considerado positivo quando houve aparecimento da cor azul referente as colônias lisadas positivas.

Mini-preparação de DNA de levedura

Colônias de leveduras que cresceram em meio SD-Ade/-His/-Leu/-Trp e se apresentaram positivas para teste de beta-galactosidase em papel de filtro foram inoculadas em meio SD-Leu e incubadas a 30°C por 48 a 72 horas com agitação constante. Três mL dessa cultura foram centrifugados em um tubo de microcentrífuga a 7500 x g por 1 minuto. O precipitado de leveduras foi ressuspendido em 50 uL de PBS e a enzima liticase foi adicionada (50 a 100 U) para lisar a parede celular. As leveduras foram então incubadas a 37°C por 1 hora sob agitação constante. Ao término da incubação, 20 uL de uma solução SDS 20% foram adicionados ao tubo e as células de levedura foram homogeneizadas por 5 minutos. Para ajudar a romper a parede celular das leveduras, 10 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido foram feitos. O volume do lisado celular foi então elevado a 200 uL com TE e o DNA foi extraído com 200 uL de mistura de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), submetido a homogeneização e centrifugação a 16000 x g por 5 minutos. Cada sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 600 uL de etanol absoluto e 10 uL de solução 8 M de cloreto de lítio. Para precipitar melhor o DNA, os tubos foram incubados a -20°C por 15 minutos e então centrifugados a 16000 x g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% e centrifugado a 16000 x g a 4°C por 10 minutos. O precipitado de DNA

foi seco e então ressuspensionado em 20 uL de água; 10 uL desse DNA foram utilizados para transformar *E. coli DH5α* por choque térmico. O plasmídeo foi submetido a PCR e sequenciamento, utilizando-se iniciadores do vetor pACT2 da biblioteca de cDNA, para a identificação de possíveis interações protéicas com a isca ANKHD1.

Sequenciamento de DNA

As seqüências das construções da isca contendo a região da ANKHD1 no vetor pGBKT7 foram amplificadas utilizando-se iniciadores do vetor pGBKT7: iniciador sense: FW: 5'- AATACGACTCACTATAGGGC -3'; iniciador anti-sense: RW: 5'- TCTACCACGTGCTACGTGTC -3'. As seqüências do DNA das leveduras resultantes do ensaio de duplo-híbrido foram amplificadas utilizando-se iniciadores do vetor pACT2; iniciador sense: FW: 5'- CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC-3'; iniciador anti-sense: RW: 5'- CACTTGAACGCCCCAAAAAGTCATAGATGCT-3'.

Os produtos amplificados foram purificados, clonados e sequenciados com o reagente Big Dye (Applied Biosystems) em um sequenciador automático ABIprism 310 ou 377 (Applied Biosystems). Os cromatogramas obtidos foram montados por meio do Chromas versão 2.31 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).

Análise das seqüências

As seqüências obtidas foram submetidas ao banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e analisadas através dos programas gratuitos encontrados no mesmo site: ORF Finder, BLAST e Clustal W. O alinhamento das seqüências foi realizado através do programa gratuito Multalin (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/>).

Teste de co-transformação em levedura para confirmação da interação ANKHD1 e SIVA

A isca ANKHD1 em vetor pGBKT7 e a construção da SIVA1 e SIVA2 em vetor pGADT7 foram co-transformadas em levedura AH109 e cultivadas em meio SD-Ade/-His/-

Leu/-Trp. As colônias que cresceram neste meio foram então cultivadas em meio SD-Ade/-His/-Leu/-Trp contendo X- α -gal. O crescimento de colônias azuis indicava interação protéica. As construções de SIVA1 e SIVA2 em vetor pGADT7 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Serge Benichou (Departement de Maladies Infectieuses, Université Paris 5, Paris, France) (Figura 9).

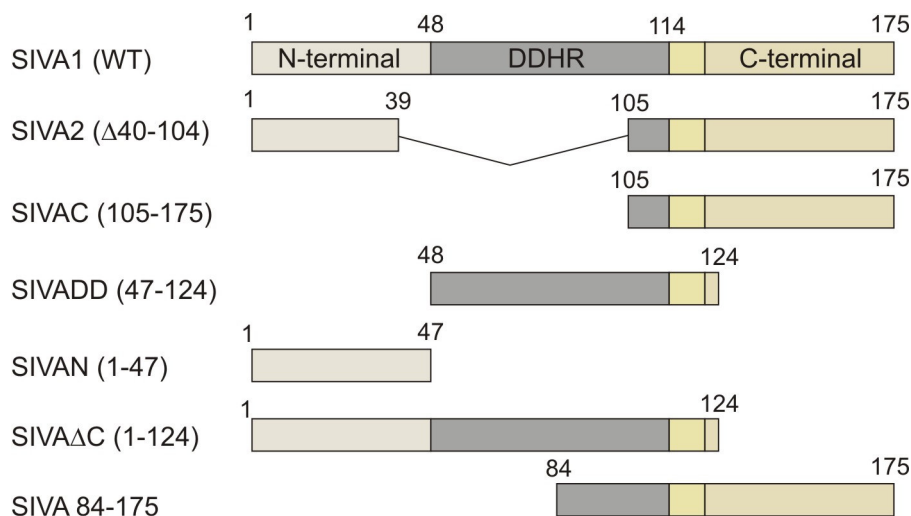


Figura 9: Representação esquemática das construções de SIVA1, SIVA2, e de diferentes regiões da SIVA1 fusionadas ao vetor pGADT7, utilizadas para co-transformar leveduras AH109 com a isca ANKHD1.

RNA de interferência

O silenciamento pós transcricional da ANKHD1 foi obtido através do uso do *SMART pool siRNA* da Dharmacon (Lafayette, CO). O reagente foi diluído a uma concentração de 5 μ M, estocado a -20°C e utilizado para transfecção de linhagens celulares a uma concentração de 400 η M. Células Jurkat em suspensão foram submetidas à transfecção transitória através do método de eletroporação. Resumidamente, as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI (RPMI medium 1640/Gibco, Rockville, MD) com 10% soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Rockville, MD) no dia precedente a transfecção. No dia do experimento as células foram lavadas com meio RPMI sem SFB e sem antibiótico. Em um volume final de 400 μ L na cuveta apropriada para eletroporação, foram incubados 10×10^6 células, OPTI-MEM (Gibco, Rockville, MD) e 400

ηM de RNAi. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, as células foram submetidas à eletroporação em aparelho Bio-Rad gene Pulser II (300 mV, 975 μF). Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, as células foram ressuspensas em meio RPMI com 10 % SFB e antibiótico. Após 48 horas, as células foram coletadas e submetidas a *Western Blotting*, para confirmação da redução da expressão protéica de ANKHD1, e ao estudo da apoptose celular, conforme descrito abaixo.

Estudo da apoptose celular

O estudo da apoptose foi realizado através da marcação das células Jurkat com anexina V (annexin V-FITC/BD PharMingen, CA, USA) e Iodeto de Propídio (Propidium Iodide/Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) por citometria de fluxo. Células Jurkat submetidas à inibição de ANKHD1 ou células controle (eletroporadas) (5×10^5) foram submetidas a duas lavagens em RPMI sem SFB e ressuspensas em 400 μL de tampão de ligação (10 mM Hepes pH=7,4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ e 1,8 mM CaCl₂). Foi adicionado 1 μg/mL de anexina V-FITC e as amostras foram incubadas durante 20 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Imediatamente antes da aquisição, foi adicionado 1 μL/mL de Iodeto de Propídio e 10000 eventos foram adquiridos. Os dados foram analisados no citômetro FACSCalibur (BD Bioscience), utilizando-se o software CellQuest (BD Bioscience). As células positivas para anexina V e negativas para PI, em relação ao número total de células, indicaram células Jurkat em processo de morte celular programada.

Análise Estatística

A comparação dos valores da quantidade relativa de expressão do RNAm de *ANKHD1* entre os pacientes com diagnóstico de Leucemias Agudas e células hematopoéticas normais foi realizada através do teste estatístico de Mann-Whitney U. Valor de $P \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Para os casos de LMA, foi utilizado o teste de Spearman para a correlação entre as seguintes variáveis: quantidade relativa de expressão do RNAm de *ANKHD1*, número de leucócitos no sangue periférico,

percentagem de blastos na medula óssea e resposta ao primeiro ciclo de quimioterapia de indução. Para a sobrevida, aplicou-se o método de Kaplan-Meier e o teste de regressão de Cox para encontrar variáveis preditivas.

RESULTADOS

1. Análise da expressão gênica de ANKHD1 em leucemias agudas, através da técnica de RT-PCR em tempo real

O estudo através de RT-PCR em tempo real revelou elevada expressão gênica de *ANKHD1* em todas as linhagens leucêmias estudadas; KG-1, HEL, K562, NB4, HL-60 Jurkat, MOLT4, Raji, Daudi and Namalwa, quando comparadas à expressão de *ANKHD1* em células hematopoéticas normais (medula óssea de 3 indivíduos normais) (Figura 10).

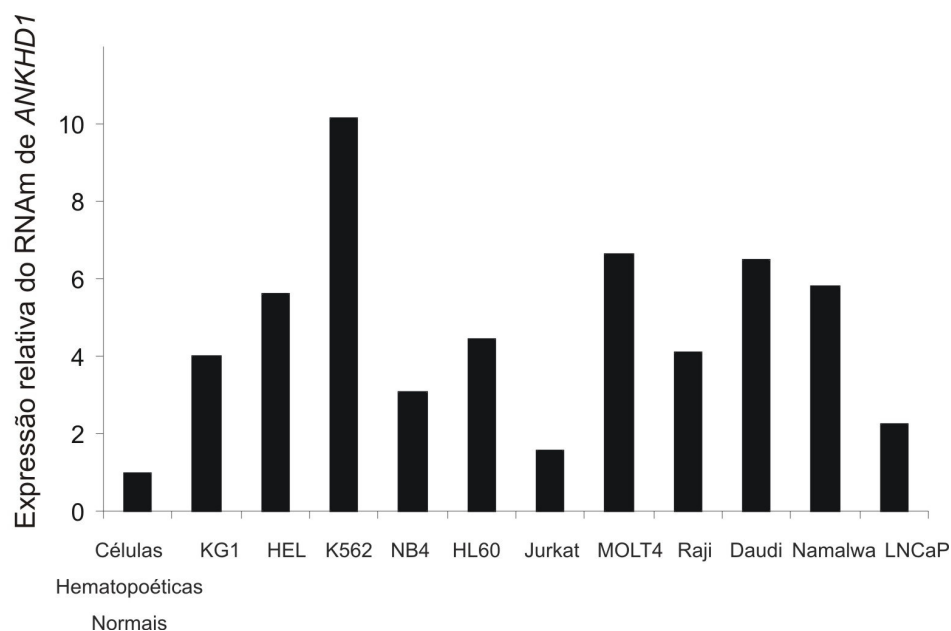


Figura 10: Expressão do RNAm de *ANKHD1* em linhagens de células leucêmicas. RT-PCR em tempo real foi realizado a partir de cDNA de diferentes linhagens de células leucêmicas humanas (KG-1, HEL, K562, NB4, HL-60, Jurkat, MOLT4, Raji, Daudi e Namalwa) e de adenocarcinoma de próstata (LNCaP). O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão do RNAm de *ANKHD1*. Note que a expressão do RNAm de *ANKHD1* esteve aumentada de 2 a 10 vezes nas linhagens leucêmicas estudadas, quando comparadas à expressão do RNAm de *ANKHD1* em células hematopoéticas normais (células de medula óssea de 3 indivíduos normais).

O RNAm de *ANKHD1* esteve altamente expresso em amostras de medula óssea de pacientes com diagnóstico de leucemia aguda, quando comparadas à expressão em células

hematopoéticas normais (mediana: 2,21 *versus* 1,05, $P = 0,002$). A elevada expressão estatisticamente significativa de *ANKHD1* em amostras de leucemia aguda se manteve quando os pacientes foram divididos em LLA (mediana: 2,53 *versus* 1,05, $P = 0,005$) e LMA (mediana: 1,97 *versus* 1,05, $P = 0,004$) se comparadas à expressão em células hematopoéticas normais (Figura 11).

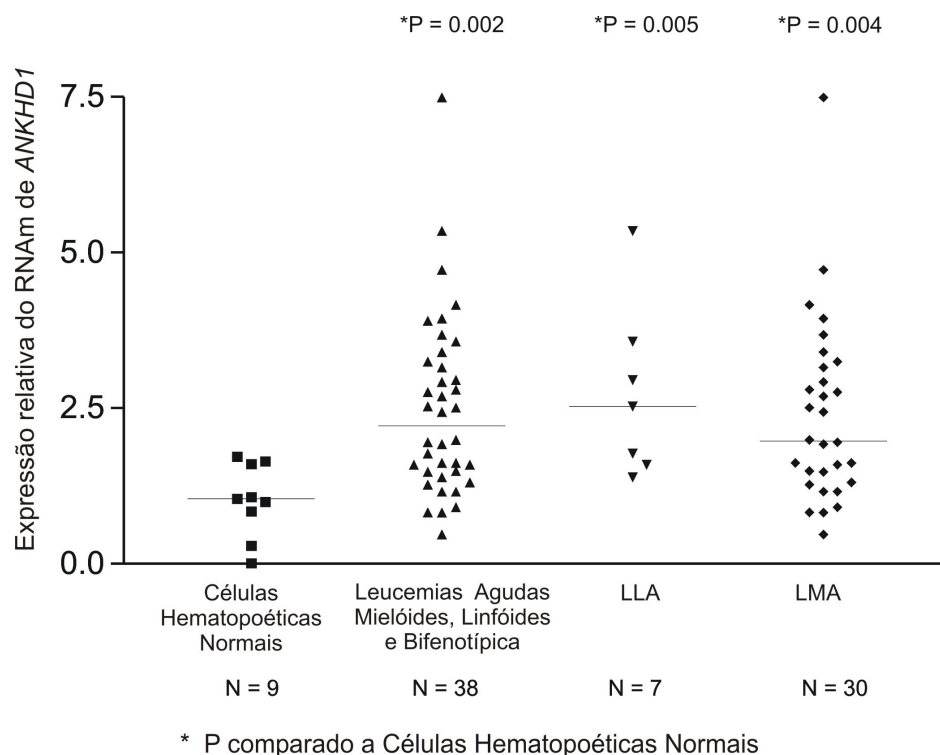


Figura 11: Expressão do RNAm de *ANKHD1* em células leucêmicas de pacientes. RT-PCR em tempo real foi realizado a partir de cDNA de sangue total de medula óssea de pacientes com diagnóstico de leucemia aguda (n=38) ou de células hematopoéticas normais (n=9), incluindo células mononucleares de sangue periférico e células totais de medula óssea de indivíduos normais. O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão do RNAm de *ANKHD1*. As linhas horizontais representam a mediana. Note que a expressão do RNAm de *ANKHD1* foi significativamente maior em células leucêmicas de pacientes com diagnóstico de leucemia aguda ($P = 0,002$), em células leucêmicas de pacientes com diagnóstico de Leucemia Mielóide Aguda (LMA) ($P = 0,004$), e em células leucêmicas de pacientes com diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda (LLA) ($P = 0,005$), quando comparadas à expressão em células hematopoéticas normais.

Para os casos de LMA, a quantidade relativa de expressão do RNAm de *ANKHD1* não apresentou correlação estatística com o número de leucócitos no sangue periférico, a percentagem de blastos na medula óssea e a resposta ao primeiro ciclo de quimioterapia de indução. Não houve associação da expressão do RNAm de *ANKHD1* com a sobrevida.

2. Análise da expressão da proteína ANKHD1 em células hematopoéticas normais e linhagens de células leucêmicas, através da técnica de *Western Blotting*

A expressão protéica de ANKHD1 foi analisada em extrato total de células mononucleares de sangue periférico de quatro indivíduos normais e extrato total de linhagens de células de LMA: KG-1, HEL, K562, NB4, HL-60 e de LLA: Jurkat, MOLT4, Raji, Daudi e Namalwa. Através de *Western Blotting*, observou-se uma expressão protéica de ANKHD1 extremamente baixa em células hematopoéticas normais e uma alta expressão de ANKHD1 em todas as linhagens de células leucêmicas estudadas (Figura 12). A expressão protéica de ANKHD1 em linhagens neoplásicas é caracterizada no *Western Blotting* por duas bandas de aproximadamente 270 kDa. A expressão protéica em células LNCaP foi utilizada como controle positivo da reação, como descrito previamente (Poulin et al. 2003).

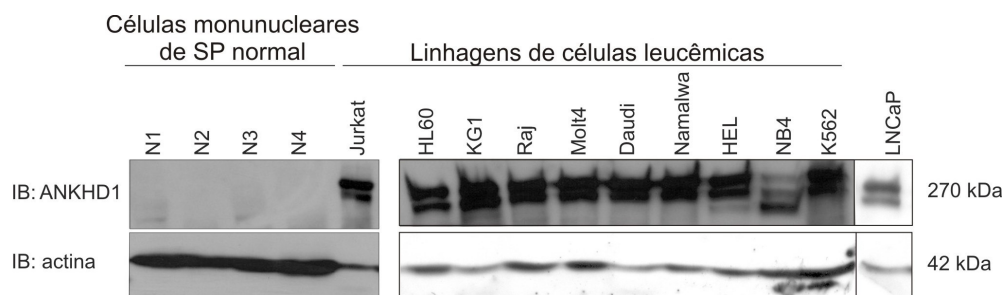


Figura 12: Expressão protéica de ANKHD1 em células hematopoéticas normais e leucêmicas. Análise por *Western Blotting* da expressão da proteína ANKHD1 em células mononucleares de sangue periférico de quatro indivíduos normais (N1 a N4) e em linhagens de células de Leucemia Mielóide Aguda: KG-1, HEL, K562, NB4, HL-60 e de Leucemia Linfóide Aguda: Jurkat, MOLT4, Raji, Daudi e Namalwa. Extratos totais de células foram incubados com anticorpo anti-ANKHD1 (270 kDa). Como controle da quantidade protéica aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-actina (42 kDa). O extrato total de LNCaP foi utilizado como controle do padrão de expressão de ANKHD1 no *Western Blotting*. A membrana de nitrocelulose foi revelada com *ECL Western Blotting Analysis System*. Note a elevada expressão protéica de ANKHD1 em todas as linhagens leucêmicas estudadas se comparadas às células hematopoéticas normais.

3. Análise da expressão da proteína ANKHD1 em diferentes tecidos humanos normais, através da técnica de *Western Blotting*

O estudo da expressão protéica de ANKHD1 em tecidos humanos normais revelou a presença de ANKHD1 em diferentes tecidos e em diferentes intensidades, destacando-se uma alta expressão em estômago, intestino delgado e linfonodo, e uma discreta expressão em fígado, baço, pulmão, rim e músculo esquelético (Figura 13). O padrão de expressão de ANKHD1 em tecidos humanos normais foi caracterizado por uma banda única de aproximadamente 270 kDa.

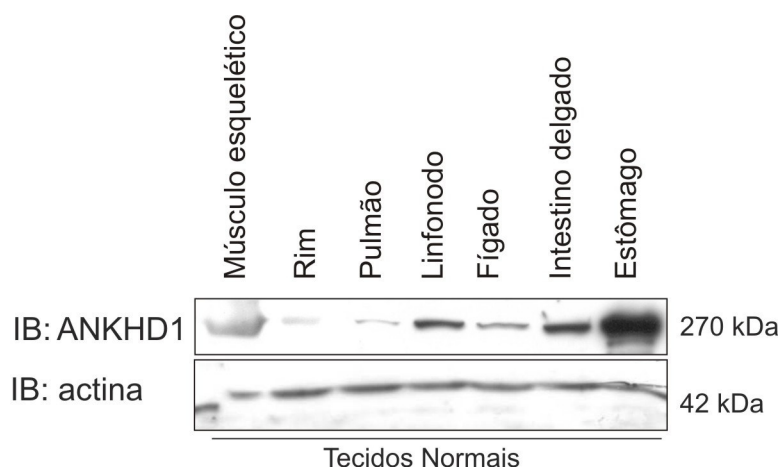


Figura 13: Análise por *Western Blotting* da expressão protéica de ANKHD1 em tecidos humanos normais. Extratos totais de tecidos humanos foram incubados com anticorpo anti-ANKHD1 (270 kDa). Como controle da quantidade protéica aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-actina (42 kDa). A membrana de nitrocelulose foi revelada com *ECL Western Blotting Analysis System*. Note as diferenças na expressão de ANKHD1 em diferentes tecidos normais.

4. Estudo da localização celular de ANKHD1 através da técnica de microscopia confocal e separação de frações celulares

O estudo por microscopia confocal revelou que ANKHD1 está presente no citoplasma de células mononucleares de sangue periférico normal (Figura 14) e das células leucêmicas, K562 e Jurkat (Figura 15).

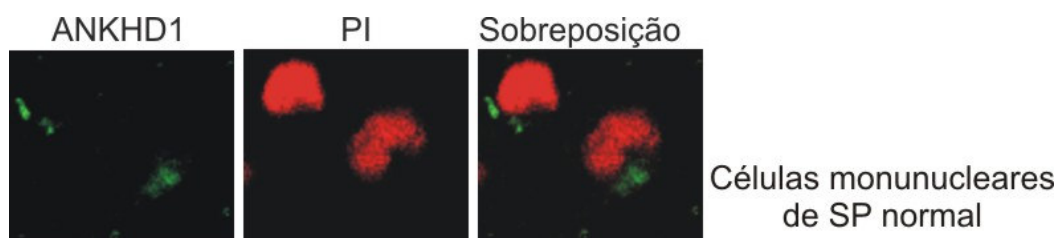


Figura 14: Imunolocalização fluorescente de ANKHD1 em células hematopoéticas normais. Células mononucleares de sangue periférico de um indivíduo normal foram fixadas e permeabilizadas. ANKHD1 foi visualizada com o anticorpo anti-ANKHD1 conjugado com Alexa 488 (fluorescência verde). Iodeto de Propídio (IP) foi utilizado para visualização do núcleo (fluorescência vermelha). A reação de imunofluorescência foi visualizada em microscópio confocal a laser (Zeiss LM510). Note que a sobreposição das duas imagens indica a localização citoplasmática de ANKHD1.

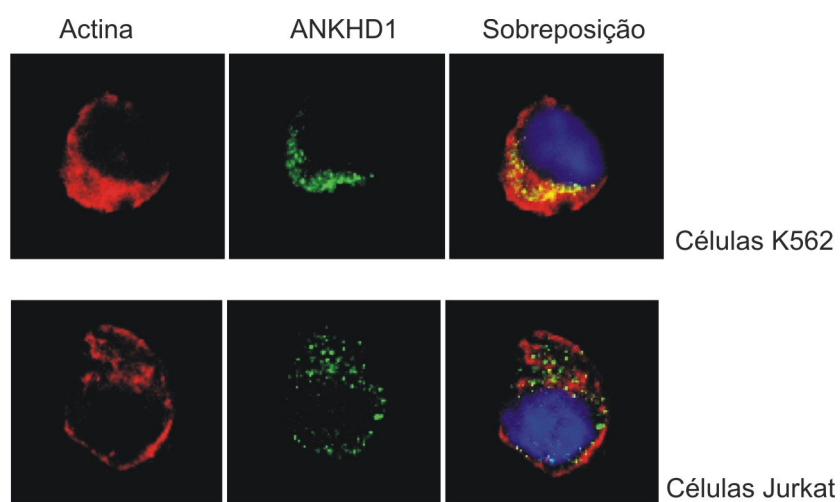


Figura 15: Imunolocalização fluorescente de ANKHD1 em células leucêmicas. Células K562 e Jurkat foram fixadas e permeabilizadas. ANKHD1 foi visualizada com o anticorpo anti-ANKHD1 conjugado com Alexa 488 (fluorescência verde). TRITC-conjugated phalloidin foi utilizado para visualização da actina citoplasmática (fluorescência vermelha). A reação de imunofluorescência foi visualizada em microscópio confocal a laser (Zeiss LM510). Note que a sobreposição das duas imagens, adicionada a marcação nuclear com DAPI (fluorescência azul), indica a localização citoplasmática de ANKHD1.

A localização citoplasmática de ANKHD1 foi confirmada através de separação de frações celulares e *Western Blotting* seguido de incubação com anticorpo anti-ANKHD1 (Figura 16). Este método revelou que ANKHD1 localiza-se na fração citoplasmática e de membrana e está ausente no núcleo. A incubação com anticorpo anti-actina e anti-histona revelaram a efetividade do método de separação de frações celulares, sendo a actina ausente na fração nuclear e a histona ausente na fração citoplasmática.

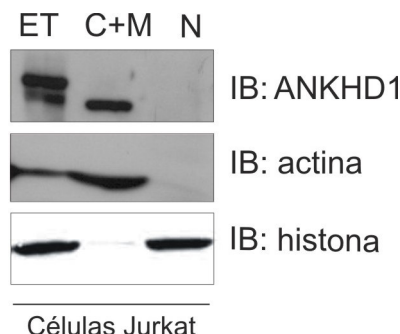


Figura 16: Análise por *Western Blotting* da expressão de ANKHD1 em frações celulares. Células Jurkat foram submetidas ao protocolo de separação de frações celulares. O extrato total (ET), a fração citoplasmática e de membrana (C+M), e a fração nuclear (N) foram submetidas a *Western Blotting* e incubação com anticorpo anti-ANKHD1. Os anticorpos anti-actina (presente no ET e na fração C+M) e anti-histona (presente no ET e na fração N) foram utilizados como controles da eficiência da separação de frações celulares. A membrana de nitrocelulose foi revelada com *ECL Western Blotting Analysis System*. Note que ANKHD1 localiza-se na fração citoplasmática e membrana e está ausente no núcleo.

5. Estudo da associação de ANKHD1 com SHP2 em células leucêmicas

Com o objetivo de avaliar uma possível interação da proteína ANKHD1 com SHP2, imunoprecipitação com anticorpo anti-SHP2 e incubação com anticorpo anti-ANKHD1 foram feitos em extrato protéico de células leucêmicas e adenocarcinoma de próstata (LNCaP). Em células leucêmicas K562 e em LNCaP houve a interação da proteína ANKHD1 com SHP2 (Figura 17, painel superior). A seguir foi realizado a imunoprecipitação reversa: o extrato protéico celular foi imunoprecipitado com anticorpo anti-ANKHD1 e incubado com anticorpo anti-SHP2, confirmando a interação por

imunoprecipitação (Figura 17, painel médio). Como controle negativo da imunoprecipitação, os extratos protéicos celulares foram imunoprecipitados com uma IgG de coelho não relacionada e incubados com anti-ANKHD1 ou anti-SHP2 e bandas inespecíficas não foram detectadas (Figura 17, painel inferior).

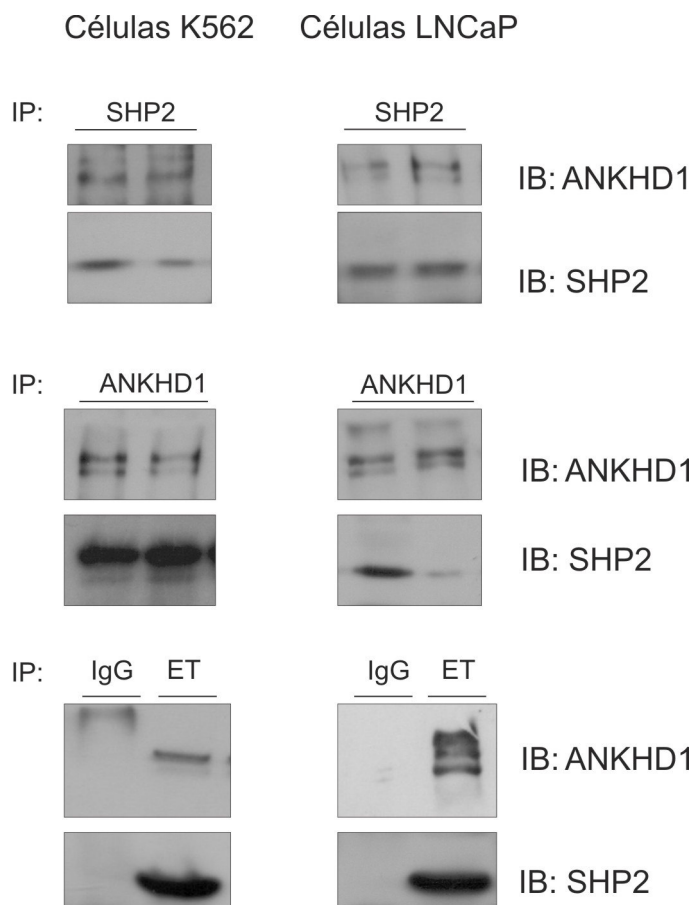


Figura 17: Estudo da associação de ANKHD1 e SHP2 em células K562 e LNCaP. Extratos protéicos de células K562 ou LNCaP foram imunoprecipitados (IP) em duplicata com anticorpo anti-SHP2 (painel superior), anti-ANKHD1 (painel médio) ou IgG de coelho (painel inferior) e incubadas (IB) com anticorpo anti-ANKHD1 ou anti-SHP2, conforme indicado. Extrato total (ET) de células K562 e LNCaP foram utilizadas como controle da incubação com anti-ANKHD1 e anti-SHP2 (painel inferior). A membrana de nitrocelulose foi revelada com *ECL Western Blotting Analysis System*. Note a presença de ANKHD1 nas células imunoprecipitadas com SHP2 (painel superior), e de SHP2 nas células imunoprecipitadas com ANKHD1 (painel médio).

Através de imunoprecipitação, observou-se que não há associação de ANKHD1 e SHP2 em células leucêmicas KG1, HL60, Daudi e Jurkat (Figura 18), apesar da alta expressão protéica de ANKHD1 (Figura 12) e SHP2 (Figura 19) detectada em todas as linhagens leucêmicas estudadas.

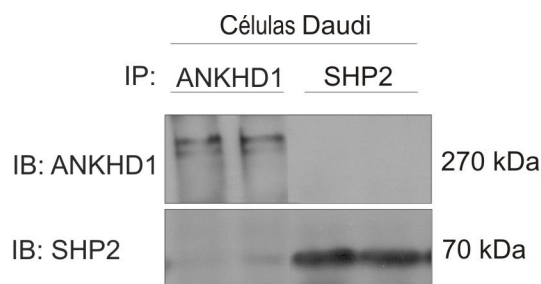


Figura 18: Estudo da associação de ANKHD1 e SHP2 em células Daudi. Extrato protéico de células Daudi foi imunoprecipitado (IP) em duplicata com anticorpo anti-ANKHD1 ou anti-SHP2 e incubadas (IB) com anticorpo anti-ANKD1 ou anti-SHP2. A membrana de nitrocelulose foi revelada com *ECL Western Blotting Analysis System*. Note a ausência de ANKHD1 nas células imunoprecipitadas com SHP2, e a ausência de SHP2 nas células imunoprecipitadas com ANKHD1.

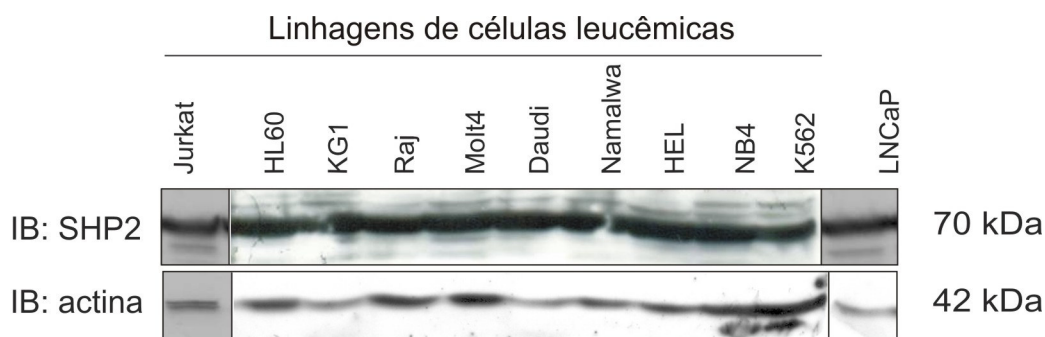


Figura 19: Expressão protéica de SHP2 em linhagens de células leucêmicas. Extratos protéicos de linhagens de células de Leucemia Mielóide Aguda: KG-1, HEL, K562, NB4, HL-60, e de Leucemia Linfóide Aguda: Jurkat, MOLT4, Raji, Daudi e Namalwa, e extrato protéico de células de adenocarcinoma de próstata LNCaP foram submetidos a *Western Blotting* e incubação com anticorpo anti-SHP2 (70 kDa). Como controle da quantidade protéica aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-actina (42 kDa). A membrana de nitrocelulose foi revelada com *ECL Western Blotting Analysis System*. Note a alta expressão de SHP2 em todas as linhagens leucêmicas estudadas.

6. Estudo da fosforilação de ANKHD1

Através da técnica de imunoprecipitação com anticorpo anti-ANKHD1, *Western Blotting* e incubação com anticorpos que detectam fosforilação protéica, observou-se que, em células leucêmicas, ANKHD1 está fosforilada em serina e não está fosforilada em tirosina (Figura 20). Em células hematopoéticas normais, observou-se que ANKHD1 não está fosforilada em serina ou tirosina.

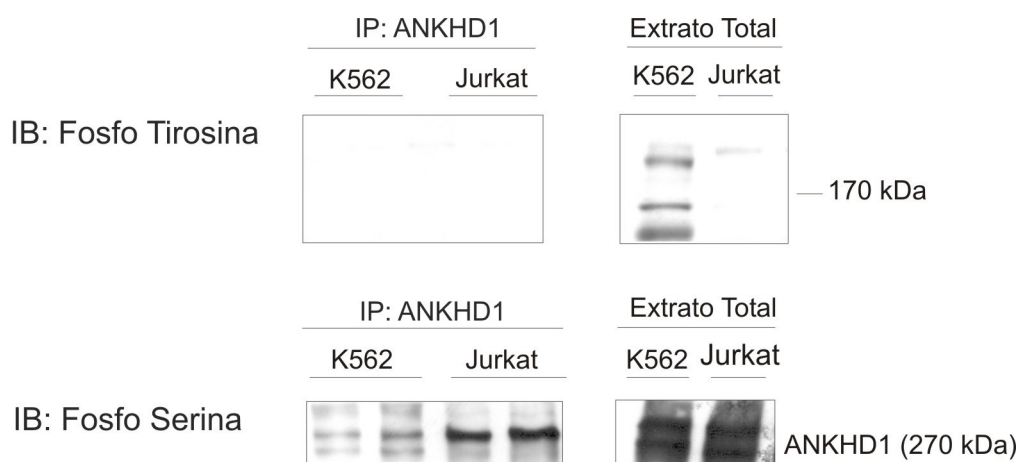


Figura 20: Estudo da fosforilação de ANKHD1 em células K562 e Jurkat. Extratos protéicos de células K562 e Jurkat foram submetidos a imunoprecipitação (IP) com anticorpo anti-ANKHD1 e incubação (IB) com anticorpo anti-fosfo-tirosina (painel superior) ou anti-fosfo-serina (painel inferior). Extratos protéicos totais de células K562 ou Jurkat foram utilizados como controle da incubação com os respectivos anticorpos. A membrana de nitrocelulose foi revelada com *ECL Western Blotting Analysis System*. Note que ANKHD1 (270 kDa) não está fosforilada em tirosina (painel superior), e está fosforilada em serina (painel inferior).

7. Ensaio de duplo-híbrido em levedura

7. 1. Preparação da isca

Para a realização do ensaio de duplo híbrido em levedura foi inicialmente realizada a preparação da isca que consiste de um fragmento de cDNA de *ANKHD1*, amplificado por PCR, usando oligonucleotídeos com adaptadores para enzimas de restrição. Após a escolha da região da isca, o desenho e a síntese dos oligonucleotídeos, procedemos a amplificação

das iscas a partir de 1 ng de cDNA de linhagem celular K562 e obtivemos uma banda de tamanho compatível com a isca (341pb). Os fragmentos obtidos foram subclonados em células competentes *E. coli DH5α*, isolados e ligados no vetor pGBKT7 do MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 (Clontech). Após a confirmação que a isca estava livre de mutações, através do seqüenciamento da isca com os iniciadores do vetor pGBKT7, o plasmídeo contendo a isca foi finalmente utilizado para transformar a linhagem AH109 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando-se o YEASTMAKER™ Yeast Transformation System da Clontech para expressar nestas células, a isca contendo uma região da *ANKHD1* em fusão com o domínio de ligação ao DNA da proteína GAL4.

O teste de toxicidade revelou que a isca não apresentava autotoxicidade, uma vez que o crescimento da isca foi de 0,08 DO₆₀₀/hora, semelhante ao crescimento do vetor pGBKT7 vazio (0,07 DO₆₀₀/hora).

O teste de autoativação foi negativo, uma vez que a levedura contendo a isca em pGBKT7 não apresentou crescimento em meio SD-His/-Trp, SD-Ade/-Trp e SD-Ade/-His/-Leu/-Trp.

O teste para verificar a expressão e estabilidade da proteína híbrida na levedura demonstrou que a construção contendo a isca no vetor pGBKT7 expressava a proteína híbrida.

7.2. Triagem da biblioteca de cDNA de medula óssea humana normal com a isca ANKHD1

A linhagem de levedura AH109 contendo a isca foi cruzada com outra linhagem de levedura Y187 pré-transformada com uma biblioteca de cDNA de medula óssea humana normal em um vetor pACT2, construído para expressar as proteínas do tecido em fusão com o domínio de ativação da proteína nativa de levedura GAL4 (Pretransformed Human Bone Marrow MATCHMAKER cDNA Library).

A titulação da biblioteca indicou uma boa viabilidade das células: $1,44 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (cfu)/mL.

A eficiência do cruzamento da isca ANKHD1 com a biblioteca de cDNA de medula óssea humana foi de 4,74% (percentagem de diplóides). Foram obtidas $5,6 \times 10^5$ cfu

diplóides/mL. Foram cultivados 10 mL de células. Portanto foram rastreados $5,6 \times 10^6$ clones.

A cultura de levedura resultante do casamento das duas linhagens de levedura foi cultivada em meio SD-Trp/-Leu/-Ade/-His, e em seguida as placas foram incubadas a 30°C de 5 a 20 dias. Ocorreu o crescimento de 102 colônias e destas, apenas 23 apresentaram resultado positivo para o teste da beta-galactosidase em papel de filtro.

7.3. Seqüenciamento e análise do cDNA

Os clones de levedura que apresentaram interação na triagem da biblioteca tiveram seus vetores isolados, isto é, o DNA da levedura foi extraído e re-transformado em *E. coli DH5α*. Este processo é necessário porque a qualidade e a quantidade do DNA extraído das leveduras são muito baixas. Após nova extração de DNA das bactérias, este foi utilizado em reação de PCR com os iniciadores do vetor pACT2 da biblioteca de cDNA de medula óssea. O produto do PCR foi submetido à reação de seqüenciamento. A seqüência de cDNA foi inicialmente traduzida em ORFs (“Open Reading Frames”) e a seqüência de aminoácidos foi analisada no programa BLAST do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). A Tabela II demonstra os resultados encontrados.

Tabela II. Resultado do BLAST das seqüências obtidas do ensaio de duplo híbrido com a isca ANKHD1 e a biblioteca de medula óssea humana normal.

Resultado do BLAST das seqüências obtidas do ensaio de duplo híbrido com a isca ANKHD1	nº de clones
BLAST insatisfatório	4
Seqüenciamento insatisfatório	5
Proteína hipotética	1
<i>Imunoglobulin lambda light chain</i>	3
<i>Homo sapiens ferritin, light polipeptide, mRNA</i>	2
<i>Homo sapiens mRNA for BiP protein</i>	3
<i>Homo sapiens prosaposin, mRNA</i>	1
<i>Homo sapiens CD27-binding protein (SIVA), transcript variant 1, mRNA</i>	1
<i>Homo sapiens vascular endothelial growth factor B isoform (VEGFB) gene, complete cds, alternatively spliced</i>	1
<i>Homo sapiens ZXD family zinc finger C, mRNA</i>	1
<i>Homo sapiens retinoblastoma binding protein 4, mRNA</i>	1

Nesta etapa do ensaio de duplo híbrido, o investigador deve definir, a partir de informações da literatura e do contexto celular, quais as possíveis interações protéicas devem ser confirmadas. Os dados obtidos a partir de uma revisão na literatura indicaram que SIVA apresenta duas isoformas, SIVA1 e SIVA2, e foi identificada como um ligante do CD27 em linfócitos (Prasad et al. 1997). SIVA está altamente expressa em leucemias agudas, onde exerce uma função pró-apoptótica, através da ativação da via das caspases (Py et al. 2004). Além destes dados que indicavam uma importante participação da SIVA na hematopoese, uma publicação recente (Stelzl et al. 2005), que consiste em um estudo de duplo híbrido em levedura realizado entre 4456 diferentes iscas e 5632 presas, indicou que SIVA e ANKHD1 participam de uma mesma via de sinalização: GRINL1A apresentou moderada probabilidade de se associar com ANKHD1 e baixa probabilidade de se associar com SIVA. A partir destas informações, a proteína SIVA foi escolhida para estudo de confirmação de interação com ANKHD1.

A representação esquemática da identificação do alinhamento da sequência protéica resultante do sequenciamento do DNA obtido da levedura do ensaio de duplo híbrido com as sequências da proteína SIVA1 e SIVA2 está demonstrada na Figura 21. A representação esquemática das proteínas SIVA1 e SIVA2 e da região protéica que interagiu com a isca ANKHD1 no ensaio de duplo híbrido está demonstrada na Figura 22.

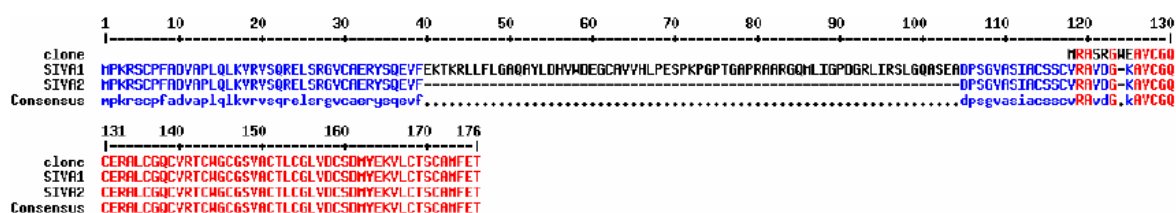


Figura 21: Alinhamento da sequência protéica obtida a partir do sequenciamento do DNA obtido da levedura que cresceu na triagem do ensaio de duplo híbrido realizado entre a isca ANKHD1 e a biblioteca de medula óssea humana (clone), da proteína SIVA1 (número de acesso NP006418) e da proteína SIVA2 (número de acesso NP068355). A região de similaridade entre as sequências de aminoácidos está representada em vermelho. A sequência de cDNA obtida foi inicialmente traduzida em ORFs (“Open Reading Frames”) e a sequência de aminoácidos foi analisada no programa BLAST do NCBI. O alinhamento foi realizado utilizando-se o programa Multalin (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin>).

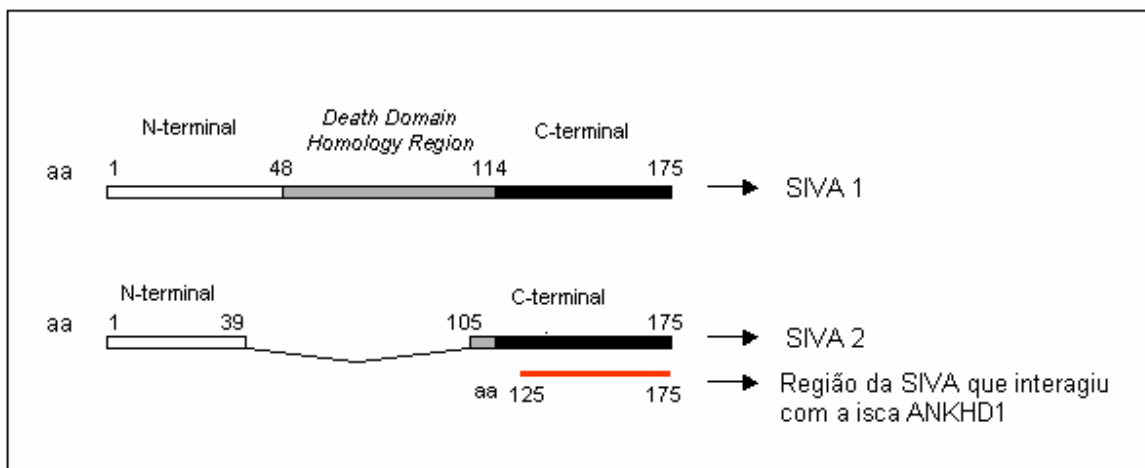


Figura 22: Representação esquemática da proteína SIVA1 e SIVA2. A posição dos aminoácidos de cada domínio (N-terminal, *Death Domain Homology Region*, e C-terminal) está indicada na parte superior. A região da SIVA que interagiu com a isca ANKHD1 no ensaio de duplo híbrido está indicada com uma linha vermelha. Note que a isca ANKHD1 interagiu com a região C-terminal da SIVA, comum a ambas as isoformas SIVA1 e SIVA2.

8. Confirmação da interação de ANKHD1 com SIVA1 e SIVA2

A confirmação das interações entre ANKHD1 e SIVA1, e entre ANKHD1 e SIVA2, foi obtida através do teste de co-transformação em levedura. A construção da isca ANKHD1 no vetor pGBKT7, contendo o domínio de ligação ao DNA da proteína GAL4 da levedura, foi co-transformada em levedura AH109 com a construção da SIVA1, SIVA2, e diferentes regiões da proteína SIVA1 no vetor pGADT7 em fusão com o domínio de ativação da proteína GAL4 da levedura. As leveduras co-transformadas foram cultivadas em meio SD-Trp/-Leu e meio SD-Trp/-Leu/-Ade/-His contendo ou não 20 mg/L de X- α -gal. Todas as co-transformações resultaram em crescimento de leveduras no meio SD-Trp/-Leu, indicando a efetividade da co-transformação (Figura 23A). Apenas as leveduras co-transformadas com a isca ANKHD1 e a isoforma SIVA1 e SIVA2 cresceram e se tornaram azuis no meio seletivo SD-Trp/-Leu/-Ade/-His contendo X- α -gal, confirmando as interações entre SIVA1 e ANKHD1, e SIVA2 e ANKHD1 (Figura 23B).

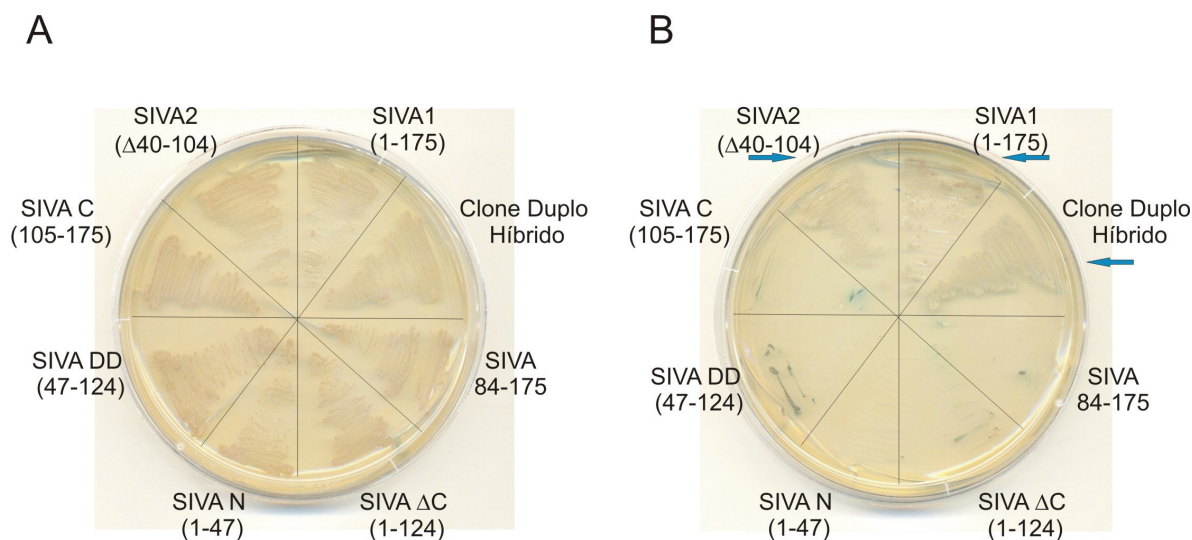


Figura 23: Resultado do teste de co-transformação em levedura. Fotos das placas SD-Trp/-Leu (A) e SD-Trp/-Leu/-Ade/-His contendo 20mg/L de X- α -gal (B) submetidas ao cultivo de leveduras AH109 co-transformadas com a isca ANKHD1 e diferentes construções da SIVA, conforme indicado na figura. O clone obtido do ensaio de duplo híbrido que detectou a interação ANKHD1 e SIVA foi transformado em AH109 e utilizado como controle positivo do teste (Clone Duplo Híbrido). Note que todas as co-transformações resultaram em crescimento de leveduras no meio SD-Trp/-Leu, indicando a efetividade da co-transformação. Apenas o controle positivo e as leveduras co-transformadas com a isca ANKHD1 e a isoforma SIVA1 e SIVA2 cresceram e adquiriram a cor azulada no meio seletivo SD-Trp/-Leu/-Ade/-His contendo X- α -gal.

9. Estudo da função de ANKHD1 na apoptose, após sua inibição por RNAi

Células leucêmicas Jurkat em suspensão foram submetidas a eletroporação em aparelho Bio-Rad gene Pulser II (300 mV, 975 μ F) e transfecção de 400 nM de RNAi da ANKHD1 (*SMART pool siRNA* da Dharmacon). As células foram coletadas 48 horas após o procedimento de eletroporação e submetidas a *Western Blotting* e citometria de fluxo para estudo da apoptose.

A eficiência do método de RNAi foi comprovada através de *Western Blotting* e incubação da membrana de nitrocelulose com anticorpo anti-ANKHD1 e anti-actina, que

revelou uma inibição da expressão protéica de ANKHD1 acima de 50% nas células submetidas à transfecção de RNAi (Figura 24).

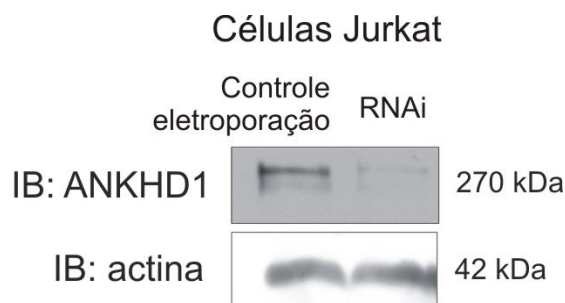


Figura 24: Inibição da expressão protéica de ANKHD1 através de RNAi em células leucêmicas. Células Jurkat em suspensão foram submetidas à eletroporação apenas (controle eletroporação) ou à transfecção de RNAi para ANKHD1 através de eletroporação. Após 48 horas as células foram submetidas a *Western Blotting* e incubação (IB) com anticorpo anti-ANKHD1 (270 kDa). Como controle da quantidade protéica aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-actina (42 kDa). A membrana de nitrocelulose foi revelada com *ECL Western Blotting Analysis System*. Note a redução na expressão protéica de ANKHD1 nas células submetidas ao RNAi.

Células Jurkat submetidas à eletroporação e células Jurkat submetidas à inibição de ANKHD1 através de RNAi foram coletadas 48 horas após o procedimento e submetidas a marcação com anexina V e PI. A inibição de ANKHD1 resultou na ativação da apoptose, visualizada através de citometria de fluxo que indicou aumento na percentagem de células anexina V positiva após inibição de ANKHD1 (27% de anexina V positiva), comparadas às células controle (14% de anexina V positiva) (Figura 25). Não foram detectadas células PI positivas, portanto, não foi detectada morte celular do tipo necrose. Estes resultados são preliminares, e experimentos incluindo um maior número de amostras serão necessários para a sua confirmação.

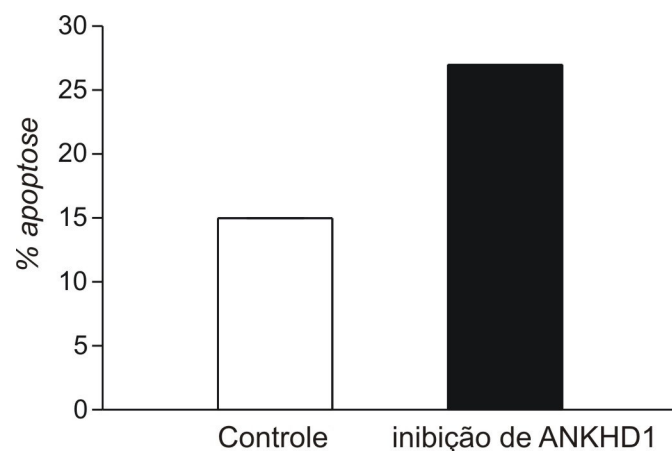


Figura 25: Apoptose celular após inibição de ANKHD1 por RNAi. Células Jurkat controle (submetidas à eletroporação) e células submetidas à inibição de ANKHD1 através de RNAi, foram coletadas 48 horas após a eletroporação, submetidas à marcação de anexina V e analisadas por citometria de fluxo. O eixo “y” representa a percentagem de células anexina V positivas sobre o número total de células. Note o aumento de cerca de duas vezes na percentagem de células anexina V positivas nas células submetidas à inibição de ANKHD1.

DISCUSSÃO

No presente estudo, a caracterização de um novo gene humano que codifica uma proteína com repetições de anquirina, ANKHD1, foi realizada na hematopoese normal e leucêmica. Através de RT-PCR em tempo real e *Western Blotting*, foi observado uma elevada expressão gênica e protéica de ANKHD1 em linhagens leucêmicas e em amostras de pacientes com diagnóstico de leucemia aguda, quando comparadas às células hematopoéticas normais. Através de microscopia confocal e separação de frações celulares, ANKHD1 foi detectada no citoplasma de células hematopoéticas normais e leucêmicas. O estudo da expressão protéica de ANKHD1 em diferentes tecidos normais, através de *Western Blotting*, revelou que ANKHD1 está expressa em diferentes tecidos normais, em diferentes intensidades. Com o objetivo de investigar vias de sinalização celular em que ANKHD1 esteja envolvida, através de imunoprecipitação e *Western Blotting*, observou-se que ANKHD1 associa-se com SHP2 em células de LMC em fase blástica (K562) e células de adenocarcinoma de próstata (LNCaP). Em células leucêmicas, ANKHD1 esteve fosforilada em serina, mas não em tirosina. Adicionalmente, através de ensaio de duplo híbrido, verificou-se que ANKHD1 associa-se com SIVA1 e SIVA2, proteínas pro-apoptóticas altamente expressas em células leucêmicas. Estudos funcionais preliminares indicaram que ANKHD1 provavelmente exerce um efeito anti-apoptótico em células leucêmicas.

ANKHD1 é uma proteína ortóloga à Mask da *Drosophila* (Smith et al. 2002), sugerindo que ANKHD1 pertence a uma família de proteínas conservada durante a evolução das espécies. Os domínios mais conservados correspondem às repetições de anquirina, motivo que gerou o interesse em estudar esta nova proteína. Ao contrário de outros domínios protéicos, como os domínios SH2 e SH3, as repetições de anquirina não reconhecem apenas uma sequência específica de aminoácidos ou estrutura protéica, mas podem interagir com diversos outros domínios (Mosavi et al. 2004; Sedgwick e Smerdon 1999). Várias interações protéicas são mediadas pelas repetições de anquirina em diferentes vias de sinalização (Mosavi et al. 2004). A presença de 20 repetições de anquirina na ANKHD1 sugere que esta participe de interações protéicas e vias de sinalização celular relevantes. Além das 20 repetições de anquirina, ANKHD1 possui um domínio KH na região C-terminal. O domínio KH foi inicialmente identificado em *human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*. Este domínio possui aproximadamente 70 aminoácidos e foi descrito

em algumas proteínas que se ligam a ácidos nucleicos (Gibson et al. 1993; Siomi et al. 1993). A função do domínio KH na ANKHD1 não está definida até o momento.

A elevada expressão gênica e protéica de ANKHD1 em células leucêmicas comparadas às células hematopoéticas normais sugere que ANKHD1 tenha um papel fundamental na leucemogênese. A desregulação de múltiplas vias de sinalização celular, incluindo JAK/STAT, RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT é achado freqüente em LMA (Steelman et al. 2004). A elevada expressão protéica de PKC α , ERK, pERK e pAKT, mas não AKT, foi recentemente identificada como fator prognóstico para sobrevida de pacientes com LMA, e a ativação simultânea de duas ou três vias de sinalização (PKC α , ERK e AKT) esteve associada a um pior prognóstico, em um estudo que incluiu 188 pacientes (Kornblau et al. 2006). A desregulação de múltiplas vias de sinalização celular em leucemia dificulta o desenvolvimento de uma droga eficaz no seu tratamento. A identificação de novas proteínas, e o constante progresso no entendimento das vias de sinalização celular são fundamentais para o desenvolvimento de drogas específicas. Neste contexto, ANKHD1 torna-se uma proteína particularmente interessante, uma vez que a sua expressão protéica é alta em leucemias e extremamente baixa em células hematopoéticas normais. Não houve correlação entre expressão de *ANKHD1* e sobrevida, mas o número de casos estudados foi pequeno, e não permite uma conclusão definitiva. O estudo da expressão de *ANKHD1* em um maior número de pacientes e com um maior período de seguimento será essencial para se definir a correlação entre expressão de *ANKHD1* e sobrevida nos pacientes com LMA.

A localização citoplasmática de ANKHD1 em células hematopoéticas normais e leucêmicas, detectada através de microscopia confocal, corrobora a hipótese de que ANKHD1 participe de importantes vias de sinalização que medeiam a transmissão de sinal do extracelular ao núcleo. É importante destacar que em células leucêmicas, através de separação de frações celulares, ANKHD1 foi detectada na fração citoplasmática e de membrana. A técnica de microscopia confocal utilizada neste trabalho não preserva as proteínas de membrana, as quais são degradadas pela solução permeabilizadora. Assim, pode-se afirmar que ANKHD1 localiza-se predominantemente no citoplasma das células, está ausente no núcleo, mas não se descarta a possibilidade de haver ANKHD1 também na membrana citoplasmática. A localização de uma proteína no citoplasma e na membrana celular é achado freqüente, uma vez que muitas proteínas citoplasmáticas são recrutadas à

membrana quando da ativação de receptores transmembranas por estímulos extracelulares. Exemplo de uma proteína localizada no citoplasmática e na membrana celular, que merece ser citada neste contexto, é a SHP2 (Xu et al. 2005).

Na *Drosophila*, Mask foi identificada através de um rastreamento genético para detectar possíveis interações com a proteína CSW, homóloga à SHP2 humana (Smith et al. 2002). SHP2 é uma fosfatase de tirosina citoplasmática codificada pelo gene *PTPN11*, participa de vias de sinalização celular de fatores de crescimento e citocinas, e exerce importantes funções na regulação da proliferação, diferenciação e migração celular através da ativação da via de sinalização da MAP quinase (Feng 1999; Neel et al. 2003) e AKT (Hakak et al. 2000; Wu et al. 2001; Zhang et al. 2002). A ativação de SHP2, resultante de mutações no gene *PTPN11* (Chan e Feng 2007) ou de sua fosforilação (Xu et al. 2005), é achado comum em leucemias agudas.

Através do estudo de diferenciação celular dos fotoreceptores dos olhos da *Drosophila*, outros componentes de vias de receptores tirosina quinase já foram caracterizados (Raabe 2000; Schlessinger 2000). Daughter of Sevenless (DOS) foi a primeira proteína identificada através do rastreamento genético para identificar possíveis interações com a proteína CSW, sendo que este rastreamento permitiu que a interação direta entre DOS e CSW fosse descrita e confirmada (Herbst et al. 1996). A proteína GAB humana, homóloga a DOS, foi posteriormente identificada como um substrato de SHP2 (Gu et al. 1998). As proteínas GAB constituem uma família de proteínas adaptadoras que incluem GAB1, GAB2 e GAB3 (Gu e Neel 2003; Nishida e Hirano 2003). A interação GAB1 e SHP2 medeia a ativação de ERK através do *Epidermal Growth Factor* (EGF) (Yamasaki et al. 2003). A interação GAB2 e SHP2 participa da sinalização do BCR-ABL (Sattler et al. 2002). Dessa forma, baseados nos estudos em *Drosophila*, a identificação da associação da ANKHD1 e SHP2 em células de LMC em fase blástica (K562) e células de adenocarcinoma de próstata (LNCaP), pode representar a identificação de uma nova interação protéica essencial para vias de sinalização celular em neoplasias. Entretanto, os achados de que ANKHD1 não está associada com SHP2 em linhagens celulares KG1, HL60, Daudi e Jurkat, apesar da alta expressão gênica e protéica de ambas as proteínas nestas linhagens leucêmicas, sugere a hipótese de que a associação entre ANKHD1 e SHP2 pode ser célula específica e, provavelmente, exerce uma função distinta em diferentes

células. Outra possível explicação para o diferente padrão de associação seria a presença de variantes de ANKHD1 e ou SHP2 em diferentes células. Mutações no gene *PTPN11* podem ser responsáveis pela ocorrência de variantes de SHP2, com variada susceptibilidade a sua ativação e seletividade de substratos (Ostman et al. 2006).

A associação da ANKHD1 e SHP2 em células de LMC em fase blástica (K562) pode ser especulada dentro do contexto específico das vias de sinalização nestas células. As células K562 possuem a t(9;22)(q34;q11) que gera a proteína de fusão BCR-ABL ou p210, uma proteína quinase constitutivamente ativada e fundamental para o desenvolvimento da LMC. Esta proteína induz a transformação das células hematopoéticas através da ativação de diversas vias de sinalização celular e atua através da inibição da apoptose ou indução da proliferação celular (Ren 2005; Shet et al. 2002). Moléculas de sinalização intracelular como MAP quinases, JAK/STAT, NF- κ B, PKC e c-MYC são ativados pela p210. BCR-ABL forma complexos protéicos com várias proteínas de sinalização celular, e substratos como STAT5, GRB2, CRKL, DOK, CBL e SHP2 têm sido descritos (Ren 2005; Shet et al. 2002). Estas proteínas são altamente fosforiladas em tirosina em células de LMC. Dentre estes substratos, GAB2 (Sattler et al. 2002) exerce uma função essencial na transformação da célula hematopoética e leucemogênese, enquanto outro, como CBL, parece não ser necessário na leucemogênese (Dinulescu et al. 2003). SHP2 participa de um complexo protéico com BCR-ABL e está altamente fosforilada nestas células (Sattler et al. 1997; Tauchi et al. 1994). Recentemente, SHP2 foi identificada como fundamental para a estabilização da p210 nestas células leucêmicas, e esta função não esteve associada à atividade catalítica de SHP2, mas sim à associação de SHP2 com a *heat shock protein 90* (HSP90) (Chen et al. 2007). Paralelamente, a função catalítica de SHP2 foi identificada como essencial à transformação leucêmica, uma vez que a inibição da atividade catalítica de SHP2 induziu a uma significativa redução na sobrevivência de células hematopoéticas transformadas com p210 (Chen et al. 2007). Neste contexto, a associação de ANKHD1 e SHP2 nas células K562 pode estar relacionada ao fenótipo leucêmico desencadeado pela presença da p210, podendo participar da ativação de vias de sinalização responsáveis pela sobrevivência celular ou pela estabilização da p210. Entretanto, futuros estudos serão necessários para a definição da função específica de ANKHD1 nestas células.

A associação de ANKHD1 e SHP2 em células de adenocarcinoma de próstata (LNCaP) pode indicar que essa associação ocorra em outras neoplasias e esteja associada a desregulação das vias de sinalização celular presente nos processos neoplásicos. A função de SHP2 em células LNCaP ainda não está definida. O envolvimento de SHP2 e de outras proteínas fosfatases em câncer têm despertado grande interesse no último ano (Ostman et al. 2006; Tonks 2006). Mutações no gene *PTPN11*, com conseqüente ativação da SHP2, têm sido detectadas em tumores sólidos incluindo câncer de pulmão e cólon, neuroblastoma e melanoma (Bentires-Alj et al. 2004). SHP2 também tem sido implicada em adenocarcinoma gástrico induzido por *Helicobacter pylori* e pode mediar transformação do epitélio gástrico através de interação com CAGA (Hatakeyama 2004). Dessa forma, ANKHD1 provavelmente exerce uma função importante em neoplasias não hematológicas e este papel pode estar relacionado à sua associação com SHP2.

Característica comum a várias proteínas envolvidas em vias de sinalização celular é a fosforilação em resíduos de tirosina e também em resíduos de serina e treonina. O achado de que ANKHD1 não se encontra fosforilada em tirosina, mas sim em serina, sugere que a regulação da atividade funcional de ANKHD1 ocorra através da fosforilação de resíduos de serina ou também treonina (a fosforilação específica em resíduos de treonina não foi testada). Exemplo de outra importante proteína que apresenta fosforilação em serina e treonina é a proteína AKT. A fosforilação da AKT no resíduo de treonina 308 pela PDK1 e no resíduo de serina 473 (essencial para sua ativação) pela PDK2 ativa AKT, que por sua vez fosforila BAD, NF- κ B, GSK/ β catenin, mTOR e caspases resultando em proliferação celular e inibição da apoptose (Steelman et al. 2004). É importante ressaltar que a fosforilação de ANKHD1 foi detectada apenas em células leucêmicas e não em células hematopoéticas normais, o que sugere que a regulação funcional de ANKHD1 ocorra de forma distinta entre estas duas células.

A alta expressão da ANKHD1 e sua fosforilação em serina em células leucêmicas, adicionada à associação de ANKHD1 e SHP2 em células K562, evidenciam a participação de ANKHD1 na transformação leucêmica. Apesar da associação de ANKHD1 e SHP2 não ter sido observada em outras linhagens leucêmicas, é possível concluir que a elevada expressão de ANKHD1 e sua fosforilação em serina ocorrem em células onde há alta fosforilação da SHP2 (Xu et al. 2005), ou seja, elevada ativação da atividade catalítica de

SHP2 (Lu et al. 2001), e conseqüente desregulação de múltiplas vias de sinalização celular (Kornblau et al. 2006; Steelman et al. 2004). Contudo, fica evidente a necessidade de se definir outros possíveis substratos de ANKHD1 e o papel funcional de ANKHD1 em células leucêmicas. Neste contexto, realizou-se o estudo de duplo híbrido utilizando-se uma isca que compreendia uma região de repetições de anquirina da ANKHD1.

Através de ensaio de duplo híbrido em levedura, foi identificada a interação ANKHD1 e SIVA (SIVA1 e SIVA2). A proteína SIVA1 foi identificada em 1997 como um ligante do CD27 (Prasad et al. 1997), um membro da família dos receptores do fator de necrose tumoral, em linfócitos. A função pró-apoptótica da SIVA1 foi posteriormente descrita quando da identificação de sua associação com BCL-XL, sendo que SIVA1 inibe a função anti-apoptótica de BCL-XL (Xue et al. 2002). Posteriormente foi descrito que ambas as isoformas da SIVA possuem uma função pró-apoptótica em células HPB e Jurkat (LLA), onde ativam a via das caspases (Py et al. 2004). A identificação da associação ANKHD1 com ambas isoformas da SIVA corrobora a hipótese de que ANKHD1 esteja envolvida em importantes vias de sinalização celular que medeiam mecanismos essenciais à sobrevivência da célula e desenvolvimento de neoplasias.

A identificação da região C-terminal da SIVA através do seqüenciamento do clone obtido do ensaio de duplo híbrido em levedura a partir da isca de ANKHD1 e da biblioteca de cDNA de medula óssea normal, sugere que a região C-terminal da SIVA é a região de interação com ANKHD1. A região N-terminal e C-terminal da SIVA, comum a ambas as isoformas, são as responsáveis por sua função pró-apoptótica (Py et al. 2004). Através do método de co-transformação em levedura, foi tentado mapear a região da SIVA que interage com ANKHD1. Entretanto, a isca ANKHD1 não apresentou associação com nenhuma região específica da SIVA testada. A explicação para este achado seria a necessidade da presença da região N-terminal e C-terminal da SIVA para que ocorra a interação com ANKHD1, pois alterações conformacionais na proteína SIVA podem ser essenciais para sua interação com ANKHD1. É importante também considerar que a isca ANKHD1 compreende apenas uma pequena região da ANKHD1, e um estudo de duplo híbrido e mapeamento de ligação realizado com uma isca que compreenda a forma completa da proteína poderia ampliar os resultados. Entretanto, a realização de um ensaio

de duplo híbrido com a forma completa de ANKHD1 apresenta limitações técnicas consideráveis, uma vez que seu cDNA completo possui 8120 pb.

Estudos funcionais preliminares realizados através da inibição da expressão de ANKHD1 por RNAi, em células de LLA (Jurkat), sugerem que esta proteína desempenhe um papel anti-apoptótico em células leucêmicas. O aumento de cerca de duas vezes na percentagem de células anexina V positiva nas células submetidas à inibição de ANKHD1 comparadas às células controle sugere um possível significado funcional. O estudo da apoptose após um maior período de inibição de ANKHD1 e após o uso de drogas indutoras de apoptose serão necessários para melhor evidenciar a função anti-apoptótica de ANKHD1 e comprovação dos estudos preliminares aqui realizados. Diante da descrição da associação ANKHD1 e SIVA, e da função anti-apoptótica de ANKHD1, é possível especular que ANKHD1 esteja envolvida em vias de apoptose através de sua associação e inibição da SIVA, conforme ilustrado na Figura 26.

A descrição recente na literatura de que ANKHD1, possivelmente, interage com GRINL1A (Stelzl et al. 2005) apóia a hipótese de que ANKHD1 pode estar envolvida na leucemogênese. GRINL1A foi identificada como um marcador tumoral, com expressão preferencial em células leucêmicas de pacientes com LMA se comparadas às células hematopoéticas normais (Guinn et al. 2005). A identificação de novos marcadores específicos de doenças expande as opções de tratamento e aumenta as chances de sucesso no tratamento de pacientes com neoplasias como LMA, reduzindo as altas taxas de mortalidade associada à doença.

Proteínas contendo repetições de anquirina possuem uma variedade de funções biológicas e têm sido descritas em organismos de vírus a humanos (Bennett e Chen 2001; Bork 1993). Duas novas isoformas variantes de ANKHD1 (VAPR-L and VAPR- S) possuem uma função anti-apoptótica em células HeLa e NT2 (Miles et al. 2005). Assim como outras proteínas com repetições de anquirina, provavelmente ANKHD1 tenha uma função na regulação da proliferação e morte celular.

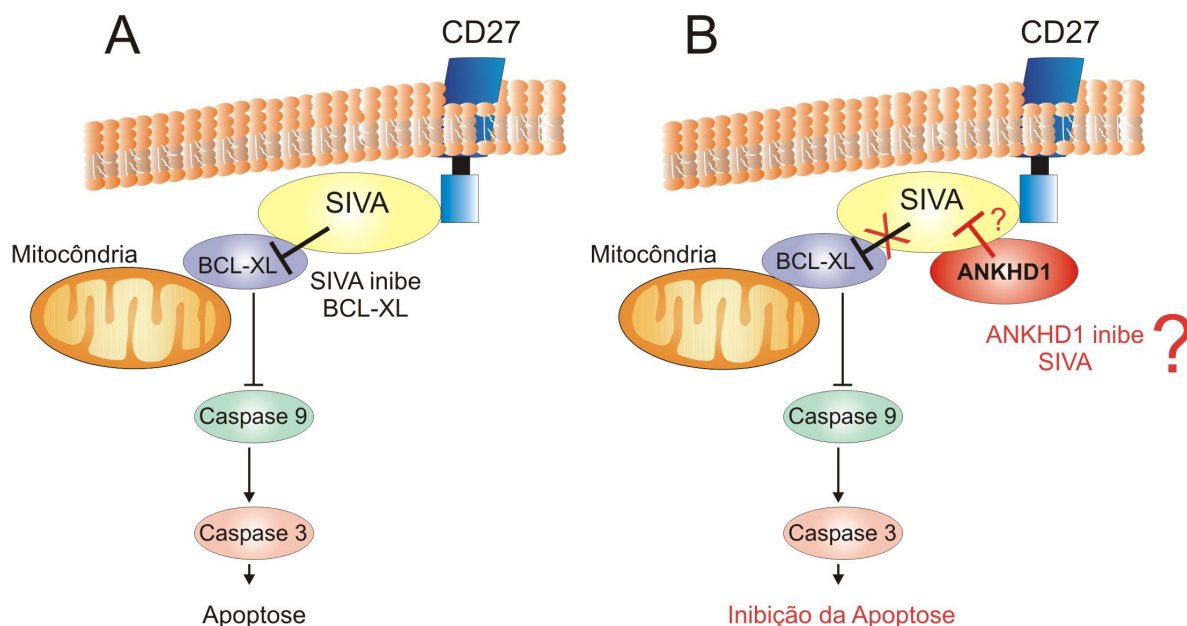


Figura 26: Representação esquemática da suposta função anti-apoptótica da ANKHD1 através de sua associação com a SIVA. (A) SIVA associa-se e inibe a função anti-apoptótica de BCL-XL. A função anti-apoptótica de BCL-XL ocorre através da inibição das caspases. (B) Supostamente, ANKHD1 associa-se a SIVA e a inibe, impedindo o efeito inibitório da SIVA sobre BCL-XL, resultando na inibição das caspases e da apoptose.

Em conclusão, o presente estudo identificou ANKHD1 como uma nova proteína altamente expressa em leucemias agudas, associada à SHP2 e SIVA em diferentes células, e, possivelmente, envolvida com o fenótipo anormal da célula leucêmica através de uma função anti-apoptótica. Os achados aqui descritos sugerem que ANKHD1 pode ser uma molécula alvo para a terapia da leucemia no futuro, e permitirão direcionar novos estudos com o objetivo de melhor elucidar as funções específicas de ANKHD1 em diferentes células hematopoéticas normais e leucêmicas.

CONCLUSÃO

O conjunto dos resultados apresentados neste trabalho permite as seguintes conclusões:

1. O RNAm e a proteína ANKHD1 apresentam elevada expressão em células leucêmicas quando comparadas às células hematopoéticas normais.
2. A proteína ANKHD1 está diferentemente expressa em tecidos humanos normais como rim, baço, estômago, intestino delgado, músculo esquelético, fígado, pulmão e linfonodo.
3. A proteína ANKHD1 está localizada predominantemente no citoplasma, e ausente no núcleo de células hematopoéticas normais e de linhagens de células leucêmicas K562 e Jurkat.
4. ANKHD1 está associada à SHP2 em linhagem celular de LMC em fase blástica (K562), e adenocarcinoma de próstata (LNCaP). A associação da ANKHD1 com SHP2 não foi observada em linhagem celular KG1, HL60, Daudi e Jurkat.
5. ANKHD1 associa-se às proteínas SIVA1 e SIVA2, conforme detectado em ensaio de duplo híbrido.
6. ANKHD1 está fosforilada em serina em células leucêmicas, mas não em células hematopoéticas normais.
7. Estudos funcionais preliminares indicam que a inibição de ANKHD1, por RNAi, resulta na ativação da apoptose, sugerindo que ANKHD1 desempenhe uma função anti-apoptótica nas células leucêmicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Austin, J. and Kimble, J. Transcript analysis of *glp-1* and *lin-12*, homologous genes required for cell interactions during development of *C. elegans*. **Cell**, 58(3): 565-571, 1989.
- Bain, B. J.. **Leukaemia diagnosis**. Malden, Mass.: Blackwell Pub., 2003.
- Beck, K. A., Buchanan, J. A. and Nelson, W. J. Golgi membrane skeleton: identification, localization and oligomerization of a 195 kDa ankyrin isoform associated with the Golgi complex. **J Cell Sci**, 110 (Pt 10)(1239-1249, 1997.
- Beck, K. A. and Nelson, W. J. A spectrin membrane skeleton of the Golgi complex. **Biochim Biophys Acta**, 1404(1-2): 153-160, 1998.
- Bennett, V. and Chen, L. Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. **Curr Opin Cell Biol**, 13(1): 61-67, 2001.
- Bennett, V. and Gilligan, D. M. The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. **Annu Rev Cell Biol**, 9(27-66, 1993.
- Bentires-Alj, M., Paez, J. G., David, F. S., Keilhack, H., Halmos, B., Naoki, K., et al. Activating mutations of the noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 gene in human solid tumors and adult acute myelogenous leukemia. **Cancer Res**, 64(24): 8816-8820, 2004.
- Blank, V., Kourilsky, P. and Israel, A. NF-kappa B and related proteins: Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. **Trends Biochem Sci**, 17(4): 135-140, 1992.
- Bork, P. Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? **Proteins**, 17(4): 363-374, 1993.
- Breeden, L. and Nasmyth, K. Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the Notch gene of *Drosophila*. **Nature**, 329(6140): 651-654, 1987.
- Brentani, H., Caballero, O. L., Camargo, A. A., da Silva, A. M., da Silva, W. A., Jr., Dias Neto, E., et al. The generation and utilization of a cancer-oriented representation of the human transcriptome by using expressed sequence tags. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100(23): 13418-13423, 2003.
- Chan, R. J. and Feng, G. S. PTPN11 is the first identified proto-oncogene that encodes a tyrosine phosphatase. **Blood**, 109(3): 862-867, 2007.

- Chan, R. J., Johnson, S. A., Li, Y., Yoder, M. C. and Feng, G. S. A definitive role of Shp-2 tyrosine phosphatase in mediating embryonic stem cell differentiation and hematopoiesis. **Blood**, 102(6): 2074-2080, 2003.
- Chen, J., Yu, W. M., Daino, H., Broxmeyer, H. E., Druker, B. J. and Qu, C. K. SHP-2 phosphatase is required for hematopoietic cell transformation by Bcr-Abl. **Blood**, 109(2): 778-785, 2007.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, 162(1): 156-159, 1987.
- Chou, P. Y. and Fasman, G. D. Prediction of beta-turns. **Biophys J**, 26(3): 367-383, 1979.
- Cunnick, J. M., Meng, S., Ren, Y., Despons, C., Wang, H. G., Djeu, J. Y., et al. Regulation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway by SHP2. **J Biol Chem**, 277(11): 9498-9504, 2002.
- Dias Neto, E., Correa, R. G., Verjovski-Almeida, S., Briones, M. R., Nagai, M. A., da Silva, W., Jr., et al. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97(7): 3491-3496, 2000.
- Dinulescu, D. M., Wood, L. J., Shen, L., Loriaux, M., Corless, C. L., Gross, A. W., et al. c-CBL is not required for leukemia induction by Bcr-Abl in mice. **Oncogene**, 22(55): 8852-8860, 2003.
- Feng, G. S. Shp-2 tyrosine phosphatase: signaling one cell or many. **Exp Cell Res**, 253(1): 47-54, 1999.
- Gascard, P. and Mohandas, N. New insights into functions of erythroid proteins in nonerythroid cells. **Curr Opin Hematol**, 7(2): 123-129, 2000.
- Gibson, T. J., Thompson, J. D. and Heringa, J. The KH domain occurs in a diverse set of RNA-binding proteins that include the antiterminator NusA and is probably involved in binding to nucleic acid. **FEBS Lett**, 324(3): 361-366, 1993.
- Gorina, S. and Pavletich, N. P. Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. **Science**, 274(5289): 1001-1005, 1996.
- Gu, H. and Neel, B. G. The "Gab" in signal transduction. **Trends Cell Biol**, 13(3): 122-130, 2003.

- Gu, H., Pratt, J. C., Burakoff, S. J. and Neel, B. G. Cloning of p97/Gab2, the major SHP2-binding protein in hematopoietic cells, reveals a novel pathway for cytokine-induced gene activation. **Mol Cell**, 2(6): 729-740, 1998.
- Guarente, L. Strategies for the identification of interacting proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90(5): 1639-1641, 1993.
- Guinn, B. A., Bland, E. A., Lodi, U., Liggins, A. P., Tobal, K., Petters, S., et al. Humoral detection of leukaemia-associated antigens in presentation acute myeloid leukaemia. **Biochem Biophys Res Commun**, 335(4): 1293-1304, 2005.
- Gutch, M. J., Flint, A. J., Keller, J., Tonks, N. K. and Hengartner, M. O. The *Caenorhabditis elegans* SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase PTP-2 participates in signal transduction during oogenesis and vulval development. **Genes Dev**, 12(4): 571-585, 1998.
- Hakak, Y., Hsu, Y. S. and Martin, G. S. Shp-2 mediates v-Src-induced morphological changes and activation of the anti-apoptotic protein kinase Akt. **Oncogene**, 19(28): 3164-3171, 2000.
- Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., Matsumoto, K. and Nishida, E. Shp2, an SH2-containing protein-tyrosine phosphatase, positively regulates receptor tyrosine kinase signaling by dephosphorylating and inactivating the inhibitor Sprouty. **J Biol Chem**, 279(22): 22992-22995, 2004.
- Hatakeyama, M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. **Nat Rev Cancer**, 4(9): 688-694, 2004.
- Herbst, R., Carroll, P. M., Allard, J. D., Schilling, J., Raabe, T. and Simon, M. A. Daughter of sevenless is a substrate of the phosphotyrosine phosphatase Corkscrew and functions during sevenless signaling. **Cell**, 85(6): 899-909, 1996.
- Higashitsuji, H., Itoh, K., Nagao, T., Dawson, S., Nonoguchi, K., Kido, T., et al. Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. **Nat Med**, 6(1): 96-99, 2000.
- Jacobs, M. D. and Harrison, S. C. Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. **Cell**, 95(6): 749-758, 1998.

- Keegan, L., Gill, G. and Ptashne, M. Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. **Science**, 231(4739): 699-704, 1986.
- Keilhack, H., David, F. S., McGregor, M., Cantley, L. C. and Neel, B. G. Diverse biochemical properties of Shp2 mutants. Implications for disease phenotypes. **J Biol Chem**, 280(35): 30984-30993, 2005.
- Kordeli, E., Lambert, S. and Bennett, V. AnkyrinG. A new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of Ranvier. **J Biol Chem**, 270(5): 2352-2359, 1995.
- Kornblau, S. M., Womble, M., Qiu, Y. H., Jackson, C. E., Chen, W., Konopleva, M., et al. Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. **Blood**, 108(7): 2358-2365, 2006.
- Kunimoto, M., Otto, E. and Bennett, V. A new 440-kD isoform is the major ankyrin in neonatal rat brain. **J Cell Biol**, 115(5): 1319-1331, 1991.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **J Mol Biol**, 157(1): 105-132, 1982.
- Lambert, S., Yu, H., Prchal, J. T., Lawler, J., Ruff, P., Speicher, D., et al. cDNA sequence for human erythrocyte ankyrin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 87(5): 1730-1734, 1990.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, 25(4): 402-408, 2001.
- Loh, M. L., Vattikuti, S., Schubert, S., Reynolds, M. G., Carlson, E., Lieu, K. H., et al. Mutations in PTPN11 implicate the SHP-2 phosphatase in leukemogenesis. **Blood**, 103(6): 2325-2331, 2004.
- Lu, W., Gong, D., Bar-Sagi, D. and Cole, P. A. Site-specific incorporation of a phosphotyrosine mimetic reveals a role for tyrosine phosphorylation of SHP-2 in cell signaling. **Mol Cell**, 8(4): 759-769, 2001.
- Lux, S. E., John, K. M. and Bennett, V. Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins. **Nature**, 344(6261): 36-42, 1990.

- Ma, J. and Ptashne, M. A new class of yeast transcriptional activators. **Cell**, 51(1): 113-119, 1987.
- Margalit, O., Somech, R., Amariglio, N. and Rechavi, G. Microarray-based gene expression profiling of hematologic malignancies: basic concepts and clinical applications. **Blood Rev**, 19(4): 223-234, 2005.
- Martinez-Climent, J. A., Andreu, E. J. and Prosper, F. Somatic stem cells and the origin of cancer. **Clin Transl Oncol**, 8(9): 647-663, 2006.
- Michaely, P. and Bennett, V. The membrane-binding domain of ankyrin contains four independently folded subdomains, each comprised of six ankyrin repeats. **J Biol Chem**, 268(30): 22703-22709, 1993.
- Milarski, K. L. and Saltiel, A. R. Expression of catalytically inactive Syk phosphatase in 3T3 cells blocks stimulation of mitogen-activated protein kinase by insulin. **J Biol Chem**, 269(33): 21239-21243, 1994.
- Miles, M. C., Janket, M. L., Wheeler, E. D., Chattopadhyay, A., Majumder, B., Dericco, J., et al. Molecular and functional characterization of a novel splice variant of ANKHD1 that lacks the KH domain and its role in cell survival and apoptosis. **Febs J**, 272(16): 4091-4102, 2005.
- Mosavi, L. K., Cammett, T. J., Desrosiers, D. C. and Peng, Z. Y. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. **Protein Sci**, 13(6): 1435-1448, 2004.
- Neel, B. G., Gu, H. and Pao, L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. **Trends Biochem Sci**, 28(6): 284-293, 2003.
- Nishida, K. and Hirano, T. The role of Gab family scaffolding adapter proteins in the signal transduction of cytokine and growth factor receptors. **Cancer Sci**, 94(12): 1029-1033, 2003.
- Noguchi, T., Matozaki, T., Horita, K., Fujioka, Y. and Kasuga, M. Role of SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with Src homology 2 domains, in insulin-stimulated Ras activation. **Mol Cell Biol**, 14(10): 6674-6682, 1994.
- Ostman, A., Hellberg, C. and Bohmer, F. D. Protein-tyrosine phosphatases and cancer. **Nat Rev Cancer**, 6(4): 307-320, 2006.

- Otto, E., Kunitomo, M., McLaughlin, T. and Bennett, V. Isolation and characterization of cDNAs encoding human brain ankyrins reveal a family of alternatively spliced genes. **J Cell Biol**, 114(2): 241-253, 1991.
- Pascual, J., Castresana, J. and Saraste, M. Evolution of the spectrin repeat. **Bioessays**, 19(9): 811-817, 1997.
- Pawson, T. and Scott, J. D. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. **Science**, 278(5346): 2075-2080, 1997.
- Perkins, L. A., Larsen, I. and Perrimon, N. corkscrew encodes a putative protein tyrosine phosphatase that functions to transduce the terminal signal from the receptor tyrosine kinase torso. **Cell**, 70(2): 225-236, 1992.
- Peters, L. L. and Lux, S. E. Ankyrins: structure and function in normal cells and hereditary spherocytes. **Semin Hematol**, 30(2): 85-118, 1993.
- Poulin, F., Brueschke, A. and Sonenberg, N. Gene fusion and overlapping reading frames in the mammalian genes for 4E-BP3 and MASK. **J Biol Chem**, 278(52): 52290-52297, 2003.
- Povey, S., Lovering, R., Bruford, E., Wright, M., Lush, M. and Wain, H. The HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). **Hum Genet**, 109(6): 678-680, 2001.
- Prasad, K. V., Ao, Z., Yoon, Y., Wu, M. X., Rizk, M., Jacquot, S., et al. CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 94(12): 6346-6351, 1997.
- Py, B., Slomianny, C., Auberger, P., Petit, P. X. and Benichou, S. Siva-1 and an alternative splice form lacking the death domain, Siva-2, similarly induce apoptosis in T lymphocytes via a caspase-dependent mitochondrial pathway. **J Immunol**, 172(7): 4008-4017, 2004.
- Qu, C. K., Shi, Z. Q., Shen, R., Tsai, F. Y., Orkin, S. H. and Feng, G. S. A deletion mutation in the SH2-N domain of Shp-2 severely suppresses hematopoietic cell development. **Mol Cell Biol**, 17(9): 5499-5507, 1997.
- Qu, C. K., Yu, W. M., Azzarelli, B., Cooper, S., Broxmeyer, H. E. and Feng, G. S. Biased suppression of hematopoiesis and multiple developmental defects in chimeric mice containing Shp-2 mutant cells. **Mol Cell Biol**, 18(10): 6075-6082, 1998.

- Qu, C. K., Yu, W. M., Azzarelli, B. and Feng, G. S. Genetic evidence that Shp-2 tyrosine phosphatase is a signal enhancer of the epidermal growth factor receptor in mammals. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 96(15): 8528-8533, 1999.
- Raabe, T. The sevenless signaling pathway: variations of a common theme. **Biochim Biophys Acta**, 1496(2-3): 151-163, 2000.
- Ren, R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. **Nat Rev Cancer**, 5(3): 172-183, 2005.
- Ruden, D. M. Activating regions of yeast transcription factors must have both acidic and hydrophobic amino acids. **Chromosoma**, 101(5-6): 342-348, 1992.
- Ruden, D. M., Ma, J., Li, Y., Wood, K. and Ptashne, M. Generating yeast transcriptional activators containing no yeast protein sequences. **Nature**, 350(6315): 250-252, 1991.
- Santos Duarte, A. S., Traina, F., Favaro, P. M., Basseres, D. S., de Carvalho, I. C., Medina Sde, S., et al. Characterisation of a new splice variant of MASK-BP3(ARF) and MASK human genes, and their expression patterns during haematopoietic cell differentiation. **Gene**, 363(113-122), 2005.
- Sattler, M., Mohi, M. G., Pride, Y. B., Quinnan, L. R., Malouf, N. A., Podar, K., et al. Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. **Cancer Cell**, 1(5): 479-492, 2002.
- Sattler, M., Salgia, R., Shrikhande, G., Verma, S., Choi, J. L., Rohrschneider, L. R., et al. The phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP and the protein tyrosine phosphatase SHP-2 form a complex in hematopoietic cells which can be regulated by BCR/ABL and growth factors. **Oncogene**, 15(19): 2379-2384, 1997.
- Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, 103(2): 211-225, 2000.
- Sedgwick, S. G. and Smerdon, S. J. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. **Trends Biochem Sci**, 24(8): 311-316, 1999.
- Shet, A. S., Jahagirdar, B. N. and Verfaillie, C. M. Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. **Leukemia**, 16(8): 1402-1411, 2002.
- Shi, Z. Q., Lu, W. and Feng, G. S. The Shp-2 tyrosine phosphatase has opposite effects in mediating the activation of extracellular signal-regulated and c-Jun NH2-terminal mitogen-activated protein kinases. **J Biol Chem**, 273(9): 4904-4908, 1998.

- Siomi, H., Matunis, M. J., Michael, W. M. and Dreyfuss, G. The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. **Nucleic Acids Res**, 21(5): 1193-1198, 1993.
- Smith, R. K., Carroll, P. M., Allard, J. D. and Simon, M. A. MASK, a large ankyrin repeat and KH domain-containing protein involved in Drosophila receptor tyrosine kinase signaling. **Development**, 129(1): 71-82, 2002.
- Steelman, L. S., Pohnert, S. C., Shelton, J. G., Franklin, R. A., Bertrand, F. E. and McCubrey, J. A. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. **Leukemia**, 18(2): 189-218, 2004.
- Stelzl, U., Worm, U., Lalowski, M., Haenig, C., Brembeck, F. H., Goehler, H., et al. A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. **Cell**, 122(6): 957-968, 2005.
- Tang, T. L., Freeman, R. M., Jr., O'Reilly, A. M., Neel, B. G. and Sokol, S. Y. The SH2-containing protein-tyrosine phosphatase SH-PTP2 is required upstream of MAP kinase for early Xenopus development. **Cell**, 80(3): 473-483, 1995.
- Tartaglia, M., Martinelli, S., Cazzaniga, G., Cordeddu, V., Iavarone, I., Spinelli, M., et al. Genetic evidence for lineage-related and differentiation stage-related contribution of somatic PTPN11 mutations to leukemogenesis in childhood acute leukemia. **Blood**, 104(2): 307-313, 2004a.
- Tartaglia, M., Mehler, E. L., Goldberg, R., Zampino, G., Brunner, H. G., Kremer, H., et al. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. **Nat Genet**, 29(4): 465-468, 2001.
- Tartaglia, M., Niemeyer, C. M., Fragale, A., Song, X., Buechner, J., Jung, A., et al. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. **Nat Genet**, 34(2): 148-150, 2003.
- Tartaglia, M., Niemeyer, C. M., Shannon, K. M. and Loh, M. L. SHP-2 and myeloid malignancies. **Curr Opin Hematol**, 11(1): 44-50, 2004b.
- Tauchi, T., Feng, G. S., Shen, R., Song, H. Y., Donner, D., Pawson, T., et al. SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp is a target of p210bcr-abl tyrosine kinase. **J Biol Chem**, 269(21): 15381-15387, 1994.

- Tonks, N. K. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 7(11): 833-846, 2006.
- Wu, C. J., O'Rourke, D. M., Feng, G. S., Johnson, G. R., Wang, Q. and Greene, M. I. The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for mediating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation by growth factors. **Oncogene**, 20(42): 6018-6025, 2001.
- Xu, R., Yu, Y., Zheng, S., Zhao, X., Dong, Q., He, Z., et al. Overexpression of Shp2 tyrosine phosphatase is implicated in leukemogenesis in adult human leukemia. **Blood**, 106(9): 3142-3149, 2005.
- Xue, L., Chu, F., Cheng, Y., Sun, X., Borthakur, A., Ramarao, M., et al. Siva-1 binds to and inhibits BCL-X(L)-mediated protection against UV radiation-induced apoptosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99(10): 6925-6930, 2002.
- Yamasaki, S., Nishida, K., Yoshida, Y., Itoh, M., Hibi, M. and Hirano, T. Gab1 is required for EGF receptor signaling and the transformation by activated ErbB2. **Oncogene**, 22(10): 1546-1556, 2003.
- Zhang, S. Q., Tsiaras, W. G., Araki, T., Wen, G., Minichiello, L., Klein, R., et al. Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2. **Mol Cell Biol**, 22(12): 4062-4072, 2002.
- Zhang, S. Q., Yang, W., Kontaridis, M. I., Bivona, T. G., Wen, G., Araki, T., et al. Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. **Mol Cell**, 13(3): 341-355, 2004.

ANEXOS

Anexo I



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas, SP
(0__19) 3788-8936
fax (0__19) 3788-8925

cep@hearu.fcm.unicamp.br

CEP, 19/11/02
(Grupo III)

PARECER PROJETO: N° 458/2002

I-IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO: "CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS GENES HUMANOS
RELACIONADOS AOS GENES DAS PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO DE
ESPECTRINA"**

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sara Teresinha Olalla Saad

INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 21/10/2002

II - OBJETIVOS

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

III - SUMÁRIO

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

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

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

V - PARECER DO CEP

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

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

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

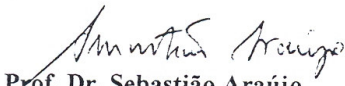
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também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

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

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

VII - DATA DA REUNIÃO

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


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

Anexo II



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

PARECER Nº 183/2003

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

Registro CEP: 458/2002

Processo nº 25000.149169/2002-39

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

Pesquisador Responsável : Dr. Sara Terezinha Olalla Saad

Instituição: Faculdade de Ciências Médicas / UNICAMP

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

Descrição do Estudo:

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

Considerações

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

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

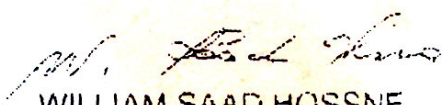
Entretanto, solicita-se que :

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

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

Situação : Projeto aprovado com recomendação

Brasília, 05 de fevereiro de 2003


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

APÊNDICES

Apêndice I

Artigo Publicado

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

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

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

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

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

Available online 31 July 2006

Abstract

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

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

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

1. Introduction

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

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

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

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

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

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

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

2. Materials and Methods

2.1. Primary leukemia samples

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

2.2. Human leukemia cell lines

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

2.3. Protein analysis by immunoblotting

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

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

2.4. Laser confocal analysis

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

2.5. Subcellular fractionation

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

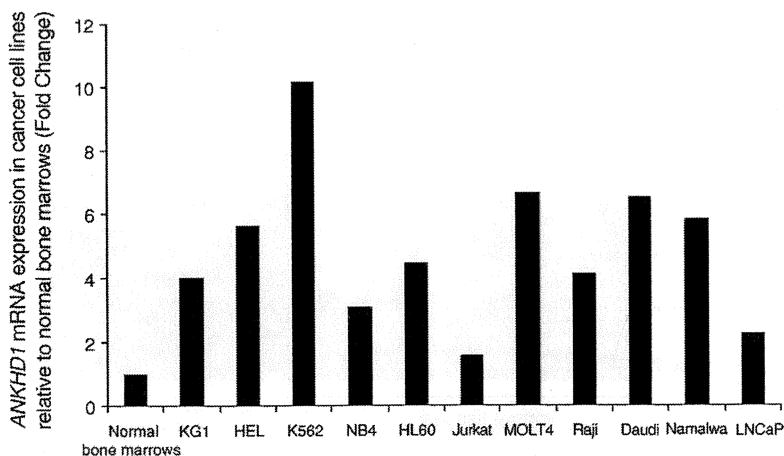


Fig. 1. Increased *ANKHD1* mRNA expression in leukemia cell lines. Real-time quantitative RT-PCR was performed on cDNA from a panel of human leukemia cell lines and the LNCaP cell line. Increased levels of *ANKHD1* mRNA were detected in all subtypes of leukemia cell lines, as compared with normal hematopoietic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

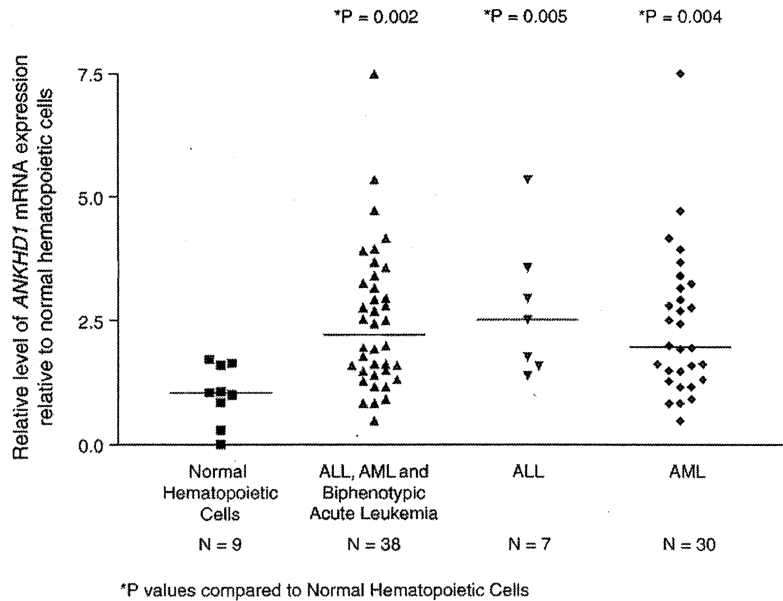


Fig. 2. Increased *ANKHD1* mRNA expression in primary leukemia cells. Real-time quantitative RT-PCR was performed on cDNA from fresh leukemia cell samples from patients at diagnosis or from normal hematopoietic cells. Horizontal lines represent medians. *ANKHD1* mRNA expression was significantly higher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

2.6. Real-time quantitative RT-PCR

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

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

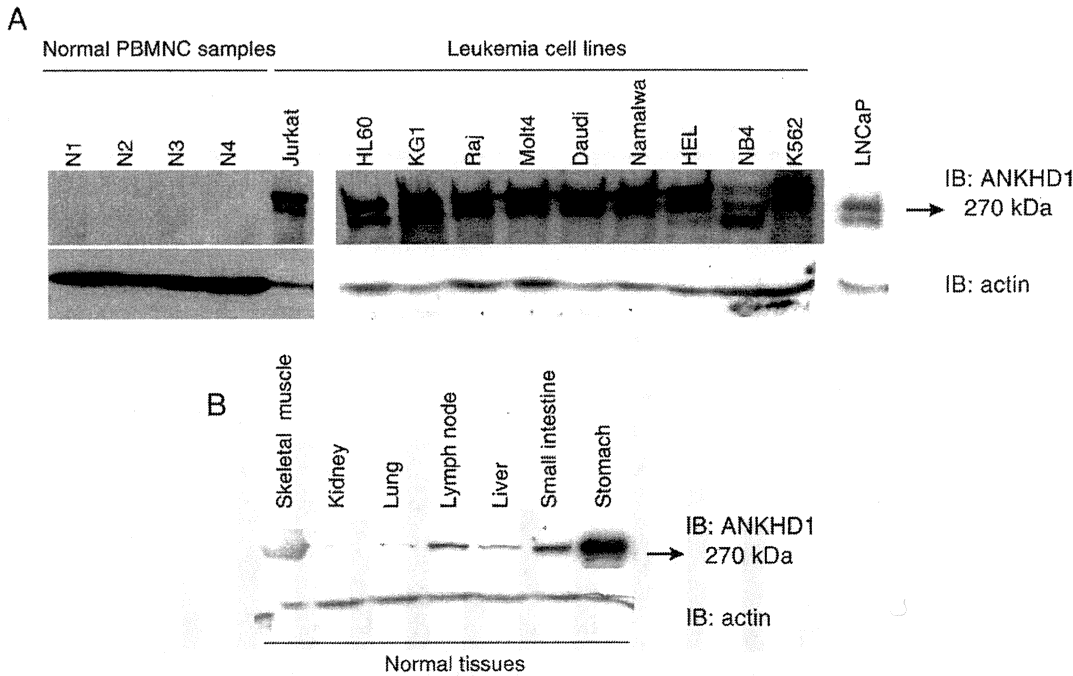


Fig. 3. Analysis of the ANKHD1 protein expression. Western blot analysis of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 4 healthy donors (N1 to N4), human cancer cell lines (A) and various human normal tissues (B) for the expression of the ANKHD1 protein. Total tissue or cell extracts were blotted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

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

2.7. Statistical analysis

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

3. Results

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

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

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

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

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

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

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

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

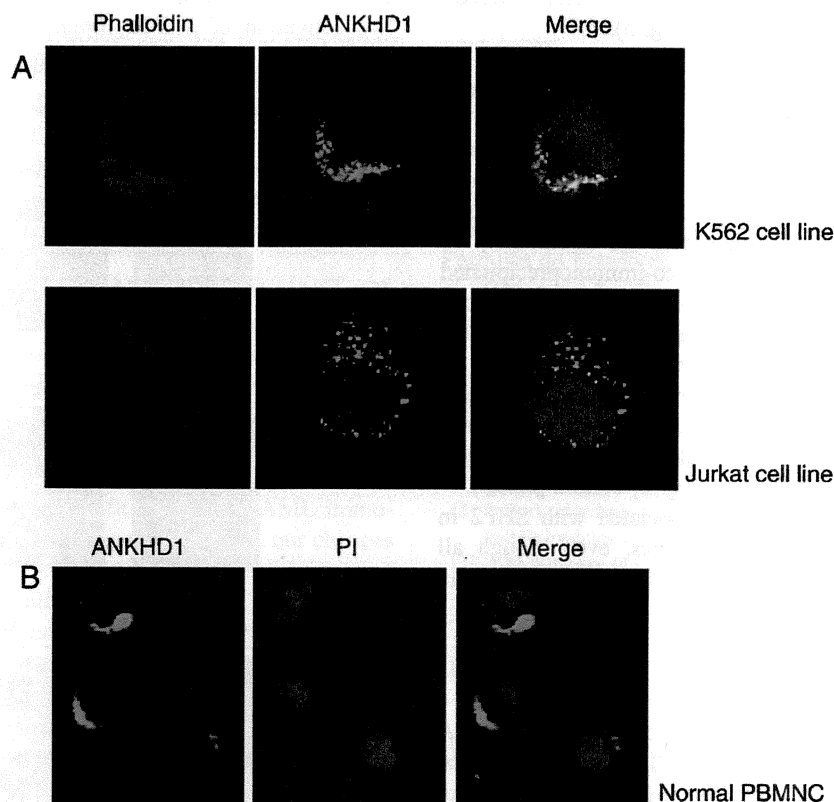


Fig. 4. Laser confocal analysis. K562 and Jurkat cells (A) were fixed and permeabilized and ANKHD1 was visualized by Alexa 488-conjugated anti-ANKHD1 antibody (green fluorescence). Phalloidin was used to visualize the actin (red fluorescence) and DAPI to mark the nuclei (blue fluorescence), as detailed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

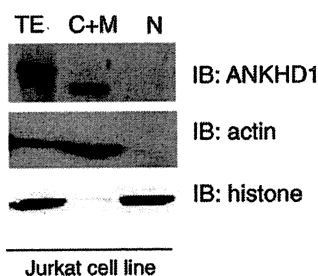


Fig. 5. Subcellular localization of ANKHD1 in the Jurkat cell line. Jurkat cells were lysed in hypotonic buffer and lysates were used to prepare total cellular protein extract (TE), cytosolic and membrane (C+M) and nucleus (N) fractions. An aliquot of each fraction (100 μ g total proteins) was subjected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

3.3. Subcellular localization of ANKHD1

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

3.4. Association of ANKHD1 and SHP2 in cancer cell lines

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

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

4. Discussion

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

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

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

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

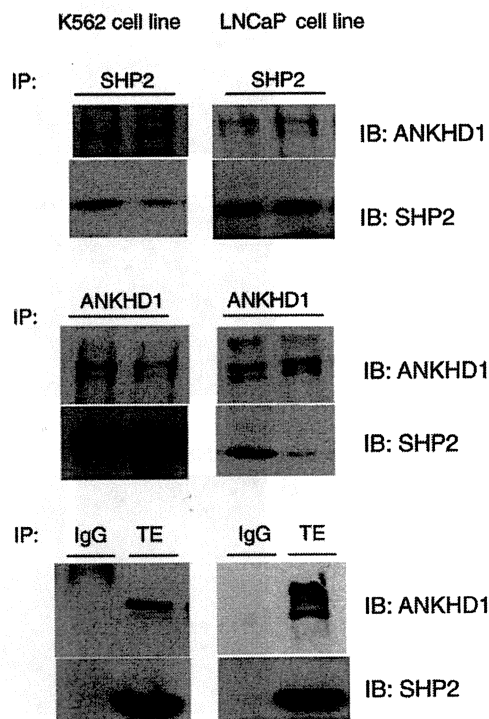


Fig. 6. ANKHD1 is a substrate of SHP2 protein. Lysates from K562 or LNCaP cells containing equal amounts of protein were immunoprecipitated (IP) in duplicate with anti-SHP2 antibodies (upper panel), anti-ANKHD1 antibodies (middle panel) or normal rabbit IgG (bottom panel) and immunoblotted (IB) with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

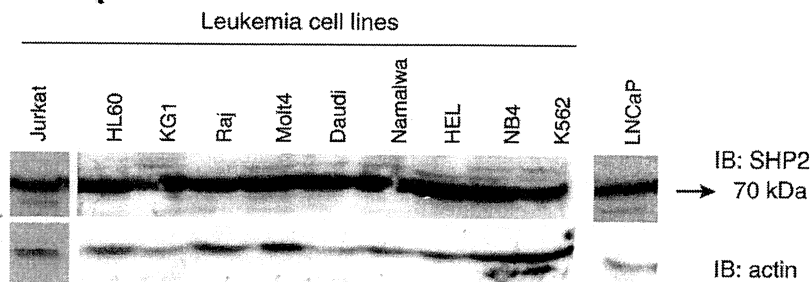


Fig. 7. High SHP2 protein expression in human cancer cell lines. Western blot analysis of human cancer cell lines for the expression of the SHP2 protein. Cell extracts were blotted with antibodies against SHP2 (70 kDa) or actin (42 kDa), as a control for equal sample loading, and developed with the ECL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

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

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

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

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

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

Acknowledgments

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

References

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

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

Apêndice II

Dados clínicos dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda.

Iniciais	Diagnóstico (FAB)	Data do diagnóstico	Data de nascimento	Idade ao diagnóstico	sexo	%Blastos na MO	Leuco /mm ³	Hb g/dl	Plt /mm ³
ES	LMA-M0	14/1/2002	15/6/1962	40	F	90	132000	10,9	21000
MAHS	LMA-M1	18/3/2005	14/3/1971	34	F	91	8000	7,0	45000
MMM	LMA-M1	4/9/2002	15/6/1967	35	M	96	30000	8,0	90000
NTS	LMA-M1	2/9/2002	27/6/1926	76	F	98	127000	4,8	28000
CBM	LMA-M1	16/12/2002	1/1/1962	41	F	92	2800	10,2	93000
CR	LMA-M1	26/5/2003	9/1/1958	45	M	94	10000	8,3	24000
OP	LMA-M2	7/10/2005	26/3/1962	44	M	73	89670	5,4	37000
VO	LMA-M2	21/12/2005	10/10/1952	53	F	79	22000	8,0	17000
JOX	LMA-M2	29/11/2002	3/2/1954	49	M	70	46320	6,6	11000
DFS	LMA-M2	2/1/2003	13/1/1979	24	M	87	24800	9,5	57000
AC	LMA-M2	21/5/2003	10/5/1933	70	M	59	112100	8,0	169000
EK	LMA-M2	29/7/2002	28/12/1928	74	F	94	1350	3,3	22000
PBC	LMA-M3	19/8/2002	15/6/1921	81	F	68	4230	8,7	51000
SDF	LMA-M3	29/5/2001	15/6/1961	40	F	41	11190	8,8	36000
JLM	LMA-M3	20/5/2002	15/12/1983	18	M	86	46620	5,1	21000
WM	LMA-M4	19/5/2005	7/4/1948	57	M	92,5	183800	9,0	28000
ALSF	LMA-M4	28/8/2001	5/3/1943	59	M	41	3980	6,7	26000
IXS	LMA-M4	14/6/2002	20/4/1950	52	M	91	26760	8,6	50000
NCM	LMA-M4	3/7/2004	24/9/1933	71	F	81	121900	9,3	56000
MCJ	LMA-M4	1/4/2003	7/6/1920	83	F	28	8240	9,7	19000
PTS	LMA-M4	11/4/2003	31/7/1937	66	M	73	115300	7,9	91000
HBA	LMA-M4	13/1/2004	20/10/1936	67	F	87	123000	8,1	89000
ACS	LMA-M4	20/2/2004	9/10/1927	76	M	85	47290	7,7	153000
JCA	LMA-M4	2/5/2005	6/9/1962	43	M	77	35270	9,7	36000
VSP	LMA-M4eos	20/1/2004	5/4/1953	51	M	33	7260	5,2	17000
WMGF	LMA-M5A	8/3/2005	2/11/1960	44	M	89	66100	13,0	223000
JJ	LMA-M5B	19/6/2001	14/4/1940	61	M	87	212800	8,6	83000
RCM	LMA-M5B	16/6/2003	30/8/1972	31	M	94	44040	11,8	66000
ELB	LMA-M6	20/8/2003	15/7/1961	42	M	35	1760	8,0	271000
EMC	LMA-M7	19/8/2005	23/1/1959	47	M	31	740	5,3	63000
SPS	LLA - pré B	23/1/2004	23/9/1961	42	M	92	93470	5,9	37000
ARS	LLA - pré B	18/3/2003	9/2/1972	31	F	77	1910	9,3	80000
ANLM	LLA-T	8/2/2002	10/11/1981	20	M	80	68000	7,7	37000
JAD	LLA-T	2/5/2005	20/12/1965	39	F	81,5	146000	8,4	87000
CAP	LLA-T	19/11/2001	10/5/1965	37	M	93	46000	13,1	51000
JP	LLA-T	18/11/2003	25/4/1948	56	M	90	45000	12,6	189000
LFM	LLA-T	13/7/2004	31/8/1983	21	M	70	59300	7,8	285000
JAC	Bifenotípica	5/2/2001	22/9/1961	39	M	94	58900	12,5	43000

Iniciais	Diagnóstico (FAB)	Cariótipo	PCR
ES	LMA-M0	46, XY	NA
MAHS	LMA-M1	46, XX	NA
MMM	LMA-M1	ausente mitose	NA
NTS	LMA-M1	47, XX, +21	NA
CBM	LMA-M1	46, XX	NA
CR	LMA-M1	ausente mitose	t(15;17) –
OP	LMA-M2	ausente mitose	NA
VO	LMA-M2	46, XY	t(15;17) –
JOX	LMA-M2	45, X-Y, t(8;21)(q22;q22)	NA
DFS	LMA-M2	46, XY	t(15;17) –
AC	LMA-M2	47, XY, +11	NA
EK	LMA-M2	46, XX	t(15;17) –
PBC	LMA-M3	45, XX, t(4;6)(q35;q22), del(5)(q31), del(10)(p11), t(15;17)(q22;q11), -18, del(22)(q11)	NR
SDF	LMA-M3	46, XX	t(15;17) +
JLM	LMA-M3	ausente mitose	t(15;17) +
WM	LMA-M4	46, XY	NA
ALSF	LMA-M4	NR	NA
IXS	LMA-M4	46, XY	NA
NCM	LMA-M4	46, XX	NA
MCJ	LMA-M4	46, XX	NA
PTS	LMA-M4	47, XY, der(11)t(1;11)(q22;p15)	NA
HBA	LMA-M4	ausente mitose	NA
ACS	LMA-M4	ausente mitose	NA
JCA	LMA-M4	46, XY	NA
VSP	LMA-M4eos	46, XY	NA
WMGF	LMA-M5A	46, XY	NA
JJ	LMA-M5B	ausente mitose	NA
RCM	LMA-M5B	46, XY	NA
ELB	LMA-M6	46, XY	NA
EMC	LMA-M7	46, XY	NA
SPS	LLA - pré B	46, XY	t(9;22) –
ARS	LLA - pré B	46, XX	t(9;22) –
ANLM	LLA-T	ausente mitose	NR
JAD	LLA-T	ausente mitose	t(9;22)–
CAP	LLA-T	46, XY	NR
JP	LLA-T	46, XY	t(9;22)–
LFM	LLA-T	46, XY	NR
JAC	Bifenotípica	46, XY	NA

Iniciais	Diagnóstico (FAB)	Data última avaliação	Situação atual	Data do óbito	nº de ciclos de indução até 1º RC	Sobrevida global (dias)	expressão relativa de <i>ANKHDI</i>
ES	LMA-M0	6/2/2002	óbito	6/2/2002	NA	23	1,59
MAHS	LMA-M1	12/12/2006	vivo 1º RC	NA	1	634	3,25
MMM	LMA-M1	15/10/2003	óbito	15/10/2003	2	406	3,68
NTS	LMA-M1	16/9/2002	óbito	16/09/2002	NA	14	4,72
CBM	LMA-M1	20/4/2003	óbito	20/4/2003	1	125	1,16
CR	LMA-M1	1/6/2003	óbito	1/6/2003	NA	6	7,49
OP	LMA-M2	18/10/2005	óbito	18/10/2005	NA	11	0,83
VO	LMA-M2	1/3/2006	óbito	1/3/2006	1	70	3,15
JOX	LMA-M2	ND	ND	ND	ND	ND	3,40
DFS	LMA-M2	29/11/2006	vivo 1º RC	NA	2	1427	2,76
AC	LMA-M2	7/12/2003	óbito	7/12/2003	2	200	4,16
EK	LMA-M2	1/8/2002	óbito	1/8/2002	NA	3	2,69
PBC	LMA-M3	26/8/2002	óbito	16/8/2002	NA	7	1,31
SDF	LMA-M3	12/6/2001	óbito	12/6/2001	NA	14	2,44
JLM	LMA-M3	22/5/2002	óbito	22/5/2002	NA	2	1,92
WM	LMA-M4	21/12/2006	vivo 1º RC	NA	1	581	1,27
ALSF	LMA-M4	ND	ND	ND	ND	ND	2,80
IXS	LMA-M4	7/12/2006	vivo 1º RC	NA	1	1637	1,99
NCM	LMA-M4	ND	ND	ND	ND	ND	0,47
MCJ	LMA-M4	23/12/2003	ND	ND	2	266	2,92
PTS	LMA-M4	30/4/2003	óbito	30/4/2003	NA	19	1,62
HBA	LMA-M4	1/9/2004	óbito	1/9/2004	1	232	3,94
ACS	LMA-M4	24/3/2006	vivo 1º RC	NA	1	763	1,49
JCA	LMA-M4	10/9/2005	óbito	10/9/2005	1	131	1,48
VSP	LMA-M4	27/12/2004	óbito	27/12/2004	1	342	2,51
WMGF	LMA-M5A	ND	ND	ND	ND	ND	0,91
JJ	LMA-M5B	2/7/2001	óbito	2/7/2001	NA	13	1,62
RCM	LMA-M5B	7/12/2006	vivo 1º RC	NA	2	1270	0,82
ELB	LMA-M6	24/7/2006	vivo 1º RC	NA	1	1069	1,95
EMC	LMA-M7	19/9/2005	óbito	19/9/2005	NA	31	1,16
SPS	LLA - pré B	21/12/2004	óbito	21/12/2004	1	333	1,77
ARS	LLA - pré B	5/8/2003	vivo 1º RC	NA	1	140	3,57
ANLM	LLA-T	21/12/2004	vivo 1º RC	NA	1	1047	5,35
JAD	LLA-T	29/10/2005	óbito	29/10/2005	1	180	2,53
CAP	LLA-T	21/11/2006	vivo 1º RC	NA	1	1828	1,59
JP	LLA-T	11/12/2003	óbito	11/12/2003	NA	23	2,95
LFM	LLA-T	5/12/2006	vivo 1º RC	NA	1	875	1,39
JAC	Bifenotípica	2/9/2002	óbito	2/9/2002	1	574	3,90

Abreviações. FAB: French-American-British; LMA: Leucemia Mielóide Aguda; LLA: Leucemia Linfóide Aguda; eos: eosinofílica; MO: Medula Óssea; Leuco: Leucócitos; Hb: Hemoglobina; Plt: Plaquetas; F: Feminino; M: Masculino; NA: Não Aplicável; NR: Não Realizado; ND: Não Disponível; RC: Remissão Completa.