



Lauremília Ricon Gomes Rodrigues da Costa

**“Estudo da Participação da Arhgap21 na  
migração e adesão de Células Progenitoras  
Hematopoéticas”**

**CAMPINAS**

**2014**





**Universidade Estadual de Campinas**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**Lauremília Ricon Gomes Rodrigues da Costa**

**“Estudo da Participação da Arhgap21 na migração e  
adesão de Células Progenitoras Hematopoéticas”**

**Orientadora: Sara Teresinha Olalla Saad**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia Médica na Área de Concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DE DOUTORADO  
DEFENDIDA PELA ALUNA LAUREMÍLIA RICON GOMES RODRIGUES DA COSTA  
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. SARA TERESINHA OLALLA SAAD**

Assinatura do Orientador

---

**CAMPINAS**

**2014**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C823e Costa, Lauremília Ricon G. R. da, 1983-  
Estudo da participação da Arhgap21 na migração e adesão de células progenitoras hematopoéticas / Lauremília Ricon Gomes Rodrigues da Costa. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Sara Teresinha Olalla Saad.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hematopoese. 2. Migração. 3. Adesão celular. 4. Camundongos transgênicos. I. Saad, Sara Teresinha Olalla, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** The role of Arhgap21 in the migration and adhesion of hematopoietic progenitor cells

**Palavras-chave em inglês:**

Hematopoiesis

Migration

Cell adhesion

Mice, Transgenic

**Área de concentração:** Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

**Titulação:** Doutora em Fisiopatologia Médica

**Banca examinadora:**

Sara Teresinha Olalla Saad [Orientador]

Patrícia Maria Bergamo Favaro

Camila Bononi de Almeida

Roger Chammas

Daniela Sanchez Basseres

**Data de defesa:** 29-07-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Fisiopatologia Médica

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**

LAUREMÍLIA RICON GOMES RODRIGUES DA COSTA

Orientador (a) PROF(A). DR(A). SARA TERESINHA OLALLA SAAD

**MEMBROS:**

1. PROF(A). DR(A). SARA TERESINHA OLALLA SAAD



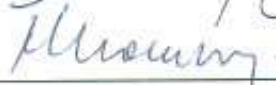
2. PROF(A). DR(A). PATRÍCIA MARIA BERGAMO FAVARO



3. PROF(A). DR(A). CAMILA BONONI DE ALMEIDA



4. PROF(A).DR(A). ROGER CHAMMAS



5. PROF(A).DR(A). DANIELA SANCHEZ BASSERES



Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 29 de julho de 2014



Dedico este trabalho à minha família, especialmente à Elis, minha princesa, e ao André, meu marido, amigo, companheiro, por todo apoio e compreensão que tiveram para que eu pudesse chegar até aqui.





## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus por tudo que me proporciona.

Agradeço aos meus pais, Inaldo e Sandra pelo amor e por sempre acreditarem e torcerem por mim. Às minhas irmãs, Ludimila e Lucília, por sua admiração. Aos meus avós, meus segundos pais, que sempre foram compreensivos e pacientes comigo. E à família Formiga pelo apoio, torcida e carinho.

Agradeço à minha família: André, meu marido, e minha filha, Elis. Eles me deram força e apoio, e foram o meu porto-seguro. Enchem minha vida de alegria. Com seu jeito doce, sapeca e feliz, Elis é minha companheira e, como ela mesma diz, minha amigona de todos os dias. Obrigada, filha, pelo seu sorriso, pelo seu olhar e por sua compreensão. Amo você mais do que tudo. André é exemplo de pai, de pessoa e de profissional. Sempre pude contar com sua ajuda. Viver ao seu lado é inspirador. Discutimos muito sobre ciência e ensino durante estes anos em que eu me formava. Deco, obrigada por tudo, principalmente por sonhar os meus sonhos e realizar o maior de todos eles: a nossa princesa Elis.

Agradeço à Sarita por permitir que eu faça parte do seu grupo, por sua orientação, pelas discussões e conselhos. Pelo seu exemplo profissional e pessoal. Admiro a sua energia e a paixão pelo que faz. Obrigada também pelo apoio quando, no meio desse doutorado, descobri que me tornaria mãe.

Agradeço à @Equipe - Juliana Xavier e Karla Ferro - pela amizade e companheirismo nestes anos. Jú e Karla, este trabalho é nosso; vocês sabem. Obrigada pela contribuição e presença em todos os resultados obtidos. Obrigada por renovarem minhas esperanças, por me darem força e impulso. Obrigada pela paciência, compreensão e companheirismo. Obrigada pelas discussões científicas e nada científicas também. Vocês são mulheres admiráveis, guerreiras, companheiras. Choramos e rimos, rimos muito juntas durante este tempo.

Compartilhamos a bancada e nossas vidas durante estes anos e espero que daqui pra frente essa amizade iniciada na bancada possa crescer e se tornar cada vez mais forte.

À Carol (Carolina Bigarella) por me receber no laboratório, me ensinar várias técnicas, auxiliar na concepção deste projeto, dividir seu conhecimento e pela amizade.

À Mariana Baratti, queridíssima Pupa, minha comadre, pela amizade e companheirismo. Por estar presente, junto com o Gustavo (compadre), nos momentos mais difíceis da minha vida e também nos mais felizes desses últimos anos. Agradeço também pelo suporte com a microscopia confocal.

Agradeço à Mariana Lazarini, à Andrana Calgarotto e à Letícia Archangelo pela amizade, por estarem sempre disponíveis em dividir o conhecimento, tirar dúvidas e apoiar. Admiro a dedicação, inteligência e garra das três. Obrigada à Mari, também pela ajuda com os *pull downs* e pela discussão com os rumos deste projeto.

Agradeço a todos os colegas do LBM pela convivência e apoio: Bruna, Flávia, João A., Fernanda, Fernando, Paula, Renata, Isabella, Luciana, Anamika; os recém- chegados: Juarez, Renata Giardini, Marisa e Ada; e as também “Arhgapianas”, que sofrem e torcem junto: Aline, Vanessa e Karin. Agradeço especialmente ao Matheus e João Kléber por “quebrarem o galho” naqueles momentos de correria, e à Rita, pois sempre esteve disposta a me ajudar.

Agradeço à Tereza por sua disponibilidade em ajudar e contribuir. Admiro sua competência e dedicação.

Agradeço às funcionárias e colegas Adriana, Simone, Fernanda Niemann pelo suporte, ajuda e disponibilidade. Especial agradecimento, à Irene e Ana Leda, pela ajuda na aquisição e análise dos resultados de citometria de fluxo, mas mais

do que isso, pelas inúmeras vezes que tiveram que lidar com a minha ansiedade, pelas conversas e conselhos.

Agradeço à Raquel e à Patrícia porque sempre podemos contar com seu apoio, resolvendo os problemas da forma mais rápida possível.

Agradeço à Deva e ao Arnaldo que cuidam da organização do nosso biotério e o fazem com muita dedicação.

Agradeço ao Gilberto Franchi Jr., do CIPOI-Unicamp, por disponibilizar o laboratório e ajudar nos transplantes de medula óssea.

Agradeço à equipe do IPEN-USP, onde realizamos as irradiações, especialmente o Sr. Carlos e à Beth pela atenção.

Por fim, agradeço a FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.



“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)



## RESUMO

Os eventos de migração e adesão das células progenitoras hematopoéticas são cruciais para a sua manutenção nos nichos da medula óssea e são regulados por diversos fatores, dentre eles as RhoGTPases. ARHGAP21 é uma proteína RhoGAP (*RhoGTPase activating protein*, que regulam negativamente as RhoGTPases), e atua na migração e adesão celulares. O papel da *Arhgap21* na hematopoese ainda é desconhecido. O objetivo geral do presente estudo foi estudar a função da *Arhgap21* na migração e adesão das células progenitoras hematopoéticas.

Neste trabalho, mostramos que ainda não foi possível a obtenção do camundongo nocaute para *Arhgap21*, pois parece que morrem antes do nascimento. O estudo foi realizado com os camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>*, cuja expressão gênica e protéica de *Arhgap21* está reduzida. As células progenitoras hematopoéticas *Arhgap21<sup>+/-</sup>* apresentaram menor quimiotaxia induzida por CXCL-12 e redução da adesão à fibronectina, o que provavelmente levou a um *homing* ineficiente para a medula óssea e para o baço. Observou-se também que o microambiente da medula óssea e do baço com redução de *Arhgap21* leva à ineficiência do *homing* das células progenitoras hematopoéticas normais. Não foi observada alteração na expressão gênica e na frequência de células expressando CXCR-4, bem como não houve diferença na secreção de CXCL-12. As células da medula óssea *Arhgap21<sup>+/-</sup>* apresentaram maior expressão de *Cdc42* e parecem possuir maior atividade desta RhoGTPase.

Pela primeira vez se descreve o papel da *Arhgap21* na hematopoese normal e ela parece ser um importante regulador da migração, adesão e *homing* das células progenitoras hematopoéticas, provavelmente pela regulação negativa de *Cdc42*, através da sua função GAP.





## ABSTRACT

Migration and adhesion of hematopoietic progenitor cells are crucial events for their maintenance on bone marrow niches. The role and mechanisms underlying hematopoietic progenitors migration and adhesion has been extensively studied and RhoGTPases have been implicated in these events. Regulators and effectors of RhoGTPases functions also have been studied in biology of hematopoietic progenitor cells. ARHGAP21 is a RhoGAP member, which function as negative regulators of RhoGTPases, and plays role in cell migration and adhesion. The aim of this study was to investigate the role of Arhgap21 in migration and adhesion of hematopoietic progenitor cells.

It was not possible to generate a knockout mouse until now, because they die before birth, as results indicate. Heterozygous mice (*Arhgap21<sup>+/-</sup>*) have reduction in Arhgap21 gene and protein expression and we used it as model. Hematopoietic Progenitor cells from *Arhgap21<sup>+/-</sup>* mice showed reduction in CXCL-12- induced chemotaxis as well as in fibronectin adhesion, which probably led to inefficient homing to wild-type bone marrow and spleen observed. In addition, homing of wild-type hematopoietic progenitor cells to *Arhgap21<sup>+/-</sup>* bone marrow and spleen was also reduced. It was not observed differences in CXCR-4 gene expression and frequency of progenitor hematopoietic cells expressing this receptor as well as in CXCL-12 secretion in *Arhgap21<sup>+/-</sup>* bone marrow or serum.

It is the first time that the role of Arhgap21 in hematopoiesis is described and it seems to be an important regulator of hematopoietic progenitor cell migration, adhesion and homing, probably due to Cdc42 negative regulation by its RhoGAP function.



## LISTA DE ABREVIÇÕES

AGM - Aorta-Gônada Mesonéfrons

BSA – Albumina de Soro Bovino

BP - Pares de Base

CAR – Células Reticulares abundantes em CXCL-12

CFSE - *Carboxyfluorescein succinimidyl Ester*

CFU – Unidades Formadoras de Colônias

CLP - Progenitor Linfóide Comum

CMP - Progenitor Mieloide Comum

CXCL-12 - *C-X-C motif chemokine 12*

CXCR-4 - *C-X-C chemokine receptor type 4*

DMEM – Meio Dulbecco modificação Eagle

DTT - Ditioneitol

E - Dia embrionário

ECL – do inglês, *Enhanced ChemiLuminescence*

ELISA – do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ES – Célula-Tronco Embrionária

FAK – Proteína de Adesão Focal

FL - Fígado Fetal

GAPs – do inglês, *GTPase-activating protein*

G-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos

GDIs – do inglês, *Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors*

GDP - Guanosina-difosfato

GEFs – do inglês, *Guanine Exchange Factors*

GFP – Proteína verde fluorescente

GM-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

GMP - Progenitor de Granulócitos e Monócitos

GTP – guanosina-trifosfato

HSC - Célula-tronco Hematopoética

IMDM – Meio Dulbecco modificação Iscove

LT-HSC – Células-tronco Hematopoética de longa duração

MEP - Progenitor Megacariocítico-Eritroide.

MMP – Metaloproteínas

MPP - Progenitor Multi-Potente.

OD – Densidade óptica

PAK – do inglês, *p-21 activated kinases*

PBS – Tampão Fosfato-salino

PCR – Reação de polimerase em cadeia

PDZ – PSD-95/Disc-large/ZO-1

PH – Homólogo à plequistrina

PKC $\zeta$  - Proteína quinase do tipo c sub-tipo zeta

PL – Placenta

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonila

RACE – do inglês, *Rapid amplification of cDNAs ends*

RAFTK – Tirosina quinase relacionada à adesão focal

RPM – Rotação por minuto

SCF – Fator de Célula-Tronco

SDF-1- Fator derivado de células estromal-1

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

ST-HSC – Células-Tronco Hematopoética de curta duração

TBS-T – Tampão Tris-salino adicionado de Tween- 20

UV – Vaso Umbilical

VCAM-1 – Proteína de Adesão Celular Vascular

VLA-4- do inglês, *Very Late Antigen-4*

VV - Vaso Vitelínico

WT – do inglês, *wild type*, referente aos camundongos selvagens

YS - Saco Vitelínico



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Sequência dos iniciadores usados para genotipagem dos camundongos <i>Arhgap21<sup>+/-</sup></i> .....	57
<b>Tabela 2:</b> Sequência dos iniciadores usados para genotipagem dos camundongos <i>Arhgap21<sup>+/-</sup></i> e <i>Arhgap21<sup>-/-</sup></i> por RT-PCR.....	58
<b>Tabela 3:</b> Sequência dos iniciadores usados no PCR em tempo Real.....	60
<b>Tabela 4:</b> Parâmetros Hematológicos dos camundongos WT e <i>Arhgap21<sup>+/-</sup></i> .....	79





## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Cascata hematopoética.....	33
<b>Figura 2:</b> Sítios anatômicos e linha do tempo do desenvolvimento hematopoético.....	34
<b>Figura 3:</b> O nicho das células-tronco e progenitoras hematopoéticas.....	36
<b>Figura 4:</b> Migração das células-tronco e progenitoras hematopoéticas: mobilização e <i>homing</i> .....	38
<b>Figura 5:</b> <i>Homing</i> das células-tronco e progenitoras hematopoéticas para a medula óssea.....	40
<b>Figura 6:</b> Via de sinalização CXCL-12/CXCR-4.....	41
<b>Figura 7:</b> Modelo do ciclo de ativação-inativação das RhoGTPases.....	43
<b>Figura 8:</b> Papel das RhoGTPases na biologia das células-tronco e progenitoras hematopoéticas.....	45
<b>Figura 9:</b> Esquema da sequência protéica da ARHGAP21.....	47
<b>Figura 10:</b> Esquema do vetor GeneTrap.....	56
<b>Figura 11:</b> Esquema do desenho dos iniciadores utilizados no RT-PCR para genotipagem de camundongos homozigotos nocautes.....	58
<b>Figura 12:</b> Esquema do desenho dos iniciadores utilizados na PCR em tempo real para genotipagem de camundongos homozigotos nocautes.....	59
<b>Figura 13:</b> Gel de Acrilamida mostrando a banda correspondente à construção PAK1 –GST utilizada nos ensaios de <i>pull down</i> .....	65

<b>Figura 14:</b> Análise da expressão gênica de <i>Arhgap21</i> no fígado fetal e medula óssea de camundongos selvagens C57/Bl6.....	71
<b>Figura 15:</b> PCR da genotipagem da prole gerada do cruzamento entre camundongos WT e <i>Arhgap21</i> <sup>+/-</sup> .....	73
<b>Figura 16:</b> Esquema representativo da localização do vetor no transcrito da <i>Arhgap21</i> gerado pelo 5' RACE realizado pelo consórcio GeneTrap.....	73
<b>Figura 17:</b> Esquema representativo da localização dos iniciadores na região de inserção do vetor para confirmação da sua localização.....	74
<b>Figura 18:</b> Confirmação da localização do vetor após o éxon 6 do transcrito da <i>Arhgap21</i> através da amplificação dos fragmentos esperados de 4kb e 259bp.....	75
<b>Figura 19:</b> RT-PCR da primeira prole obtida do cruzamento entre camundongos <i>Arhgap21</i> .....	76
<b>Figura 20:</b> RT-PCR de prole obtida entre camundongos <i>Arhgap21</i> <sup>+/-</sup> .....	77
<b>Figura 21:</b> Análise da expressão gênica e proteica de <i>Arhgap21</i> na medula óssea de animais selvagens e <i>Arhgap21</i> <sup>+/-</sup> .....	78
<b>Figura 22:</b> Células progenitoras hematopoéticas de camundongos <i>Arhgap21</i> <sup>+/-</sup> apresentam redução da quimiotaxia induzida por CXCL-12.....	80
<b>Figura 23:</b> Células Progenitoras Hematopoéticas dos camundongos <i>Arhgap21</i> <sup>+/-</sup> apresentam menor adesão à fibronectina.....	81
<b>Figura 24:</b> A população de células hematopoéticas progenitoras não comprometidas (Lin <sup>-</sup> ) não está alterada nos camundongos <i>Arhgap21</i> <sup>+/-</sup> .....	83
<b>Figura 25:</b> <i>Homing</i> das células progenitoras hematopoéticas com redução de <i>Arhgap21</i> é ineficaz.....	84

<b>Figura 26:</b> Análise da expressão gênica de CXCR-4 nas células da medula óssea de camundongos selvagens e <i>Arhgap21<sup>+/-</sup></i> .....	85
<b>Figura 27:</b> Análise da expressão de CXCR-4 nas células progenitoras hematopoéticas Lin <sup>-</sup> .....	86
<b>Figura 28:</b> Expressão de $\alpha 4\beta 1$ nas células progenitoras Lin <sup>-</sup> de camundongos <i>Arhgap21<sup>+/-</sup></i> está reduzida.....	87
<b>Figura 29:</b> O <i>Homing</i> das células progenitoras hematopoéticas normais para medula óssea e baço <i>Arhgap21<sup>+/-</sup></i> é ineficaz.....	88
<b>Figura 30:</b> Concentração de CXCL-12 na medula óssea e no soro dos camundongos <i>Arhgap21<sup>+/-</sup></i> não está alterada.....	89
<b>Figura 31:</b> Aumento da expressão proteica de Cdc42 na medula óssea de camundongos <i>Arhgap21<sup>+/-</sup></i> com ou sem estímulo de CXCL-12.....	90
<b>Figura 32:</b> Aumento da atividade de Cdc42 na medula óssea de camundongos <i>Arhgap21<sup>+/-</sup></i> com ou sem estímulo de CXCL-12.....	91



## **SUMÁRIO**

RESUMO.....	XV
ABSTRACT .....	XVII
LISTA DE ABREVIações .....	XIX
LISTA DE TABELAS.....	XXIII
LISTA DE FIGURAS.....	XXV
<b><u>Introdução.....</u></b>	<b><u>31</u></b>
HEMATOPOESE .....	33
MIGRAÇÃO, ADESÃO E <i>HOMING</i> DAS CÉLULAS-TRONCO E PROGENITORAS	
HEMATOPOÉTICAS .....	37
RHOGTPASES.....	42
ARHGAP21: UMA RHO GAP .....	46
<b><u>Objetivos.....</u></b>	<b><u>51</u></b>
OBJETIVO GERAL.....	53
<i>Objetivos Específicos</i> .....	53
<b><u>Metodologia .....</u></b>	<b><u>55</u></b>
GERAÇÃO DO ANIMAL HETEROZIGOTO PARA ARHGAP21 .....	56
GENOTIPAGEM DOS CAMUNDONGOS HETEROZIGOTOS ( <i>ARHGAP21<sup>+/-</sup></i> ) E HOMOZIGOTOS ( <i>ARHGAP21<sup>-/-</sup></i> ) .....	57
PCR EM TEMPO REAL.....	59
OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA.....	60
OBTENÇÃO DE FÍGADO FETAL .....	60
WESTERN BLOT.....	61
ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR .....	61
ADESÃO DAS CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOÉTICAS .....	62
ENSAIO DE <i>HOMING</i> .....	63
ANÁLISE DO RECEPTOR CXCR-4 INTEGRINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	63
PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES PARA O ENSAIO DE <i>PULL DOWN</i> .....	64
ENSAIOS DE <i>PULL DOWN</i> PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE RHO GTPASES .....	65
ANÁLISE DA SECREÇÃO DE CXCL-12 .....	66
ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	67
<b><u>Resultados.....</u></b>	<b><u>69</u></b>
EXPRESSÃO GÊNICA DA ARHGAP21 NO FÍGADO FETAL E MEDULA ÓSSEA .....	71

GERAÇÃO DO ANIMAL NOCAUTE PARA <i>ARHGAP21</i> .....	72
ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DE <i>ARHGAP21</i> NA MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS <i>ARHGAP21</i> <sup>+/-</sup> .....	78
REDUÇÃO DA QUIMIOTAXIA DAS CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOÉTICAS DE CAMUNDONGOS <i>ARHGAP21</i> <sup>+/-</sup> INDUZIDA POR CXCL-12.....	80
CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOÉTICAS DOS CAMUNDONGOS <i>ARHGAP21</i> <sup>+/-</sup> APRESENTAM MENOR ADESÃO À FIBRONECTINA .....	81
<i>HOMING</i> DAS CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOÉTICAS <i>ARHGAP21</i> <sup>+/-</sup> ESTÁ COMPROMETIDO.....	82
POPULAÇÃO DE CÉLULAS LIN <sup>-</sup> CXCR-4 <sup>+</sup> NÃO ESTÁ ALTERADA NA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS <i>ARHGAP21</i> <sup>+/-</sup> .....	84
EXPRESSÃO DA INTEGRINA $\alpha 4\beta 1$ ESTÁ REDUZIDA NOS PROGENITORES HEMATOPOÉTICOS LIN <sup>-</sup> .....	86
<i>HOMING</i> PARA A MEDULA ÓSSEA E PARA O BAÇO DOS CAMUNDONGOS <i>ARHGAP21</i> <sup>+/-</sup> TAMBÉM ESTÁ COMPROMETIDO .....	87
A SECREÇÃO DE CXCL-12 NA MEDULA ÓSSEA E NO SORO DOS CAMUNDONGOS <i>ARHGAP21</i> <sup>+/-</sup> NÃO ESTÁ ALTERADA .....	88
A EXPRESSÃO PROTÉICA E ATIVIDADE DE CDC42 NA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS <i>ARHGAP21</i> <sup>+/-</sup> PARECE AUMENTADA .....	89
<b><u>Discussão .....</u></b>	<b>93</b>
<b><u>Conclusão.....</u></b>	<b>101</b>
<b><u>Referências Bibliográficas .....</u></b>	<b>105</b>

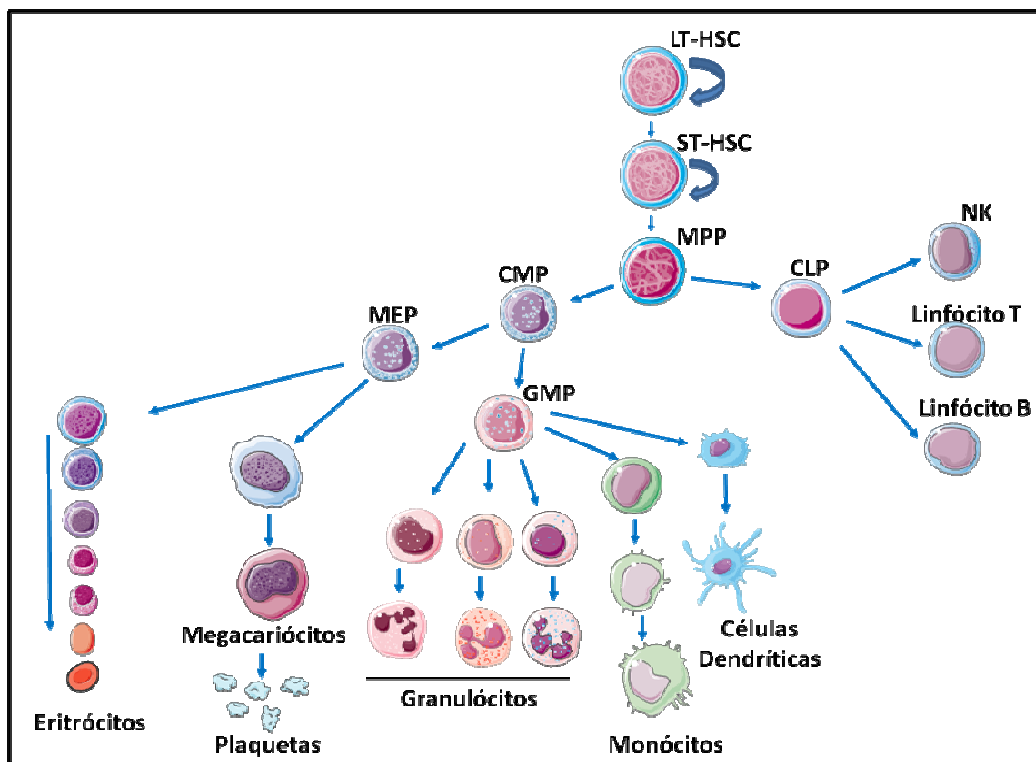
# **Introdução**





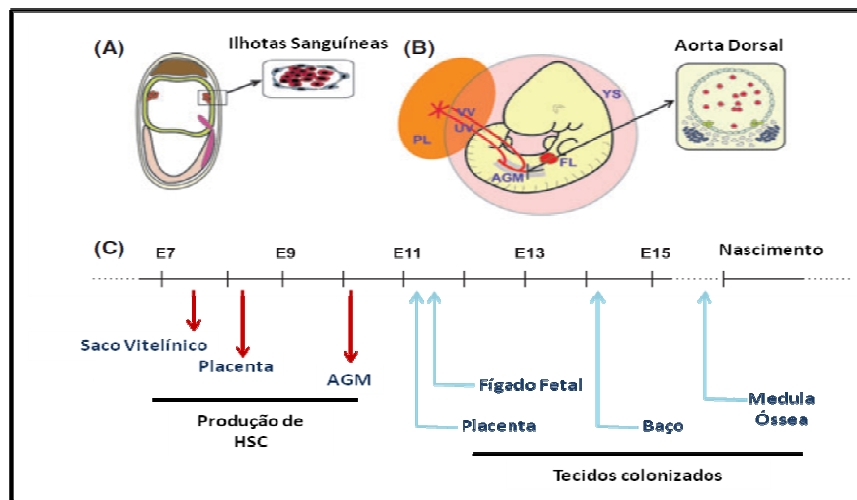
## Hematopoese

As células sanguíneas maduras são geradas por um processo complexo e hierarquizado que se inicia com uma célula-tronco hematopoética, chamado hematopoese. As células-tronco hematopoéticas são capazes de se autorrenovar, garantindo a manutenção do grupo de células-tronco, e de se diferenciar em progenitores multipotentes, os quais geram progenitores cada vez mais comprometidos, dos quais então os diferentes tipos celulares existentes no sangue se originam (Figura 1) [1].



**Figura 1: Cascata hematopoética.** Ilustração simplificada do processo hematopoético no qual células-tronco hematopoéticas (HSC) se diferenciam progressivamente em progenitores mais comprometidos até originarem todos os tipos de células sanguíneas maduras. **LT-HSC**= células-tronco hematopoéticas de longa duração; seta indica autorrenovação. **ST-HSC**= células-tronco de curta duração cuja capacidade de autorrenovação é menor a das células LT-HSC. **MPP**= Progenitor Multipotente. **CMP**= Progenitor Mieloide Comum. **CLP**= Progenitor Linfóide Comum. **MEP**= Progenitor Megacariocítico-Eritroide. **GMP**= Progenitor de Granulócitos e Monócitos. *Figura montada com auxílio da ferramenta <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>*

As primeiras Células-Tronco Hematopoéticas surgem ainda durante a vida embrionária, num sítio extraembrionário, o saco vitelínico. Mas estas ainda não são as células-tronco hematopoéticas definitivas, ou seja, não são capazes de restaurar a hematopoese quando transplantadas em um animal adulto [1]. Na região conhecida como Aorta-Gônada-Mesonéfrons e na placenta é que as primeiras células com propriedades funcionais de células-tronco adultas são encontradas [1, 2]. Após o surgimento na AGM, as células-tronco migram para o fígado fetal que é o principal sítio de expansão destas células. Encontram-se células-tronco hematopoéticas também no baço do embrião. Apenas próximo ao nascimento, as células-tronco expandidas no fígado fetal colonizam a medula óssea, que se torna o principal sítio hematopoético durante a vida adulta (Figura 2) [1, 3-5].



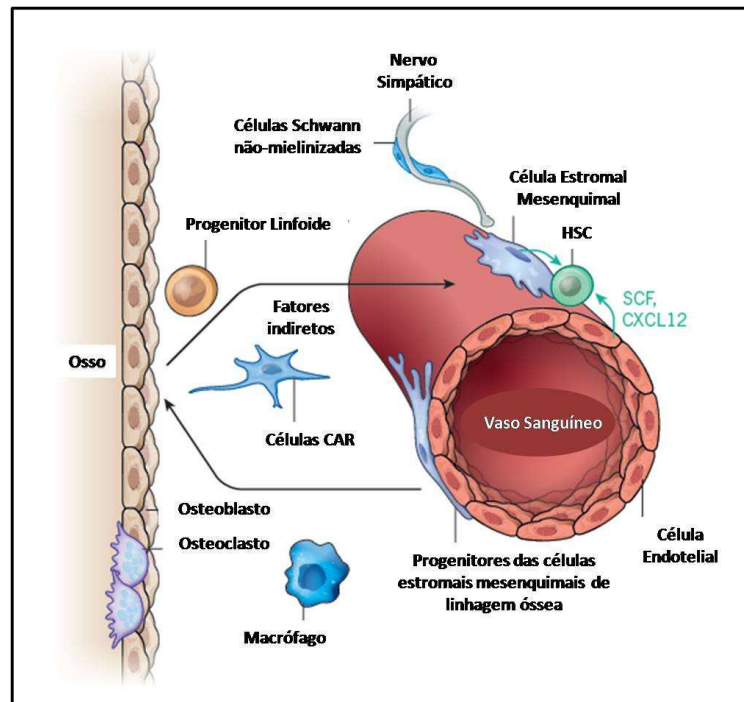
**Figura 2: Sítios anatômicos e linha do tempo do desenvolvimento hematopoético.** A figura mostra as localizações anatômicas onde surgem as primeiras células-tronco e progenitoras hematopoéticas e os tecidos para onde essas células migram. (A) Esquema de um embrião no 7º dia do desenvolvimento quando a eritropoese primitiva inicia na região extra-embriônica próximo às ilhotas sanguíneas. (B) Esquema do embrião no 11º dia do desenvolvimento quando há intensa produção de células-tronco hematopoéticas na região AGM (aorta-gônada-mesonéfrons). (C) Linha do tempo de geração das células-tronco hematopoéticas e os tecidos colonizados por estas. **PL:** Placenta. **UV:** vaso umbilical; **VV:** vaso vitelínico. **AGM:** Aorta-Gônada Mesonéfrons. **FL:** Fígado Fetal.

**YS:** Saco Vitelínico. **E:** Dia embrionário. **HSC:** Célula-Tronco Hematopoética. *Figura adaptada de [4].*

A medula óssea é um órgão complexo onde são encontrados, além das células hematopoéticas, diversos tipos de células não hematopoéticas (células mesenquimais estromais, adipócitos, células perivasculares, células reticulares, entre outras) e diferentes moléculas (solúveis e presentes na matriz extracelular), que estão no interior da cavidade óssea, região bastante vascularizada e innervada [6]. Dessa forma, a medula óssea oferece às células-tronco e progenitoras hematopoéticas um ambiente propício para a sua manutenção e função.

As células-tronco e progenitoras hematopoéticas ocupam microambientes específicos na medula óssea, conhecidos como nichos (Figura 3). Dois tipos de nichos são ocupados pelas células-tronco e progenitoras hematopoéticas: o nicho vascular, quando se encontram próximas aos vasos sanguíneos da medula óssea; e o nicho endosteal, quando estão mais próximas ao osso. Acreditava-se que cada um destes nichos exercesse uma função específica: enquanto o nicho endosteal mantinha a célula em quiescência, o nicho vascular era responsável por sua proliferação e diferenciação [1, 7]. No entanto, estudos recentes estão modificando este conceito, mostrando que frequentemente as células-tronco hematopoéticas são encontradas mais próximas aos sinusoides e arteríolas, onde as células perivasculares e mesenquimais estromais regulam sua manutenção através da secreção de diversos fatores, principalmente CXCL-12 e SCF (do inglês, *Stem Cell Factor*) [6, 8-10]. A atuação do nicho endosteal, por outro lado, parece ser indireta, pois as células ósseas secretam fatores (como citocinas e proteínas da matriz extracelular) que ajudam à formação e manutenção do nicho, influenciando as outras células estromais as quais agem diretamente nas células-tronco hematopoéticas [6, 11, 12]. Assim como estas, as outras células hematopoéticas também ocupam nichos específicos na medula óssea, como por exemplo, os progenitores linfóides que são encontrados bem próximos aos osteoblastos os quais parecem ser essenciais para sua manutenção e

diferenciação adequadas [13]. Portanto, o que se sabe é que a interação das células-tronco e progenitoras hematopoéticas com as proteínas solúveis e da matriz extracelular bem como com outras células dos nichos da medula óssea, seja de maneira direta ou indireta, regula os diversos eventos biológicos necessários à sua função e manutenção adequadas, tais como quiescência, proliferação, adesão e migração [6, 14-16].



**Figura 3: O nicho das células-tronco e progenitoras hematopoéticas.** As células-tronco hematopoéticas são principalmente encontradas na região adjacente aos vasos sanguíneos da medula óssea, onde sua manutenção é regulada principalmente por células endoteliais e mesenquimais estromais através da secreção de fatores, como por exemplo, SCF (do inglês, *Stem Cell Factor*) e CXCL-12. As fibras do sistema nervoso simpático regulam a secreção de CXCL-12 e a retenção das células-tronco hematopoéticas seguindo o ritmo circadiano. As células Schwann não-mielinizadas produzem fatores que também regulam o nicho. Outras células importantes para a regulação do nicho hematopoético são os macrófagos, osteoclastos e as células CAR (células reticulares abundantes em CXCL-12). Os osteoblastos não atuam diretamente na célula-tronco hematopoética como se acreditava; eles secretam fatores importantes para a manutenção do nicho e diferenciação de progenitores linfóides que residem no nicho endosteal. A matriz extracelular e o cálcio também atuam na manutenção das células-tronco hematopoéticas. *Figura adaptada de [6].*

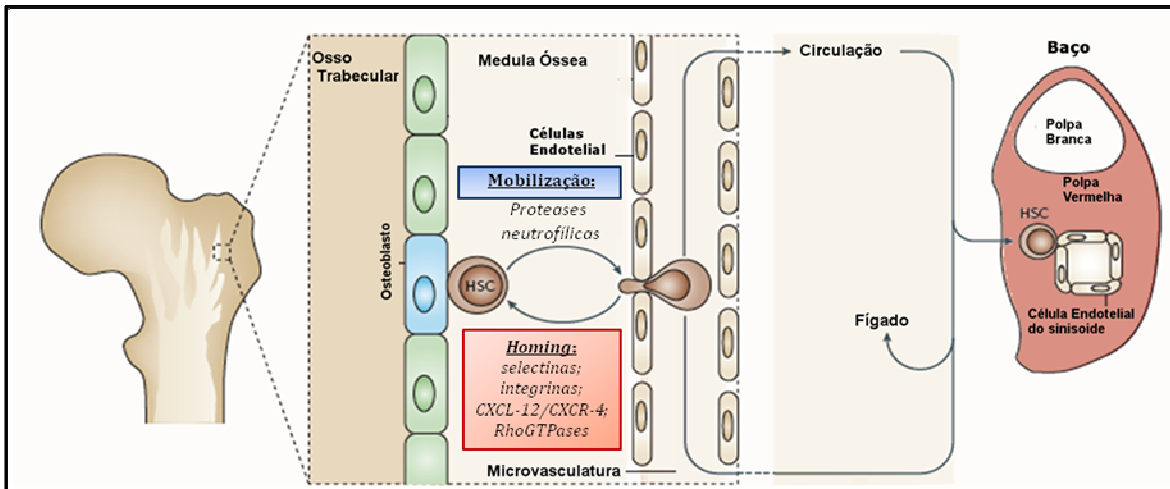
## **Migração, Adesão e *Homing* das células-tronco e progenitoras hematopoéticas**

As células-tronco e progenitoras hematopoéticas não ficam paradas na medula óssea; elas são capazes de sair para a corrente sanguínea, atingindo órgãos periféricos (por exemplo, o baço) além de , e de voltar realocando-se nos nichos da medula óssea, processos estes conhecidos como mobilização e *homing*, respectivamente (Figura 4) [14, 17]. Acredita-se que a migração das células-tronco e progenitoras hematopoéticas tenha um papel central na manutenção da homeostase do processo hematopoético, mas ainda não se sabe as razões específicas.

O tráfego das células-tronco e progenitoras hematopoéticas envolve os eventos de migração, quimiotaxia induzida por fatores presentes na medula óssea, e adesão às outras células e à matriz extracelular da medula óssea. A maioria dos mecanismos moleculares que regulam a mobilização e o *homing* se sobrepõe, como por exemplo, a via de sinalização CXCL-12/CXCR-4 e algumas integrinas [14, 18-22].

Baseando-se nas observações de que a saída fisiológica das células-tronco hematopoéticas segue o ritmo circadiano, sugere-se que sua função possa ser atribuída à renovação do nicho hematopoético mediada pelo sistema nervoso central, atuando nas células que compõem o nicho [23], e/ou a um mecanismo de vigilância imunológica em que estas células mobilizadas para a circulação e periferia seriam uma fonte de células do sistema imune [24]. A mobilização das células-tronco e progenitoras hematopoéticas pode ser estimulada por condições de estresse (infecções, ou outras doenças) e pela utilização de diferentes moléculas, como o GM-CSF, G-CSF e AMD3100 (antagonista do receptor CXCR-4), aplicadas comumente na clínica, por exemplo, para enriquecimento de progenitores hematopoéticos na circulação sanguínea antes de um transplante de medula óssea. A mobilização induzida por estes agentes envolve a secreção de proteases neutrofílicas, que levam à degradação dos sinais de retenção e das

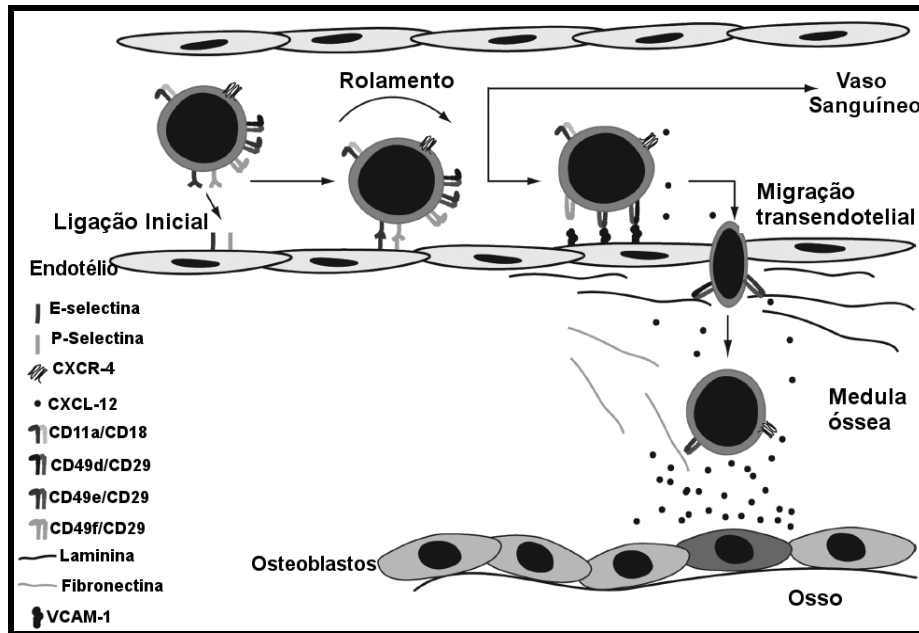
ligações de adesão das células progenitoras hematopoéticas à medula óssea, como as promovidas por CXCL-12, VCAM-1, integrinas e SCF [7].



**Figura 4: Migração das células-tronco e progenitoras hematopoéticas: mobilização e homing.** Este esquema ilustra de maneira simplificada os processos de mobilização e *homing* das células-tronco e progenitoras hematopoéticas. A mobilização é o processo de saída destas células da medula óssea para a circulação sanguínea, de onde saem para os órgãos periféricos, como o baço e o fígado. Um dos fatores que induz a ruptura da ligação das células ao seu nicho para a mobilização é a secreção de proteases neutrofílicas. O *homing* é o processo pelo qual as células-tronco e progenitoras hematopoéticas retornam para a medula óssea, vindas dos órgãos periféricos pela circulação sanguínea, num processo similar à diapedese de leucócitos. Muitos fatores participam dessa chegada aos nichos da medula óssea, dentre eles a via CXCL-12/CXCR-4, P- e E- selectinas, integrinas (principalmente  $\alpha 4\beta 1$  e  $\alpha 5\beta 1$ ), e as proteínas da família RhoGTPases. *Figura adaptada de [7].*

O *homing* é o processo pelo qual as células-tronco e progenitoras hematopoéticas presentes na circulação sanguínea cruzam a barreira endotelial e se alojam na medula óssea (Figura 5). Este é o primeiro passo para a renovação e restauração do sistema hematopoético, que ainda inclui o alojamento, a proliferação e diferenciação das células-tronco e progenitoras hematopoéticas. As etapas que envolvem o *homing* lembram a diapedese de leucócitos. A primeira etapa é a ligação fraca da célula ao endotélio seguida pelo rolamento pela camada

de células endoteliais, mediada principalmente por selectinas. A segunda etapa consiste numa adesão mais forte às células endoteliais, que é mediada pela ativação de integrinas em resposta ao estímulo da via CXCL-12/CXCR-4. Em seguida, as células-tronco e progenitoras hematopoéticas realizam a migração trans-endotelial, passando pela camada endotelial e pela lâmina basal (fibronectina, colágeno e laminina) em resposta ao estímulo de CXCL-12 na medula. E, por fim, as células migram em direção ao gradiente de CXCL-12 aonde vão se ancorar e estabelecer [15, 18, 25, 26]. Dessa maneira, o *homing* das células progenitoras hematopoéticas envolve principalmente a migração direcional e a adesão celular aos nichos da medula óssea



**Figura 5: Homing das células-tronco e progenitoras hematopoéticas para a medula óssea.** Este diagrama ilustra o processo de *homing* das células-tronco e progenitoras hematopoéticas para a medula óssea, cujas etapas são similares à diapedese de leucócitos. As primeiras etapas são a ligação inicial ao endotélio e o rolamento, processos estes mediados por E- e P-selectinas. A terceira etapa é caracterizada por ligação firme ao endotélio, mediada por integrinas que são ativadas por CXCL-12/CXCR-4. A seguir, as células realizam a migração através da camada endotelial e da lâmina basal, que consiste de fibronectina, colágeno e laminina. Nesta etapa participam as integrinas CD49d/CD29 ( $\alpha 4\beta 1$ ), CD49e/CD29

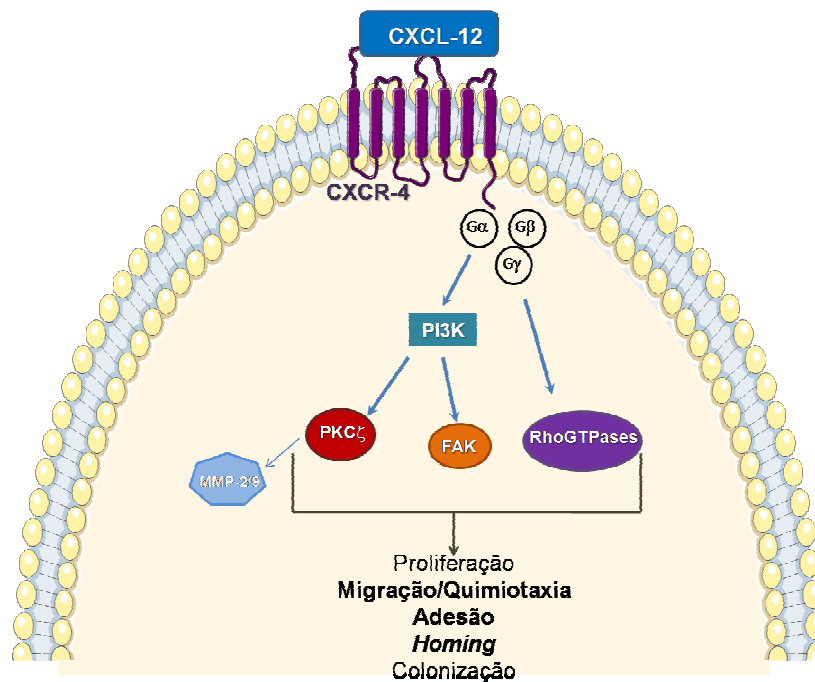
( $\alpha 5\beta 1$ ) e CD49f/CD29 ( $\alpha 6\beta 1$ ). Por fim, as células-tronco e progenitoras migram em direção ao gradiente de CXCL-12. *Figura adaptada de [15].*

Diversos fatores têm sido descritos como indutores da quimiotaxia (migração direcional) das células-tronco e progenitoras hematopoéticas para a medula óssea, mas o principal e mais estudado é a quimiocina SDF-1 (do inglês, *Stromal Cell- Derived Factor 1*), atualmente conhecida como CXCL-12. Esta quimiocina é secretada por células estromais da medula óssea, principalmente células perivasculares mesenquimais (células CAR, células Nestina<sup>+</sup>), células endoteliais e osteoblastos [13, 27, 28]. Sua secreção é regulada pelas fibras nervosas presentes na medula óssea, seguindo o ritmo circadiano e parece ser dependente do contato célula-célula [23, 29]. O CXCL-12 se liga ao seu principal receptor CXCR-4 que está presente na membrana da maioria das células hematopoéticas, desde as células maduras até as células-tronco e progenitoras hematopoéticas. Animais nocautes tanto para o ligante quanto para o receptor apresentam defeitos letais ainda durante a vida embrionária, que incluem a incapacidade das células-tronco e progenitoras hematopoéticas de colonizar a medula óssea, e comprometimento da linfopoese B e da mielopoese [26]. Além disso, os níveis aumentados de CXCL-12 no plasma sanguíneo levam à mobilização das células-tronco e progenitoras hematopoéticas para a circulação sanguínea [30, 31].

A via de sinalização CXCL-12/CXCR-4 tem sido extensivamente estudada e já são conhecidos vários mediadores e efetores desta via que agem na migração e adesão dos progenitores hematopoéticos (Figura 6). Após a ligação do CXCL-12 ao CXCR-4, este se associa à endolina (CD164) e às integrinas VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ ) e VLA-5 ( $\alpha 5\beta 1$ ) na região frontal da células. A indução da atividade destas integrinas pelo CXCL-12 estimula a adesão das células progenitoras hematopoéticas à matriz extracelular da medula óssea e a migração direcional [32, 33]. A proteína PI3K também é ativada por esta via, sendo um mediador da sinalização, levando à



ativação de PKC $\zeta$  que induz a fosforilação de FAK, Pyk-2, RAFTK, p130Cas e paxilina [15, 34-36]. Outro grupo de importantes proteínas para a migração e a adesão celular que é estimulado pela ligação CXCL-12/CXCR-4, são as GTPases pertencentes à super-família Ras, como Rho, Rac e Cdc42 [37-46]. Sendo assim, a via de sinalização CXCL-12/CXCR-4 desencadeia uma cascata de sinalização que deflagra diversos eventos celulares, dentre os quais: sinalização para polarização celular, adesão mediada por integrinas, remodelamento do citoesqueleto e migração celular.



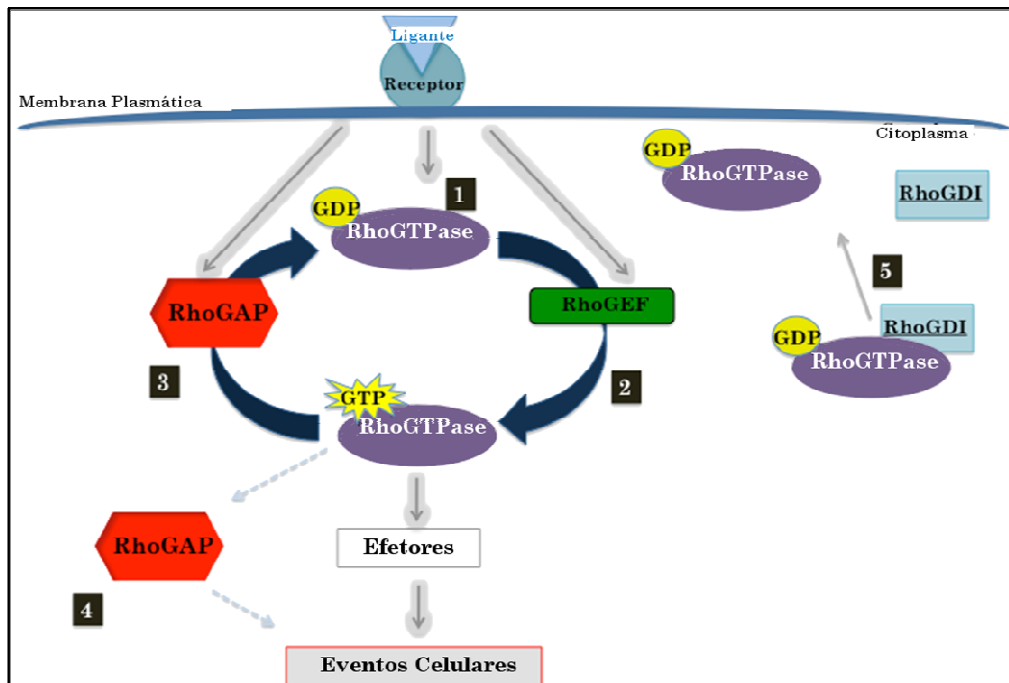
**Figura 6: Via de sinalização CXCL-12/CXCR-4.** CXCL-12 é uma quimiocina produzida por células estromais da medula óssea, principalmente células reticulares (células CA, endoteliais e osteoblastos. A ligação de CXCL-12 ao seu receptor CXCR-4, presente na maioria das células hematopoéticas, inclusive nas células-tronco e progenitoras hematopoéticas, ativa diversas proteínas, dentre as quais PI3K, que leva a ativação de PKC $\zeta$  e FAK, com consequente secreção de MMP-2 e 9, e RhoGTPases. A ativação desta via de sinalização deflagra eventos biológicos, tais como proliferação celular, migração, adesão, *homing* e colonização das células-tronco e progenitoras hematopoéticas na medula óssea. *Figura montada com o auxílio da ferramenta <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>*

## RhoGTPases

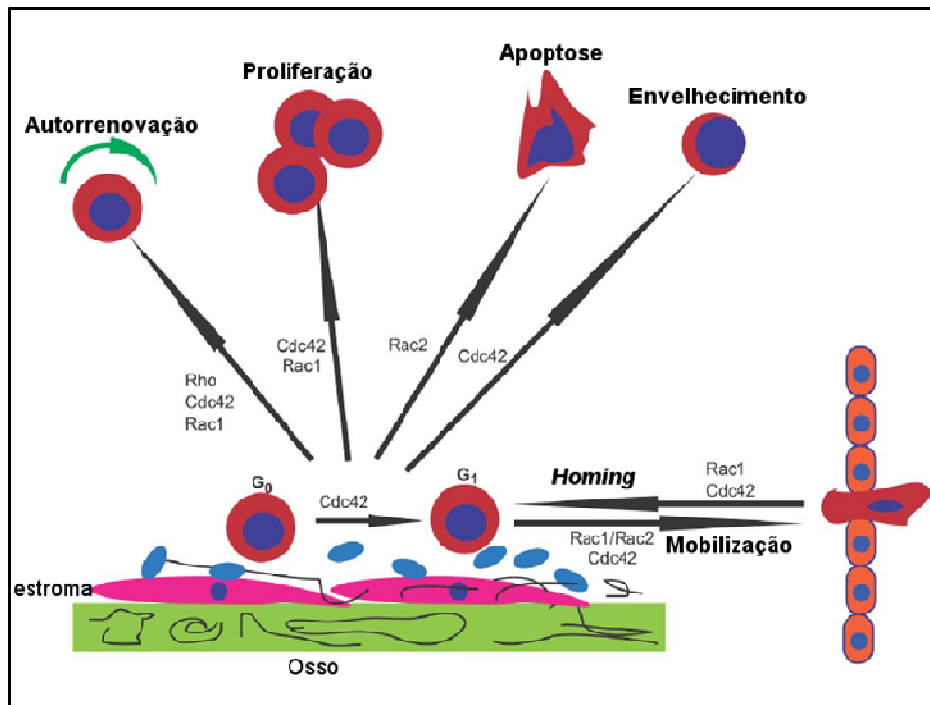
As RhoGTPases são uma família de proteínas que participam de diversos eventos celulares tais como rearranjo do citoesqueleto, dinâmica de microtúbulos, migração, adesão e polarização celular [47, 48]. Estas proteínas ciclam entre as formas ativas, quando estão ligadas a GTP, e inativas, quando ligadas a GDP (Figura 7). O ciclo de ativação-inativação das RhoGTPases é controlado por diferentes fatores: os GEFs (do inglês, *Guanine Exchange Factors*) catalisam a troca de GDP para GTP, ativando as RhoGTPases que se ligam às proteínas efetoras, iniciando uma cascata de sinalização, a qual deflagra os diversos processos celulares dos quais as RhoGTPases participam; por outro lado, as GAPs (do inglês, *GTPase-activating protein*) promovem a hidrólise do GTP a GDP levando à sua inativação. Além dos GEFs e GAPs, o ciclo de ativação-inativação das RhoGTPases é regulado pelos GDIs (do inglês, *Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors*) que seqüestram as formas Rho-GDP (inativas), tentando inibir a ativação aberrante das RhoGTPases [47, 49, 50]. O balanço da ação de GEFs e GAPs é crucial para o adequado funcionamento das RhoGTPases e controle da sua atividade e localização. Os membros da sub-família Rho compartilham proteínas efetoras e podem ser regulados pelos mesmos GEFs e GAPs. A especificidade da sinalização das RhoGTPases é determinada pela localização subcelular bem como pela expressão célula-específica delas próprias e de seus reguladores [47, 50].

As RhoGTPases em sua maioria são expressas ubiquamente, mas duas delas possuem expressão tecido-específica. Rac 2 e RhoH parecem ter expressão restrita às células hematopoéticas [51]. No entanto, não são apenas estas que desempenham funções importantes na hematopoese, diversas RhoGTPases estão implicadas no desenvolvimento e função das células hematopoéticas. Já foi descrito o papel destas proteínas na mielopoese e eritropoese, bem como no desenvolvimento e ativação de linfócitos T e B, e nos processos de fagocitose e

migração de neutrófilos [48, 52]. Além disso, o aumento ou a diminuição da sua atividade está relacionado a diferentes doenças hematológicas [52].



**Figura 7: Modelo do ciclo de ativação-inativação das RhoGTPases.** Sinais extracelulares quando ligados a seus receptores são capazes de deflagrar o ciclo de ativação-inativação das RhoGTPases no interior da célula. As RhoGTPases ligadas a GDP se encontram inativas (1). Os RhoGEFs (do inglês, *guanine nucleotide exchange factors*) são responsáveis pela ativação das RhoGTPases (2). As RhoGTPases ativadas são capazes de interagir com outras proteínas efetoras, levando a diversas respostas biológicas nas células. Por outro lado, as RhoGAPs (do inglês, *GTPase-activating proteins*) são reguladores negativos da ativação das RhoGTPases [53]. As RhoGAPs também podem deflagrar eventos biológicos além da sua função GAP, através da interação com outras proteínas. Além disso, existe os GDIs (do inglês, *guanine nucleotide dissociation inhibitors*) que sequestram as formas ligadas a GDP no citoplasma, evitando a ativação aberrante das RhoGTPases.



**Figura 8: Papel das RhoGTPases na biologia das células-tronco e progenitoras hematopoéticas.** Os sinais para autorrenovação são mediados por Rho, Cdc42 e Rac1. Por um lado Rac1 controla a proliferação celular, de outro Rac2 controla a sobrevivência. Cdc42 é necessária para a entrada das células no ciclo celular. Rac1 e Cdc42 controlam o *homing* e a interação com o nicho hematopoético. A combinação das atividades de Rac1, Rac2 e Cdc42 são importantes para a retenção das células-tronco e progenitoras na medula óssea. *Figura adaptada de [48].*

As funções celulares que envolvem a mobilização, o *homing* e a colonização dessas células, tais como rearranjo do citoesqueleto, migração, ativação transcricional, sobrevivência e progressão do ciclo celular são regulados por RhoGTPases, particularmente Rac1, Rac2, RhoA e Cdc42 [48, 49] (Figura 8).

As proteínas Rac desempenham importantes papéis nas células-tronco e progenitoras hematopoéticas. A quimiotaxia induzida por CXCL-12 é mediada tanto por Rac-1 como Rac-2 [54]. A deficiência de Rac-1 leva a um menor *homing*. Por outro lado, Rac-2 parece ser importante para a retenção das células progenitoras hematopoéticas na medula óssea já que as células do animal

nocaute apresentam maior migração e estão em maior número na circulação sanguínea. Rac-2 parece afetar a atividade de outras RhoGTPases, particularmente Rac-1 e de Cdc42, e esta interferência está relacionada à migração das células-tronco e progenitoras hematopoéticas [38, 45, 55]. A deleção concomitante de Rac-1 e Rac-2 leva à redução da adesão com conseqüente mobilização das células-tronco e progenitoras hematopoéticas da medula óssea para a circulação sanguínea [38, 56]. Além da migração e da adesão, a deficiência de Rac-1 leva à proliferação ineficiente das células progenitoras hematopoéticas enquanto a de Rac-2 a um fenótipo apoptótico; e a deleção conjunta causa uma combinação de redução da proliferação e aumento de apoptose [56].

Em relação à RhoA, sabe-se que a sua inibição através do modelo do animal nocaute condicional levou à redução da migração induzida por CXCL-12 das células progenitoras hematopoéticas e ao aumento da adesão de células progenitoras Lin- (progenitores ainda não comprometidos com linhagem hematopoética específica) à fibronectina. As células progenitoras RhoA-nocautes mostraram bloqueio na citocinese associado à necrose programada, mecanismo importante para a sua homeostase [57]. Por outro lado, utilizando mutantes dominantes negativos para inibição desta proteína, foi demonstrado um aumento significativo na colonização *in vivo* das células-tronco e progenitoras hematopoéticas [40]. Resultados obtidos com camundongos nocautes para p190-B GAP, que apresentam especificamente atividade de RhoA aumentada, mostram que as células-tronco e progenitoras hematopoéticas obtidas do fígado fetal têm maior capacidade de autorrenovação, independente do controle do ciclo celular. Além disso, observa-se aumento da quimiotaxia induzida por CXCL-12 e adesão à fibronectina [44, 58].

Outra RhoGTPase que desempenha importantes funções nas células-tronco e progenitoras hematopoéticas é a Cdc42. O camundongo nocaute condicional para esta proteína mostrou aumento no número de células-tronco e progenitoras hematopoéticas na circulação sanguínea e na periferia, como

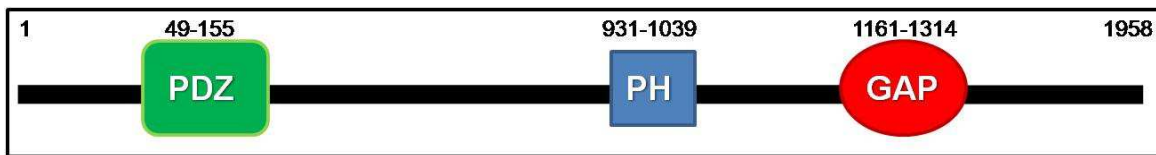
consequência de defeitos na adesão, *homing*, alojamento e retenção dessas células na medula óssea. As células-tronco hematopoéticas destes animais entraram em ciclo celular, resultando em maior frequência destas na medula óssea [46]. A Cdc42 parece atuar principalmente no envelhecimento das células-tronco e progenitoras hematopoéticas. Quando envelhecidas as células-tronco hematopoéticas apresentam maior atividade de Cdc42 e menor capacidade de adesão aos nichos da medula óssea comparadas às células jovens [59, 60]. Além disso, no que diz respeito à hematopoese, os camundongos nocautes para Cdc42 apresentam fenótipo similar aos camundongos velhos, sugerindo que a Cdc42 possa ser um importante regulador do mecanismo de envelhecimento das células-tronco hematopoéticas. Outro modelo que mostra o papel de Cdc42 na biologia das células-tronco hematopoéticas é o modelo nocaute para Cdc42GAP cuja atividade de Cdc42 está aumentada. As células-tronco e progenitoras destes animais mostram estrutura desorganizada de F-actina, redução da migração direcional e adesão e colonização defeituosa [61]. Estes resultados mostram que a regulação da atividade de Cdc42 deve estar estritamente regulada, visto que tanto a sua ativação quanto inibição resulta em migração e adesão ineficazes.

A regulação da RhoGTPases parece ser apenas um dos muitos papéis que as RhoGAPs desempenham. Geralmente estas proteínas são grandes, possuindo outros domínios funcionais além do próprio domínio GAP, o que parece permitir a integração de sinais oriundos de diferentes vias de sinalização [62]. Assim, seu domínio GAP pode atuar apenas como um sítio de reconhecimento, e as RhoGAPs podem atuar como proteínas efetoras ou mediadoras da interação entre as RhoGTPases com outras vias de sinalização. [63].

### **ARHGAP21: uma RhoGAP**

ARGHAP21 foi descrita pelo nosso grupo em 2002 e pertence à família de proteínas RhoGAP (do inglês, *RhoGTPase activating proteins*), cujo principal papel é regular negativamente as RhoGTPases.

O gene humano da ARHGAP21 foi identificado no cromossomo 10 e possui 26 éxons. Seu transcrito possui cerca de 7185 pares de base e a proteína codificada possui 1958 aminoácidos, com tamanho de 217kDa, e três domínios principais: PDZ (*PSD-95/Discs-large/ZO-1*), PH (do inglês, *Pleckstrin Homology*) e RhoGAP. Os domínios PDZ estão envolvidos na interação proteína-proteína, enquanto os domínios PH estão envolvidos na interação de proteínas com fosfolipídeos de membrana e com a actina [64, 65]. O domínio RhoGAP é responsável pela função GAP da ARHGAP21 [66].



**Figura 9: Esquema da sequência proteica da ARHGAP21.** A ARHGAP21 possui três domínios: PDZ (*PSD-95/Discs-large/ZO-1*), PH (do inglês, *Pleckstrin Homology*) e RhoGAP. Os domínios PDZ estão envolvidos na interação proteína-proteína, enquanto os domínios PH estão envolvidos na interação de proteínas com fosfolipídeos de membrana e com a actina. O domínio RhoGAP é responsável pela função GAP da ARHGAP21.

Em tecidos humanos, foi observada alta expressão gênica em cérebro, coração, músculo esquelético e placenta [66]. Através de RT-PCR foi verificado que sua expressão gênica aumenta durante a diferenciação celular observada em células HL-60 induzidas com ATRA (ácido trans-retinoico) para diferenciação mielóide e em células-tronco hematopoéticas induzidas com eritropoetina para diferenciação eritroide [66], bem como na diferenciação megacariocítica (dados não publicados). Também foi encontrada elevada expressão em carcinomas escamosos de cabeça e pescoço comparados ao tecido normal [67].

O gene da ARHGAP21 é bem conservado. Em camundongos, localiza-se no cromossomo 2, possui 27 éxons, apresenta cerca de 86% de homologia ao humano e codifica uma proteína de cerca de 1955 aminoácidos, com aproximadamente 217 Kda.

A atividade RhoGAP desta proteína já foi demonstrada para Cdc42 [68-72], RhoA [69, 70, 73, 74] e RhoC [74]. Além disso, ela interage com outras proteínas. Em células epiteliais mostrou-se que a ARHGAP21 interage com  $\alpha$ -catenina regulando as junções célula-célula e é recrutada para os sítios de entrada de *L. monocytogenes* [70]. ARHGAP21 é recrutada para o complexo de Golgi através da ligação com ARF1- GTP, onde regula o complexo Arp2/3 e a dinâmica de F-actina através de sua atividade sobre Cdc42 [69].

Estudos realizados pelo nosso grupo mostraram que ARHGAP21 interage com PKC $\zeta$  e FAK, tanto nas formas totais quanto ativas, em ratos normais ou hipertensos [75]. Em células de glioblastoma humano, a deleção de ARHGAP21 levou a mudanças morfológicas, com desarranjo da distribuição dos filamentos de actina, aumento da migração, maior atividade de Cdc42, ativação da via de sinalização FAK/p130<sup>CAS</sup> e aumento da secreção de metaloproteinase-2 (MMP-2) [68].

Além disso, ARHGAP21 interage com  $\beta$ -Arrestina-1, formando um complexo que é estimulado por angiotensina e modula a atividade de RhoA. Quando o complexo  $\beta$ -Arrestina-1/ARHGAP21 é desfeito, causa maior atividade da ARHGAP21 e atenuação da formação das fibras de estresse [73].

Nosso grupo mais uma vez mostrou novas interações e funções biológicas da ARHGAP21. Foi demonstrado que a ARHGAP21 possui uma forma de 250kDa, gerada pela sua sumoilação, mediada por SUMO2/3. Ao contrário da sua localização normal nuclear e/ou perinuclear, a forma sumoilada encontra-se mais comumente no citoplasma e pode estar relacionada à proliferação celular [76]. Em células PC3 (linhagem de câncer de próstata), mostrou-se que a depleção de ARHGAP21 levou à redução na proliferação e ao aumento da migração celular, além de mudanças morfológicas, mediados pelo aumento da atividade de RhoA e RhoC [74]. Em outro trabalho, observou-se que a ARHGAP21 se co-localizava com a actina na junção célula-célula no início da formação desta e interagia com Cdc42. Além disso, a sua inibição levou a uma adesão célula-célula mais fraca e



aumento da migração celular. Por fim, demonstrou-se que ARHGAP21 interagia também com  $\alpha$ -tubulina e era necessária para sua acetilação [77].

Diante dessas informações, a ARHGAP21 parece desempenhar um importante papel na migração e adesão celular, seja por sua atividade RhoGAP ou através da interação com outras proteínas, como FAK , PKC $\zeta$  e  $\alpha$ -tubulina. Além disso, as RhoTPases cuja atividade é regulada pela ARHGAP21 [78] bem como as proteínas que interagem com esta RhoGAP, particularmente PKC $\zeta$ , são essenciais para a migração e adesão das células progenitoras hematopoéticas. Por outro lado, o papel da Arhgap21 na hematopoese ainda é desconhecido. Portanto, a pergunta deste trabalho foi se a Arhgap21 estaria envolvida na migração e adesão de células progenitoras hematopoéticas. Para responder a esta questão, foi utilizado o modelo murino com inibição de Arhgap21.



# **Objetivos**



## **Objetivo Geral**

Investigar o papel da Arhgap21 na migração e adesão de Células Progenitoras Hematopoéticas, usando como modelo camundongos nocaute para Arhgap21.

### **Objetivos Específicos**

- Geração do camundongo nocaute para o gene da Arhgap21.
- Avaliar a quimiotaxia induzida por CXCL-12 das células progenitoras hematopoéticas com redução de Arhgap21.
- Avaliar os efeitos da redução Arhgap21 na adesão de células progenitoras hematopoéticas.
- Avaliar as possíveis vias de sinalização e moléculas reguladoras envolvidas na migração e adesão de células hematopoéticas inibidas, tais como SDF-1, CXCR-4 e ativação de RhoGTPases, como Cdc42.



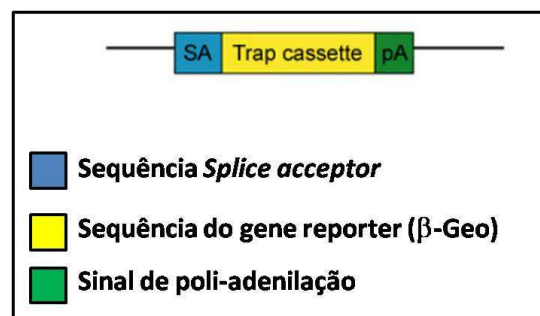
# *Metodologia*

## Geração do animal heterozigoto para Arhgap21

Células-tronco embrionárias (ES) com inibição do transcrito da Arhgap21 foram obtidas do consórcio GeneTrap (<http://www.genetrap.org>) e injetadas em blastocisto de camundongos C57/Bl6 realizada no CEDEME-UNIFESP, sob supervisão do professor João Pesquero. A linhagem C57/Bl6 é a mais comumente usada na geração de animais transgênicos. Além disso, a maioria dos trabalhos relacionados ao estudo da hematopoese a utilizam como modelo.

O vetor inserido nas células-tronco embrionárias possui um gene *reporter*, o  $\beta$ -Geo, que permite a genotipagem dos animais heterozigotos (*Arhgap21<sup>+/-</sup>*) gerados, como ilustrado na figura 10. As quimeras foram cruzadas com animais C57/Bl/6/JUnib selvagens (Cemib, Unicamp). A prole possuía animais heterozigotos, que apresentavam pelagem aguti, e animais selvagens (ou WT, abreviatura utilizada nas figuras e legendas relativa à denominação do inglês *wild type*) que foram genotipados através de PCR do DNA genômico, utilizando iniciadores no gene *reporter* ( $\beta$ -Geo). Esta primeira etapa foi iniciada pela Dra. Carolina Louzão Bigarella.

Foram realizados 10 cruzamentos para limpeza do fundo genético da linhagem H129, após a qual se iniciou os cruzamentos entre camundongos heterozigotos para obtenção do animal nocaute.



**Figura 10: Esquema do vetor GeneTrap.** Observe que há uma sequência *splice acceptor* (SA), que interrompe o *splicing* normal e causa a transcrição do vetor; a sequência do gene *reporter* ( $\beta$ -Geo) que permite a identificação do vetor e um sinal de poliadenilação [69]. Figura adaptada de [79].



## Genotipagem dos camundongos heterozigotos (*Arhgap21<sup>+/-</sup>*) e homozigotos (*Arhgap21<sup>-/-</sup>*)

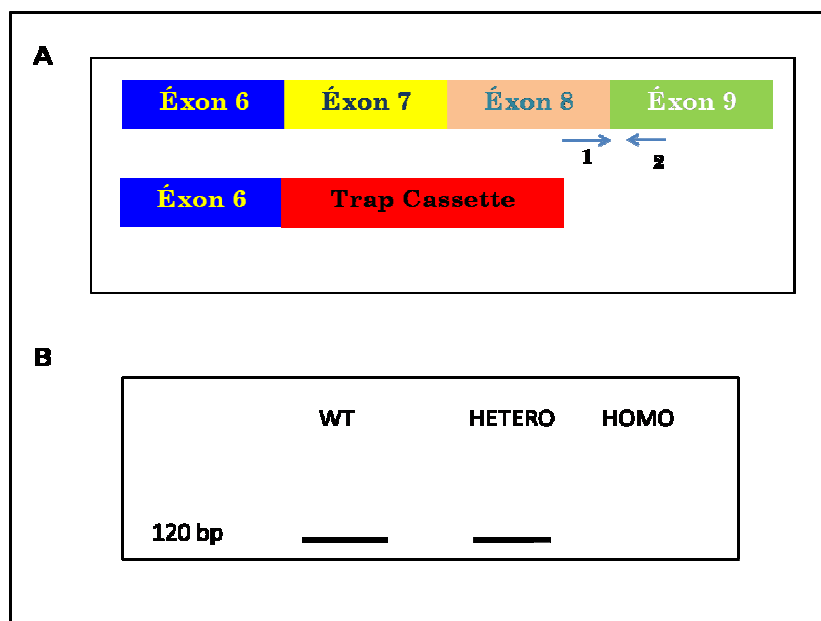
A prole gerada do cruzamento entre animais heterozigotos (*Arhgap21<sup>+/-</sup>*) e selvagens foi genotipada através de PCR do DNA genômico, usando um par de iniciadores no gene *reporter* da construção. O fragmento gerado por este PCR é de 587 pares de base (bp), presente apenas nos *Arhgap21<sup>+/-</sup>*. O ciclo da reação foi: desnaturação inicial: 94°C – 30 segundos; Ciclo de 35 vezes : 94°C – 15 segundos; 58°C- 40 segundos; 72°C – 1 minuto; Extensão final: 72°C – 5 minutos, com enzima Taq Polimerase (ThermoScientific).

**Tabela 1:** Sequência dos iniciadores usados para genotipagem dos camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>*.

β-Geo Senso	GGCGCCTCATGAATATTAACC
β-Geo antissenso	CACTCCAACCTCCGCAAACCTC

A genotipagem da prole obtida do cruzamento entre *Arhgap21<sup>+/-</sup>* para obtenção de um animal nocaute foi realizada de duas maneiras: (1) RT-PCR utilizando um par de iniciadores no β-Geo, um iniciador senso no éxon 6 do transcrito da *Arhgap21* e outro antissenso no éxon 8 e a reação idêntica à genotipagem dos camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>*. Os fragmentos esperados eram: nos selvagens apenas o de 259bp, relativo aos iniciadores éxon 6 e éxon 8; no *Arhgap21<sup>-/-</sup>* apenas o relativo ao β-Geo (587bp) e no *Arhgap21<sup>+/-</sup>*, os dois fragmentos (Figura 11); (2) PCR em tempo real, utilizando o reagente Sybgreen (ThermoScientific) e um par de iniciadores após a localização da inserção do vetor no transcrito da *Arhgap21*, entre os éxons 8 e 9 (Tabela 3), que gera um fragmento de 120bp que estaria presente nos animais *Arhgap21<sup>+/-</sup>* e ausente nos animais *Arhgap21<sup>-/-</sup>* (Figura 12).





**Figura 12: Esquema do desenho dos iniciadores utilizados na PCR em tempo real para genotipagem de camundongos homozigotos nocautes.** (A) 1 e 2: iniciador senso e antissenso, respectivamente, desenhados entre os éxons 8 e 9 do transcrito da *Arhgap21*. (B) Esquema dos fragmentos esperados após a PCR utilizando estes iniciadores em cada um dos animais. WT: camundongos selvagens, fragmento de 120 pares de base (bp) ; Hetero: Camundongos heterozigotos (*Arhgap21<sup>+/-</sup>*), fragmento de 120 bp; Homo: Camundongos Homozigotos nocautes (*Arhgap21<sup>-/-</sup>*), nenhum fragmento amplificado.

## PCR em tempo real

Para avaliar a expressão gênica foram realizadas PCR em tempo real. O RNA de células obtidas do fígado fetal, da medula óssea e do sangue dos animais selvagens e *Arhgap21<sup>+/-</sup>* foi isolado pelo reagente Trizol (Invitrogen) ou pelo kit Illustra RNAspin Mini (GeHealthcare Life Sciences). A transcrição reversa foi feita com kit específico, seguindo as instruções do fabricante (ThermoScientific). A reação de PCR foi realizada com o reagente SybrGreen (ThermoScientific), utilizando o termociclador Mastercycler ep realplex (Eppendorff). Para análise foi utilizado o método comparativo  $\Delta\Delta Ct$ .

**Tabela 3:** Sequência dos iniciadores usados no PCR em tempo Real.

Arhgap21 (éxon 8) senso	GAGGAAAGCTTCAAGCACCA
Arhgap21 (éxon9) antissenso	GATGACAGCAGATCAGGAA
CXCR-4 senso	CATGGAACCGATCAGTGT
CXCR-4 antissenso	GTAGATGGTGGGCAGGAAGA
HPRT senso	GGGGGCTATAAGTTCTTTGCT
HPRT antissenso	GGCCTGTATCCAACACTTCG

#### **Obtenção das células da medula óssea**

As células da medula óssea foram obtidas através da maceração de fêmures, tíbias e úmeros de animais selvagens C57/Bl/6/JUnib (Cemib, Unicamp). As hemácias foram lisadas por 15 minutos no gelo com solução tampão de lise (155mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM mM EDTA). Em seguida, lavou-se 3 vezes com PBS e por fim, as células foram ressuspendidas em meio ou PBS dependendo da utilização.

#### **Obtenção de fígado fetal**

Foram retirados 3 fígados fetais de embriões de camundongos C57/Bl6J Unib nos dias 11.5, 13.5, 15.5, 17.5 e 18.5 do desenvolvimento embrionário. Após a retirada, os fígados fetais foram macerados e as hemácias lisadas em tampão de lise por 15 minutos. Após a lavagem com PBS, estas células foram baixadas e adicionou-se Trizol (Invitrogen).

## Western Blot

A lise das células da medula óssea foi realizada em tampão RIPA (NaCl 150 mM; Tris-Cl 50 mM pH 7,4; deoxicolato 0,5 %; SDS 0,1 %, NP-40 1%) contendo inibidores de proteases (PMSF 1mM, leupeptina 1µg/mL, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> e aprotinina 1µg/mL) em gelo por 30 minutos. Em seguida, os lisados foram centrifugados a 12000 g por 30 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos e o conteúdo proteico foi dosado utilizando o reagente Bradford (Bio-Rad) e utilizando como referência uma curva padrão de BSA. Aos extratos protéicos foi adicionado tampão Laemlli ( NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M pH 7,0; Glicerol 50%; SDS 10%; azul de bromofenol 0,1%; 200mM de DTT). 50 µg de proteína foram fracionadas em gel 8% de poliacrilamida-SDS e as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Millipore) por 90 minutos a 120 volts. As membranas foram incubadas em solução de TBS-T (50mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl e 0,1% Tween-20) contendo 5% de leite desnatado para bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação dos anticorpos por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, incubou-se o anticorpo primário (anti-Arhgap21; Sigma e anti-Cdc42; Santa Cruz) em TBS-T 3% de leite desnatado durante a noite a 4°C. No dia seguinte, as membranas foram lavadas em TBS-T 3 vezes por 10 minutos cada e incubou-se o anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 1 hora em temperatura ambiente. Foram realizadas 3 lavagens para retirada do excesso de anticorpo secundário e revelou-se utilizando o substrato ECL (Pierce, ThermoScientific), incubando-o por 5 minutos a temperatura ambiente. Para a captura do sinal foi utilizada a máquina Uvitec Cambridge. Todas as incubações e lavagens foram realizadas sob leve agitação. A análise densitométrica das bandas foi realizada com o auxílio do programa Un-Scan-it versão 6.1.

## Ensaio de Migração Celular

5 x 10<sup>5</sup> células obtidas da medula óssea foram incubadas em 100µL de meio IMDM com 1% BSA (albumina sérica bovina) na parte superior dos insertos da placa de 24 poços para ensaio de *transwell*. Na porção inferior foram

adicionados 500µL de meio IMDM 1% BSA ou meio IMDM 1% BSA com adição de CXCL-12 (SDF-1) na concentração de 100ng/mL. A placa foi incubada por 3 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período o meio de cultivo da porção inferior foi retirado, as células foram centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos, ressuspendidas em meio IMDM com 2% de SFB (soro fetal bovino) e adicionadas ao meio metilcelulose suplementado com citocinas (M3434, StemCell Technologies). As colônias geradas pelo cultivo em metilcelulose suplementada com citocinas foram contadas após 10 dias em microscópio invertido. O resultado foi calculado através da razão do número de colônias obtido das células que migraram, pelo número obtido do total de células (*input*), expresso em porcentagem.

### **Adesão das células progenitoras hematopoéticas**

Placas de 96 poços (Corning) foram tratadas com 20 µg/mL de fibronectina recombinante (Retronectina, Takara) por 1 hora a 37°C. Após a remoção da retronectina, bloqueou-se a placa com solução PBS 2% BSA por 1 hora a 37°C e então a placa foi lavada duas vezes com PBS. A placa foi armazenada a 4°C para ser utilizada no dia seguinte.

Células da medula óssea de camundongos selvagens e *Arhgap21<sup>+/-</sup>* foram obtidas como descrito no ensaio de migração celular. As células linhagem negativas (Lin<sup>-</sup>) foram separadas através da metodologia EasySep (StemCell Technologies) seguindo as instruções do fabricante. 2 x 10<sup>5</sup> células Lin<sup>-</sup> em DMEM 10% SFB ou DMEM com 100 ng/mL de CXCL-12 (SDF-1) foram incubadas na placa tratada com retronectina a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 1 hora para promover a adesão. Após este período, a placa foi lavada duas vezes com PBS gelado para retirada das células não-aderidas. Foi adicionado 10µL do reagente CCK-8 (Sigma) em 100µL de PBS, como recomendado pelo fabricante, e a placa foi incubada por 3 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao final deste tempo, foi adicionado SDS 1% (v/v) e a leitura realizada na manhã seguinte em leitor de Elisa (Spectra Max 190, Medical Device) usando o comprimento de onda de 490 nm.

O resultado foi obtido através da razão da OD das células aderentes pela das células totais (*input*), expresso em porcentagem e normalizado pelo resultado obtido das células selvagens.

### **Ensaio de *homing***

Para estudar o *homing*, foi realizado transplante de medula óssea, no qual os animais receptores foram irradiados sub-letalmente, na dose de 9.5Gy, no irradiador do Ipen/USP.

Para o estudo do *homing* das células progenitoras hematopoéticas *Arhgap21<sup>+/-</sup>* para medula óssea normal,  $1 \times 10^7$  células da medula óssea dos doadores foram incubadas com o reagente CFSE (0,5 $\mu$ M), a fim de marcá-las para posterior acompanhamento por citometria de fluxo.  $1 \times 10^6$  células marcadas com CFSE em 100  $\mu$ L de PBS foram injetadas por via intravenosa nos camundongos receptores.

Para o estudo do *homing* das células progenitoras selvagens para a medula óssea *Arhgap21<sup>+/-</sup>*, foram obtidas células de camundongos doadores C57BL/6 GFP HET (Cemib, Unicamp), das quais foram injetadas  $1 \times 10^6$  células em camundongos selvagens e *Arhgap21<sup>+/-</sup>* receptores.

Em ambos os experimentos, após 19 horas do transplante, foram isoladas as células da medula óssea, do baço e do sangue dos camundongos transplantados e marcou-se com coquetel de linhagem hematopoética (Coquetel Lin/APC, BD Pharmingen). Foram adquiridas células Lin<sup>-</sup>CFSE<sup>+</sup> ou Lin<sup>-</sup>GFP<sup>+</sup> por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences) e analisadas utilizando o programa FlowJo.

### **Análise do receptor CXCR-4 integrinas por Citometria de Fluxo**

Células da medula óssea de camundongos selvagens e *Arhgap21<sup>+/-</sup>* foram obtidas como descrito anteriormente e marcadas com coquetel para as linhagens hematopoéticas (Lin APC; BD Pharmingen), anti-CXCR-4 (PE; BD Pharmingen), anti-CD49d/CD29 (PE, BD Pharmingen) e anti-CD49e/CD29 (PE; BD

Pharmingen). Foi realizada a aquisição em citômetro FACSCalibur (BD Biosciences) e análise foi realizada no programa BD FACSDiva .

### **Produção de proteínas recombinantes para o ensaio de *Pull Down***

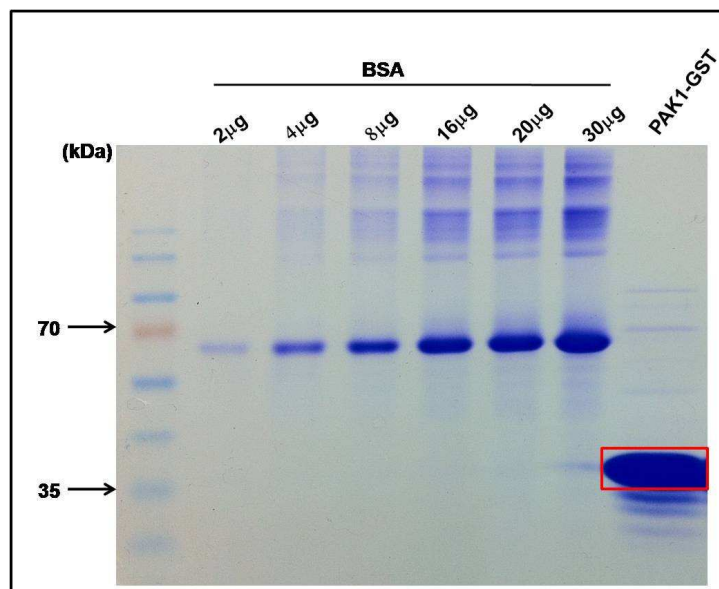
O ensaio de produção de proteínas recombinantes e de *pull-down* foi realizado para avaliar a atividade da proteína Cdc42. Seguiu-se o protocolo utilizado na tese da Dra. Mariana Lazarini [80].

Para avaliação da atividade da Cdc42, foi utilizado o domínio de ligação à Rho da proteína efetora PAK1 (PAK1-GST) clonado em pGEX-KG. As construções foram gentilmente cedidas pela prof<sup>a</sup>. Anne Ridley (*King's College London*, Reino Unido).

Para a produção das proteínas, bactérias *E. coli* transformadas com as construções contendo os domínios de ligação a Rho foram inoculadas em 100mL de meio LB com 100 µg/mL de ampicilina. Após incubação durante a noite a 37°C sob agitação, as culturas foram diluídas 1:20 em 1 litro de LB com ampicilina e incubadas a 37°C até a D.O. 600 atingir 0,8-1. A expressão protéica foi então induzida por 0,5mM de isopropyl β-D-1- thiogalactopyranoside (IPTG) por 2 horas a 30°C. Após este período, as bactérias foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos e o precipitado incubado a -80°C. No dia seguinte, o precipitado foi ressuspendido em tampão STE (Tris 10mM, pH 8.0; 150mM NaCl; 1mM EDTA) com 1mM de PMSF. Em seguida adicionou-se 100 µg/mL de lisozima e incubou-se por 15 minutos no gelo. Seguiu-se a incubação com 5mM de DTT, homogeneização, adição de Tween-20 (1%) e SDS (0,03%) e homogeneização. O lisado bacteriano foi então clarificado por 10 minutos de centrifugação a 15000g a 4°C e incubado com 50% de glutationa sefarose por uma hora a 4°C com agitação. Centrifugou-se rapidamente a 1000 rpm por 3 minutos para baixar as *beads* e seguiu-se lavando 3 vezes com o tampão STE. Para observar a pureza e a quantidade de proteína purificada, as amostras de proteínas produzidas (10µL), juntamente com uma curva contendo diferentes quantidades de albumina de soro bovino (BSA) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%-SDS-



PAGE em aparelho de eletroforese a 100 volts por um período aproximado de duas horas. Em seguida, o gel foi corado em solução de 2,5% de azul de Coomassie R-250, 10% metanol e 10% ácido acético por um período de duas horas e depois descorado em solução de 30% metanol e 10% ácido acético com agitação por um período aproximado de 12 horas (Figura 13).



**Figura 13: Gel de Acrilamida mostrando a banda correspondente à construção PAK1 –GST utilizada nos ensaios de *pull down*.** Mostra-se gel de acrilamida 12% corado com azul de Coomassie, no qual o domínio de ligação da proteína efetora PAK-1 (Pak-1-GST) foi fracionado por eletroforese. Destaca-se em vermelho a banda correspondente à PAK-1-GST produzida.

### Ensaio de *Pull Down* para avaliação da atividade de RhoGTPases

A atividade da proteína Rho GTPases Cdc42 foi determinada por ensaio de precipitação por afinidade em extratos protéicos provenientes de células da medula óssea de camundongos selvagens e *Arhgap21<sup>+/-</sup>*. O protocolo de *pull down* foi realizado como descrito por Ren e Schwartz [81].

$1 \times 10^7$  células da medula óssea foram incubadas por 1 hora em DMEM e DMEM suplementado com 100ng/mL de CXCL-12. As células foram retiradas e lavadas 2 vezes com solução salina Tris (TBS; 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl)

e lisadas com tampão de lise (50mM Tris pH 7.2, 1% de Triton X-100, 0,5% de deoxicolato de sódio, 0,1% de SDS, 500mM de NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub> e 10µg/mL de leupeptina e aprotinina e 1mM de PMSF). O lisado proteico foi imediatamente transferido para um tubo contendo os domínios de ligação da proteína efetora (GST-PAK1) e incubado a 4°C com agitação por 1 hora. Após 4 lavagens com tampão específico (1% Triton X-100; 150mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10µg/mL de leupeptina e aprotinina e 0,1mM de PMSF), foi adicionado tampão Laemlli contendo 40mM de DTT e as amostras foram incubadas a 95°C por 10 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida 12% e, após transferência para membrana de nitrocelulose, as membranas foram incubadas com anticorpos anti-Cdc42 (Santa Cruz).

### **Análise da secreção de CXCL-12**

Foi retirado um fêmur dos camundongos, o qual foi macerado em 1 mL de PBS, as células foram baixadas e o sobrenadante retirado e armazenado a -80°C. O soro plasmático foi obtido do sangue dos camundongos através de centrifugação, 3000 RPM por 15 minutos. Os níveis de CXCL-12 secretados na medula óssea e no soro plasmático foram analisados pelo método ELISA, seguindo as instruções do fabricante (R&D systems). Resumidamente, foi adicionado 50µL de CXCL-12 murino controle, curva padrão e das amostras à placa preparada pelo fabricante. A curva padrão foi obtida através da diluição seriada do padrão (100 ng/mL) disponibilizado pelo fabricante, nas seguintes concentrações: 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1.25 ng/mL, 0.625 ng/mL, 0.313 ng/mL e 0.156 ng/mL. Incubou-se a placa por 2 horas a temperatura ambiente sob agitação (500 rpm). O conteúdo dos poços foi aspirado e lavou-se 4 vezes com tampão de lavagem (400 µL). A cada lavagem o conteúdo era aspirado e invertia-se fortemente a placa sobre toalha de papel para completa remoção do líquido. Adicionou-se 100 µL de anti- CXCL-12 conjugado (anti- CXCL-12 de camundongo conjugado à peroxidase), e incubou-se por 2 horas a temperatura ambiente no agitador. Para retirada do conteúdo foi realizado o passo de

aspiração/lavagem. 200  $\mu$ L de solução - substrato (obtida da mistura da solução A, que contém peróxido de hidrogênio estabilizado, e solução B, que contém tetrametilbenzidina), foi incubada por 30 minutos, a temperatura ambiente, protegida da luz e sobre a bancada. Após este período, foi adicionada solução de parada (contendo ácido sulfúrico 2N), transformando a coloração de azul para amarelo. A densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro Spectra Max 190 (Medical Device) no comprimento de onda de 450 nm e os dados analisados no software SOFT MAX-PRO 3.0. A curva padrão foi utilizada para determinação da concentração da quimiocina.

### **Análise Estatística**

Os dados foram analisados como média  $\pm$  desvio padrão pelo teste t de *Student* e os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p \leq 0,05$ .

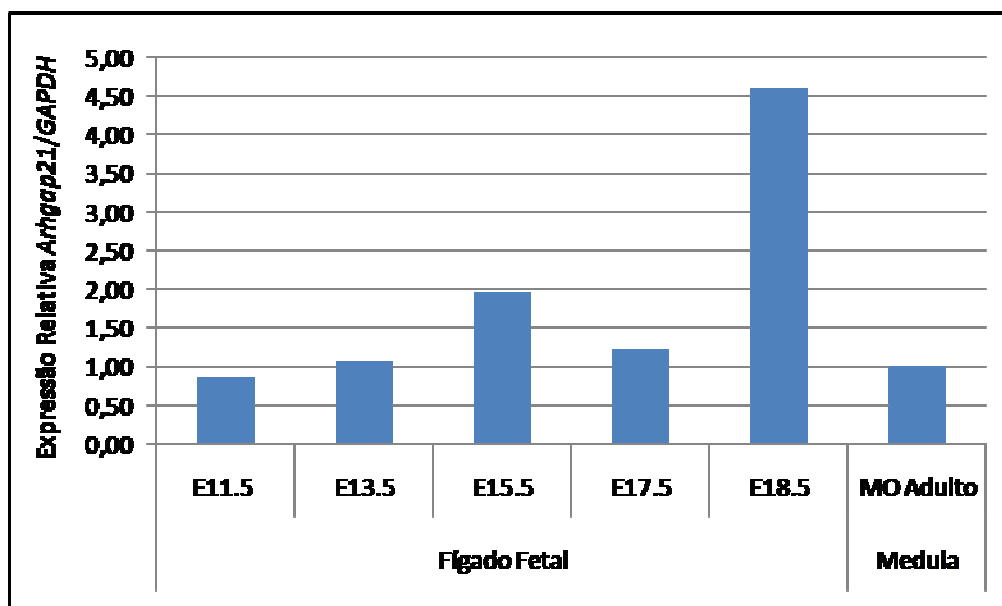


# **Resultados**



## Expressão Gênica da *Arhgap21* no fígado fetal e medula óssea

Analisou-se a expressão gênica de *Arhgap21* durante o desenvolvimento dos órgãos hematopoéticos através de PCR em tempo real. A figura abaixo mostra sua expressão gênica no fígado fetal em diferentes tempos: 11.5, 13.5, 14.5, 18.5 dias de desenvolvimento embrionário e medula adulta (Figura 13).



**Figura 14: Análise da expressão gênica de *Arhgap21* no fígado fetal e medula óssea de camundongos selvagens C57/Bl6.** A expressão da *Arhgap21* é maior em E18.5, que corresponde ao momento em que as células-tronco hematopoéticas estão saindo do fígado fetal e migrando para a medula óssea, que se tornará o principal sítio hematopoético. E: dia do desenvolvimento embrionário contado a partir do dia do cruzamento.

Observou-se que há uma expressão maior de *Arhgap21* em E18.5, estágio no qual as células-tronco hematopoéticas geradas no fígado fetal estão migrando para a medula óssea, que, após o nascimento se tornará o principal sítio hematopoético. Este resultado sugere que a *Arhgap21* possa participar deste egresso dos progenitores hematopoéticos do fígado fetal para a medula óssea.

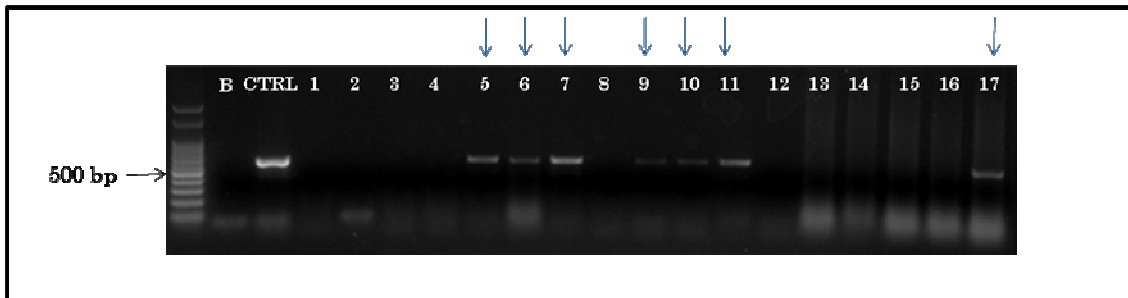
## **Geração do animal nocaute para *Arhgap21***

A proteína ARHGAP21 participa de diferentes vias de sinalização e tem se mostrado uma importante reguladora de diversos eventos celulares, dentre eles migração e adesão [68, 69, 73-75]. Nesse sentido, a geração de um modelo animal nocaute para *Arhgap21* se tornou muito importante para permitir uma melhor caracterização de suas funções.

O projeto de geração de animais nocautes para o gene da *Arhgap21* foi iniciado durante o período de doutoramento da dra. Carolina Louzão Bigarella [82]. Foram adquiridas duas linhagens de células-tronco embrionárias de camundongos H129 nas quais havia inibição da transcrição gênica da *Arhgap21*: AK286 e RRR629, ambas obtidas pelo consórcio GeneTrap e disponibilizadas pela Universidade da Califórnia-Davis (<http://www.genetrap.org>). A injeção destas células no blastocisto de camundongos da linhagem C57/Bl6 foi realizada no CEDEME-UNIFESP, sob supervisão do professor João Pesquero.

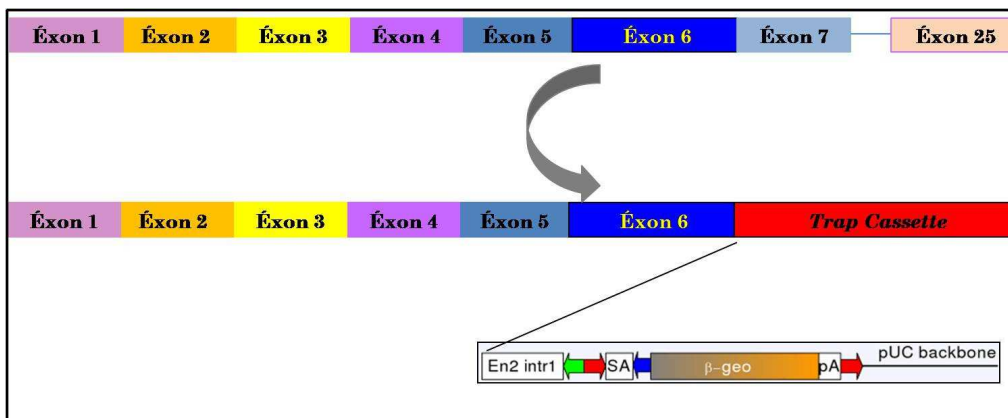
Prosseguiu-se com os cruzamentos da linhagem obtida das células RRR 629 que, ao contrário da anterior, manteve a expressão do inserto na prole de todos os cruzamentos realizados. Dessa maneira, a cada cruzamento, a prole é genotipada através de PCR do DNA Genômico extraído da cauda dos camundongos utilizando iniciadores específicos para o gene *reporter* do vetor, o  $\beta$ -Geo. O PCR dos animais *Arhgap21*<sup>+/-</sup> gera um fragmento na altura de 580 pares de base devido à presença do vetor, enquanto os animais selvagens (WT) não apresentam a mesma (figura 15).





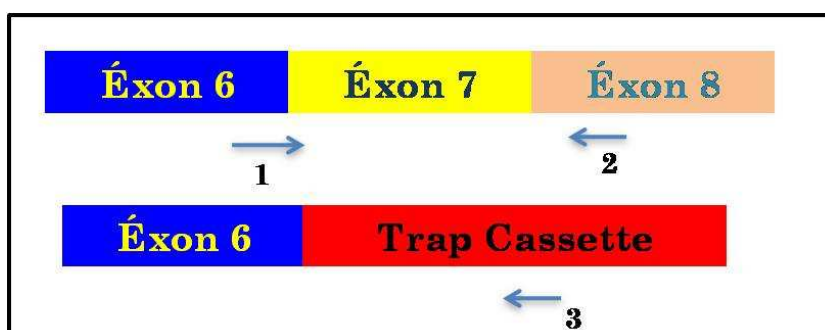
**Figura 15: PCR da genotipagem da prole gerada do cruzamento entre camundongos selvagens (WT) e *Arhgap21*<sup>+/-</sup>.** As setas azuis mostram as amostras nas quais houve amplificação do fragmento de aproximadamente 580bp correspondente à construção do vetor inserido para inibição gênica da *Arhgap21* e que caracteriza os animais *Arhgap21*<sup>+/-</sup>. Gel de agarose 1% com brometo de etídio. B: Branco; CTRL: Controle positivo (DNA da célula-tronco embrionária); 1-17: prole de duas fêmeas de cruzamento entre selvagens e *Arhgap21*<sup>+/-</sup>.

Através da metodologia de 5' RACE (*Rapid Amplification cDNA End*), o consórcio GeneTrap disponibilizou a sequência após a qual o vetor está inserido. O transcrito da *Arhgap21* possui 25 éxons. Comparando esta sequência e a que foi gerada pelo 5'RACE e baseando-se na informação disponibilizada pelo consórcio, o vetor foi inserido após o éxon 6, como ilustrado na Figura 16.

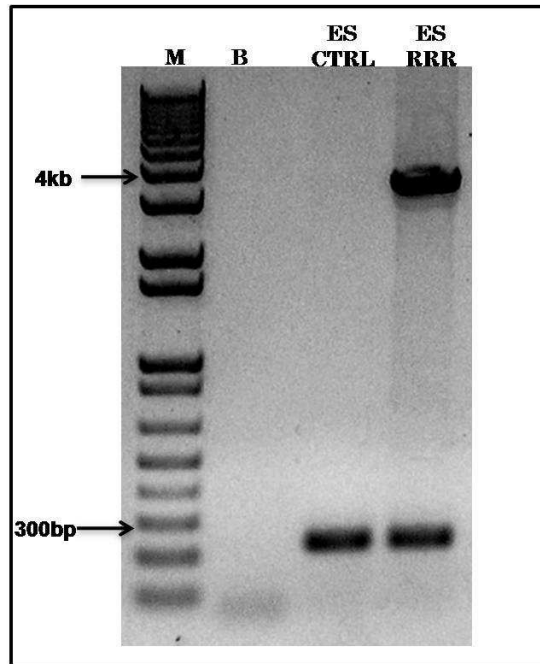


**Figura 16: Esquema representativo da localização do vetor no transcrito da *Arhgap21* gerado pelo 5' RACE realizado pelo consórcio GeneTrap.** O transcrito da *Arhgap21* possui 25 éxons. A sequência disponibilizada no site do consórcio GeneTrap ([www.genetrap.org](http://www.genetrap.org)) mostra que a inserção do vetor ocorreu após o éxon 6 da *Arhgap21*.

Baseando-se na informação descrita acima, realizou-se um RT-PCR para confirmar a localização do inserto. Foi utilizado como amostra, cDNA obtido das células embrionárias e um trio de iniciadores: (1) um senso localizado no éxon 6; (2) um antissenso no éxon 8 e um antissenso no vetor (Figura 17). Na figura 18 pode-se observar a amplificação dos dois fragmentos esperados: um de aproximadamente 4kb, relativo aos iniciadores 1 e 3, e o outro relativo aos iniciadores 1 e 2. Dessa maneira, confirmou-se que a construção está localizada após o éxon 6 do transcrito da *Arhgap21*. Outras reações foram realizadas, utilizando outros iniciadores, confirmando a inserção (dado não mostrado).



**Figura 17: Esquema representativo da localização dos iniciadores na região de inserção do vetor para confirmação da sua localização.** (1) um senso localizado no éxon 6; (2) um antissenso no éxon 8 e [53] um antissenso no vetor. Tamanho esperado dos fragmentos gerados pelo PCR dos cDNAs de célula-tronco embrionária utilizando estes iniciadores: 1-3: 4kb; 1-2: 259bp.

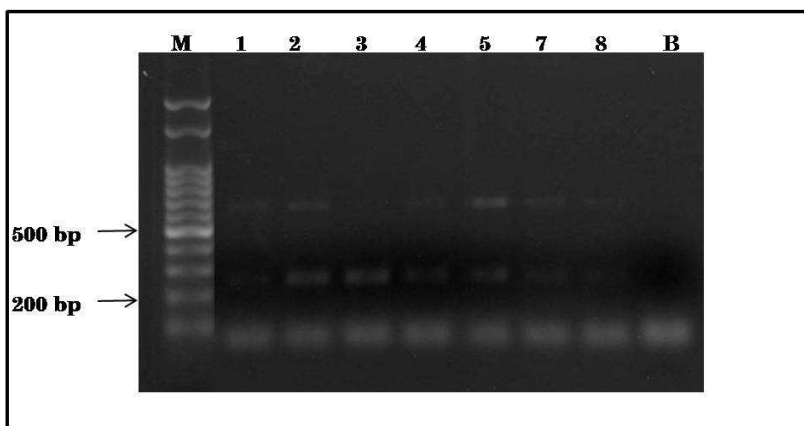


**Figura 18: Confirmação da localização do vetor após o éxon 6 do transcrito da *Arhgap21* através da amplificação dos fragmentos esperados de 4kb e 259bp.** A foto mostra que aparecem duas bandas na linha relativa ao cDNA das célula-tronco embrionária RRR (ES RRR): a primeira de 4kb, relativa à amplificação dos iniciadores senso no éxon 6 e antissenso no vetor, e a segunda de 259bp, relativa à amplificação dos iniciadores senso no éxon 6 e antissenso no éxon 8. Gel de agarose 0.6% com brometo de etídio. (M) Marcador; (B) Controle negativo da reação; ES CTRL (amostra de cDNA da célula-tronco embrionária sem inserção); ES RRR (amostra de cDNA da célula-tronco embrionária com a inserção do vetor).

Após a confirmação da localização do vetor após o éxon 6 do transcrito da *Arhgap21*, iniciou-se a padronização de genotipagem do camundongo *Arhgap21*<sup>-/-</sup>. A estratégia de genotipagem foi realizar um PCR com dois pares de iniciadores: um par no gene *reporter* da construção, o  $\beta$ -geo e outro par do éxon 6 ao éxon 8 (figura 19). Os fragmentos esperados neste PCR foram (1) 259 bp, correspondente aos iniciadores 1 e 2 e (2) correspondente aos iniciadores 3 e 4. O resultado esperado seria: (a) para o animal selvagem, uma banda de 259bp, correspondente ao fragmento dos éxon 6 e 8 da *Arhgap21*; (b) para o animal

*Arhgap21*<sup>+/-</sup>, além da banda anterior, uma banda corresponde ao vetor (580bp) e (c) para o *Arhgap21*<sup>-/-</sup>, uma banda relativa ao fragmento do vetor (580bp).

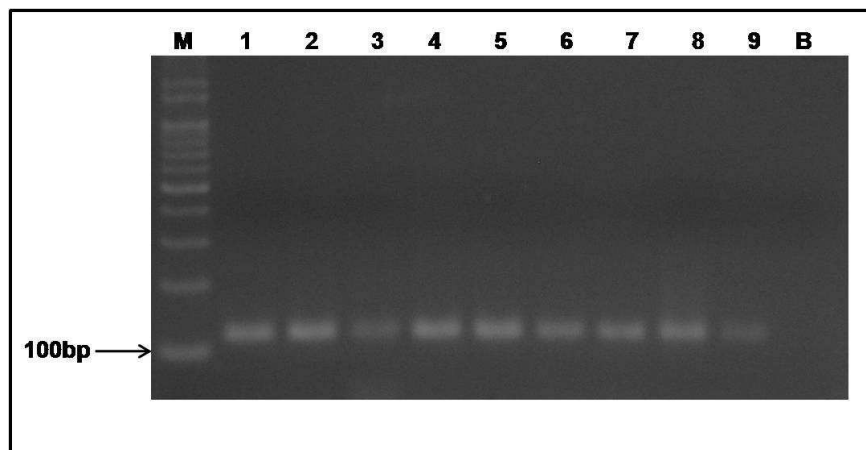
Os cruzamentos entre *Arhgap21*<sup>+/-</sup>, para obtenção de um animal *Arhgap21*<sup>-/-</sup>, foram iniciados. E com a primeira prole, realizou-se um RT-PCR a partir de cDNA obtido do sangue destes animais. Na figura 19, pode-se observar que dos 8 filhotes que nasceram, uma amostra corresponde a camundongo selvagem, pois há apenas a banda correspondente aos éxons 6 e 8 da *Arhgap21* (259bp), e as outras 7 de animais *Arhgap21*<sup>+/-</sup> (tamanhos 259bp e 580bp) apareceram. Dessa maneira, nesta prole não foi observado nenhum filhote *Arhgap21*<sup>-/-</sup>.



**Figura 19: RT-PCR da primeira prole obtida do cruzamento entre camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup>.** Observa-se que dos 8 animais, 1 apresentou o fragmento correspondente à *Arhgap21* (259bp) e os outros 7 apresentaram as duas bandas, a do vetor (587bp) e a da *Arhgap21* (259bp). Nenhum animal amplificou apenas a banda do vetor e, portanto, não se obteve animais *Arhgap21*<sup>-/-</sup> nesta primeira prole. Gel de agarose 1% com brometo de etídio. M: Marcador; 1-8: prole do primeiro cruzamento; B: controle negativo da reação.

Embora nesta primeira prole, o PCR tenha funcionado, não foi bem sucedida na genotipagem das proles seguintes. Outras tentativas de genotipagem dos animais *Arhgap21*<sup>-/-</sup> estão sendo padronizadas. Uma delas é a genotipagem através de PCR em tempo real. Amostras de cDNA obtidas do sangue dos

camundongos de dois outros cruzamentos foram amplificadas por PCR em tempo real, usando iniciadores entre os éxons 9 e 10 do transcrito da *Arhgap21* e portanto após a inserção do vetor. O produto da reação foi fracionado em gel de agarose 4% para confirmar a amplificação do fragmento (tamanho igual a 120bp). O resultado esperado seria que apenas os animais selvagens e os *Arhgap21*<sup>+/-</sup> amplificassem o fragmento correspondente à *Arhgap21* e, portanto, os camundongos *Arhgap21*<sup>-/-</sup> não o amplificariam. Como se pode observar na Figura 20, todos os animais apresentaram o fragmento esperado. Por este motivo, pode-se considerar que nenhum camundongo *Arhgap21*<sup>-/-</sup> foi gerado nestes dois cruzamentos.



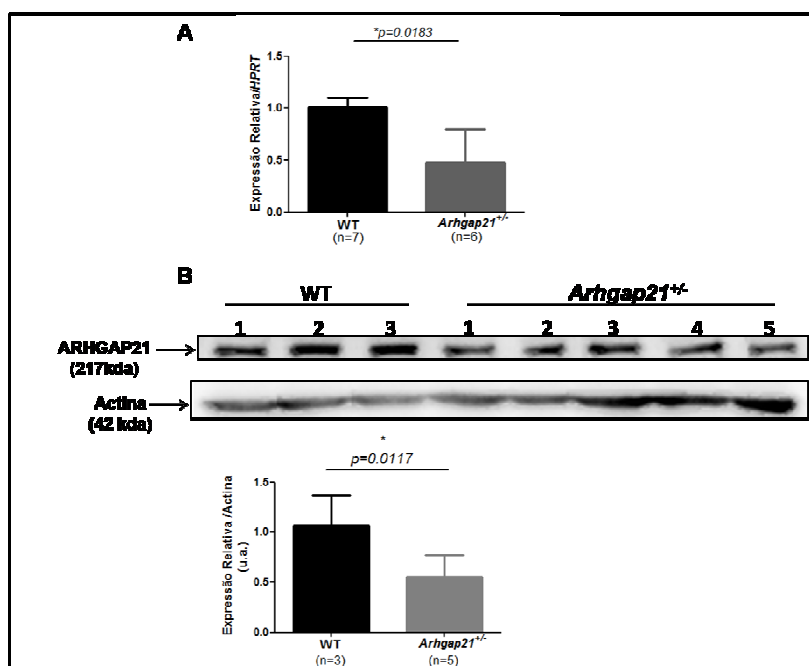
**Figura 20: RT-PCR de prole obtida entre camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup>.** Observa-se que todas as amostras amplificaram o fragmento esperado de 120 bp, mostrando que não houve geração de um animal *Arhgap21*<sup>-/-</sup>. Gel de agarose 4% marcado com brometo de etídeo. M: marcador; 1-9 amostras de cDNA obtidas de sangue; B: branco.

Ainda é cedo para afirmar que o camundongo *Arhgap21*<sup>-/-</sup> não é viável, pois é necessário que se observe a prole dos cruzamentos entre *Arhgap21*<sup>+/-</sup> por algumas gerações. Por outro lado, iniciou-se a caracterização dos animais com haploinsuficiência de *Arhgap21* (heterozigotos, aqui denominados *Arhgap21*<sup>+/-</sup>),

que foram usados como modelo para o estudo da participação da *Arhgap21* na hematopoese.

### **Análise da expressão gênica e protéica de *Arhgap21* na medula óssea de animais *Arhgap21*<sup>+/-</sup>**

Analisou-se a expressão gênica e protéica da *Arhgap21* na medula óssea dos camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> a fim de quantificar a sua inibição. Observamos que a média de expressão gênica analisada por PCR em tempo em real na medula óssea de animais selvagens foi de  $1,00 \pm 0,09$ , enquanto dos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> foi de  $0,47 \pm 0,32$  (Figura 21A). Além da redução da expressão gênica, observou-se que a expressão proteica de *Arhgap21* na medula óssea dos camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup>, encontrava-se reduzida (Figura 21B). Portanto, os animais heterozigotos para *Arhgap21* apresentam redução gênica e protéica da *Arhgap21*.



**Figura 21: Análise da expressão gênica e proteica de *Arhgap21* na medula óssea de animais selvagens e *Arhgap21*<sup>+/-</sup>. (A) Redução na expressão gênica (WT:  $1.00 \pm 0.09$ ; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>:  $0.47 \pm 0.32$ ) e (B) protéica (WT:  $1.073 \pm 0.294$ ; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>:  $0.553 \pm 0.214$ ) de *Arhgap21* na medula óssea dos animais *Arhgap21*<sup>+/-</sup>. Média  $\pm$  desvio padrão.**

Os camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> apresentam parâmetros hematológicos normais aos esperados para a linhagem C57/Bl6, [83] embora apresentem algumas diferenças estatísticas em relação aos selvagens usados (Tabela 4). Eles apresentam fenótipo normal, vivem em condições normais de bioterismo, sem necessidade de nenhum controle específico e chegam a passar de 24 semanas de vida como os selvagens.

**Tabela 4: Parâmetros Hematológicos dos camundongos selvagens e *Arhgap21*<sup>+/-</sup>**

<b>Parâmetros Hematológicos</b>	<b>WT</b>	<b><i>Arhgap21</i><sup>+/-</sup></b>
<b>Hemácias</b> (n <sup>o</sup> x 10 <sup>6</sup> /μL)	10,93±0.34	10.42±0.28*
<b>Hemoglobina</b> (g/dL)	16.19±0.33	15.76±0.36**
<b>Hematócrito</b> (%)	54.78±1.64	53.75±1.39
<b>VCM</b> (fL)	50.0±0.43	51.08±0.74*
<b>Leucócitos</b> (n <sup>o</sup> x 10 <sup>3</sup> /μL)	10.0±2.0	12±1.8*
<b>Plaquetas</b> (n <sup>o</sup> x 10 <sup>3</sup> /μL)	1.8±0.11	1.77±0.09*
<b>VPM</b> (fL)	6.9±0.17	7.1±0.08*

As amostras de sangue foram coletas dos camundongos com 8 semanas de vida. As contagens foram realizadas em hemocitômetro automático (Poch 100 iv Diff, Sysmex, Roche). VCM: Volume Corpuscular Médio; VPM: Volume Plaquetário Médio. Os resultados mostrados são média ± desvio padrão. n WT: 7; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>: 6 \*p≤0.05; \*\*p≤0.01

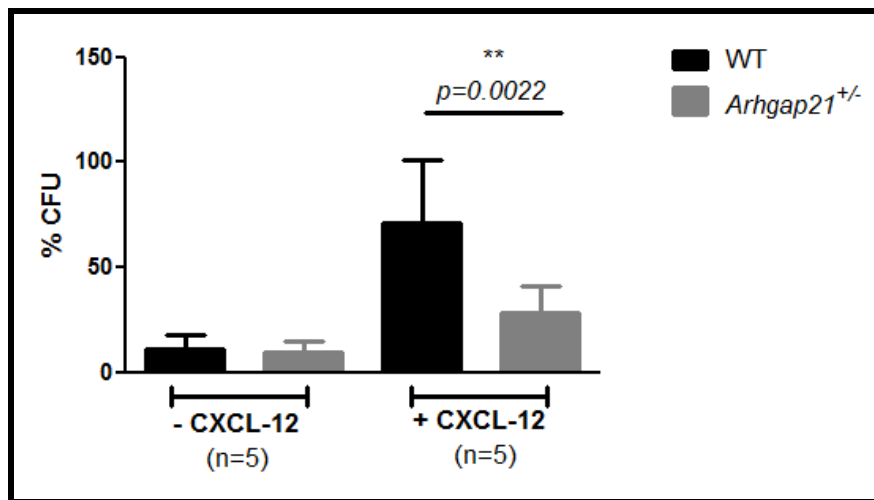
Diante da redução da expressão gênica e proteica de *Arhgap21* observada nos camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup>, iniciou-se a investigação da participação deste gene na hematopoese normal utilizando-os como modelo de estudo.

## Redução da quimiotaxia das células progenitoras hematopoéticas de camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>* induzida por CXCL-12

ARHGAP21 está envolvida na migração de diferentes modelos de célula humanas aderentes [68, 74, 77], mas pouco se sabe sobre seu papel na migração e adesão das células hematopoéticas.

Para estudar os efeitos da redução da expressão de *Arhgap21* na migração das células progenitoras hematopoéticas, foi realizado ensaio de migração em placa *transwell*.

Observou-se que a quimiotaxia induzida por CXCL-12 dos progenitores hematopoéticos provenientes dos camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>* encontra-se reduzida (Figura 22; WT:  $71.15 \pm 29.64$ ; *Arhgap21<sup>+/-</sup>*:  $28.28 \pm 12.38$ ). Este resultado indica que a *Arhgap21* é importante para a migração adequada dos progenitores hematopoéticos.



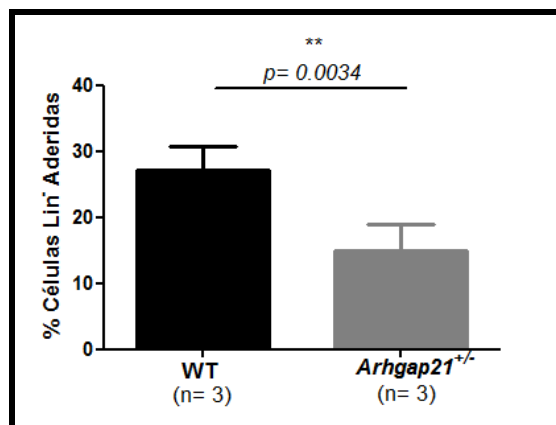
**Figura 22: Células progenitoras hematopoéticas de camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>* apresentam redução da quimiotaxia induzida por CXCL-12.** Observa-se que a migração induzida pela quimiocina CXCL-12 de Unidades Formadoras de Colônia (CFU) com redução de *Arhgap21* é menor (*Arhgap21<sup>+/-</sup>*:  $28.28 \pm 12.38\%$ ) comparada aos selvagens ( $71.15 \pm 29.64\%$ ). A *Arhgap21* é importante para a quimiotaxia induzida por CXCL-12 dos progenitores hematopoéticos. A porcentagem de CFU foi gerada pela razão do número de CFU formados na porção que migrou pelo da porção total (*input*). Média  $\pm$  desvio padrão.



## Células Progenitoras Hematopoéticas dos camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> apresentam menor adesão à fibronectina

A fibronectina é um dos principais componentes da matriz extracelular e está envolvida na adesão de células progenitoras hematopoéticas à matriz da medula óssea através dos receptores integrinas  $\beta 1$  e CD44 (receptor de ácido hialurônico). As integrinas são importantes moléculas para a adesão das células progenitoras hematopoéticas nos nichos da medula óssea, participando da sua adesão às células endoteliais e à matriz extracelular, da migração transendotelial e direcional [15, 32, 33]. A fim de investigar o possível envolvimento da *Arhgap21* na adesão das células progenitoras hematopoéticas, foi utilizada fibronectina recombinante, CH296 (Retronectina, Takara), que contém sítios de ligação para as integrinas  $\alpha 4\beta 1$  e  $\alpha 5\beta 1$ .

Como se pode observar na Figura 23, há uma redução das células progenitoras hematopoéticas provenientes de camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> aderidas à fibronectina, indicando que a adesão à fibronectina está prejudicada devido à redução da *Arhgap21* nestas células. Este resultado sugere que a *Arhgap21* desempenhe importante papel na adesão das células progenitoras ao nicho da medula óssea através da ligação das células progenitoras à matriz extracelular, composta por fibronectina.



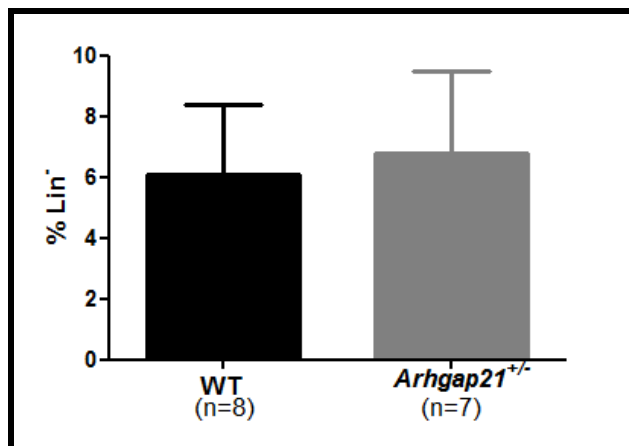
**Figura 23:** Células Progenitoras Hematopoéticas dos camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> apresentam menor adesão à fibronectina. (A) Células incubadas em meio DMEM com 10 % SFB (WT: 27.16 ± 3.15; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>: 15.02 ± 3.82). O

resultado obtido foi expresso em porcentagem das células aderidas calculada pela razão da densidade óptica das células aderidas por das células totais (*input*). Média  $\pm$  desvio padrão .

### ***Homing* das células progenitoras hematopoéticas *Arhgap21<sup>+/-</sup>* está comprometido**

O *homing* para a medula óssea envolve: migração eficiente da célula progenitora hematopoética, adesão e rolamento pelas células endoteliais, subsequente migração pela camada endotelial e pela lâmina basal (fibronectina, colágeno e laminina) e migração induzida por CXCL-12 para o nicho [15, 18, 25, 26]. Para estudar a capacidade das células-tronco e progenitoras hematopoéticas em realizar o *homing* para a medula óssea, estas células são transplantadas para um camundongo receptor e analisadas algumas horas após o transplante.

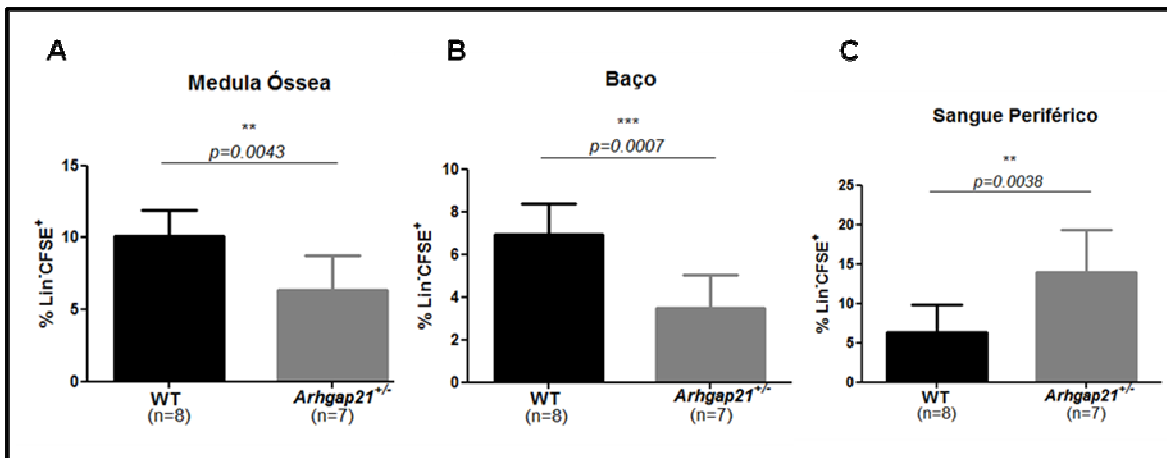
Foi demonstrado que as células progenitoras hematopoéticas apresentam menor quimiotaxia induzida por CXCL-12 e adesão das células progenitoras hematopoéticas e por isso, investigou-se também se estas células teriam alguma alteração na capacidade de realizar o *homing*. Para isso, células da medula óssea de animais selvagens e *Arhgap21<sup>+/-</sup>* foram obtidas e incubadas com CFSE (Invitrogen) a uma concentração de 0,5 $\mu$ M.  $1 \times 10^6$  células foram transplantadas por via intravenosa em camundongos selvagens receptores. Após 19 horas do transplante, foram retirados medula óssea, baço e sangue periférico destes receptores e as células analisadas por citometria de fluxo para marcação com CFSE e marcadores de Linhagem. Não há diferença na população de progenitores Lin<sup>-</sup> entre os camundongos selvagens e *Arhgap21<sup>+/-</sup>* (Figura 24).



**Figura 24:** A população de células hematopoéticas progenitoras não comprometidas (Lin<sup>-</sup>) não está alterada nos camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup>. A frequência de células progenitoras não comprometidas não está alterada na medula óssea dos camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> (WT: 6,57 ± 3,25%; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>: 8,0 ± 2,89%). Média ± desvio padrão .

A análise do *homing* mostrou que a porcentagem de células progenitoras hematopoéticas do doador (CFSE<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>) *Arhgap21*<sup>+/-</sup> era menor (6,3 ± 2,41) que a do doador selvagem (10,09 ± 1,81) na medula óssea dos receptores (Figura 25A). Este mesmo resultado foi encontrado no baço (WT: 6,92 ± 1,47; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>: 3,48 ± 1,57) (Figura 25B), que também é um importante órgão hematopoético para o qual as células progenitoras hematopoéticas também migram após o transplante [84]. Por outro lado, quando o sangue periférico foi analisado, observou-se um aumento da população CFSE<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> (WT: 6,4 ± 3,38; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>: 13,95 ± 5,33) (Figura 25C), indicando que as células progenitoras hematopoéticas inibidas para *Arhgap21* ficaram acumuladas na corrente sanguínea, já que o *homing* para a medula óssea e para o baço encontrava-se prejudicado.

O *homing* ineficaz das células progenitoras hematopoéticas inibidas para *Arhgap21* pode estar associado à redução na migração, na quimiotaxia e na adesão mediada pelas integrinas  $\alpha 4\beta 1$  e  $\alpha 5\beta 1$  observada *in vitro*. E juntos, estes resultados sugerem que a *Arhgap21* é uma importante proteína reguladora da migração, adesão e *homing* das células progenitoras hematopoéticas.

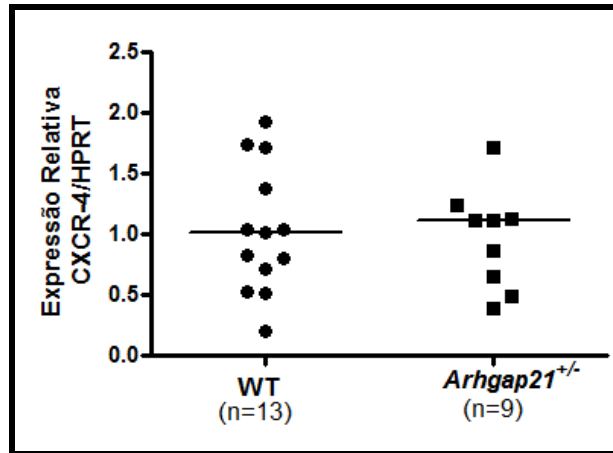


**Figura 25: Homing das células progenitoras hematopoéticas com redução de *Arhgap21* é ineficaz.** A porcentagem de células progenitoras hematopoéticas do doador (CFSE<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>) *Arhgap21*<sup>+/-</sup> é menor que a do doador selvagem na medula óssea (A) WT: 10,09 ± 1,81; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>: 6,3 ± 2,41 e no baço (B) (WT: 6,92 ± 1,47; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>: 3,48 ± 1,57) dos receptores. Por outro lado no sangue observa-se aumento destas células (WT: 6,4 ± 3,38; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>: 13,95 ± 5,33). O resultado obtido foi expresso em porcentagem das células progenitoras Lin<sup>-</sup> do doador CFSE<sup>+</sup>. Média ± desvio padrão

#### **População de células Lin<sup>-</sup>CXCR-4<sup>+</sup> não está alterada na medula óssea de camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup>**

A redução da migração, adesão e *homing* das células progenitoras hematopoéticas deficientes em *Arhgap21* poderia estar associada à redução da expressão de CXCR-4 e/ou do número de células progenitoras hematopoéticas expressando este receptor.

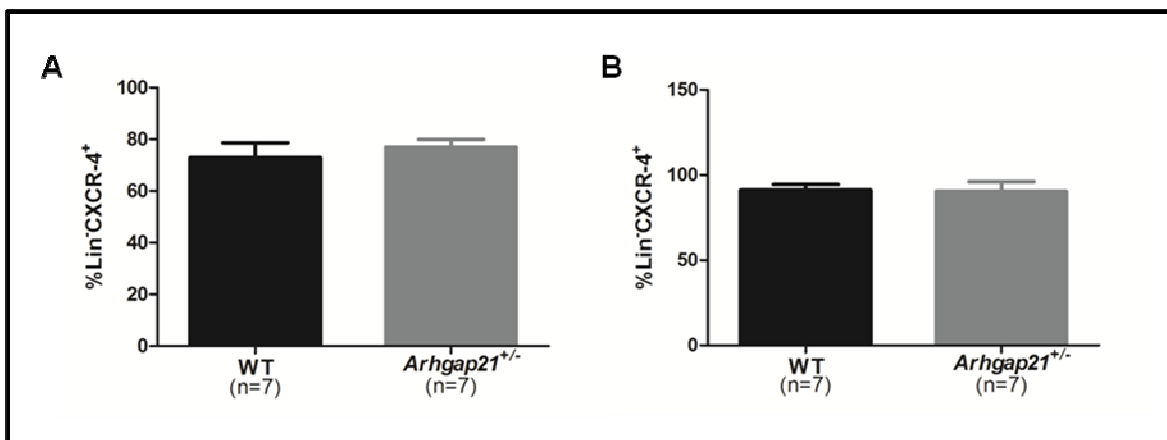
Primeiramente, foi avaliada a expressão gênica de CXCR-4 nas células obtidas da medula óssea dos camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup>. Como é observado na figura 26, não houve diferença da expressão gênica do CXCR-4 quando comparada à expressão na medula óssea dos animais selvagens.



**Figura 26: Análise da expressão gênica de CXCR-4 nas células da medula óssea de camundongos selvagens e *Arhgap21*<sup>+/-</sup>.** Não foi observada diferença na expressão gênica do receptor CXCR-4 nas células da medula óssea dos animais *Arhgap21*<sup>+/-</sup> ( $0,96 \pm 0,41$ ) quando comparada à expressão obtida dos camundongos WT ( $1,03 \pm 0,52$ ).

A fim de investigar se havia diferença na frequência de células progenitoras hematopoéticas expressando o receptor CXCR-4, células obtidas da medula óssea de camundongos selvagens e *Arhgap21*<sup>+/-</sup> foram marcadas para marcadores de linhagem hematopoética e CXCR-4. A marcação deste foi realizada tanto na membrana como no citoplasma, e analisadas por citometria de fluxo. Observou-se que não houve diferença na frequência de células progenitoras hematopoéticas Lin<sup>-</sup> expressando o receptor CXCR-4 na membrana e no citoplasma (Figura 27).

Estes resultados mostram que a alteração observada na migração, adesão e no *homing* das células progenitoras hematopoéticas *Arhgap21*<sup>+/-</sup> não está relacionada à alteração da expressão de CXCR-4 ou no número de células que o expressam em consequência da deficiência de *Arhgap21*.

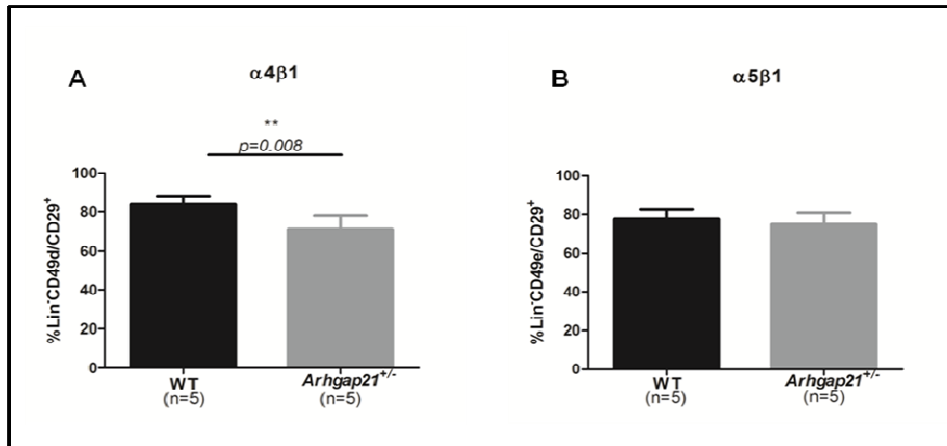


**Figura 27: Análise de CXCR-4 nas células progenitoras hematopoéticas Lin<sup>-</sup>.** A porcentagem de células progenitoras hematopoéticas que expressam CXCR-4 (Lin<sup>-</sup>CXCR-4<sup>+</sup>) não está alterada nos camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup>, tanto na membrana (WT: 72,9 ± 5,46; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>: 76,9 ± 2,89), quanto internamente (WT: 92,50 ± 2,67; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>: 93,70 ± 0,78).

### Expressão da integrina $\alpha 4\beta 1$ está reduzida nos progenitores hematopoéticos Lin<sup>-</sup>

Diante da redução observada na adesão das células progenitoras hematopoéticas à fibronectina, investigou-se se a deficiência de *Arhgap21* poderia alterar a expressão das integrinas  $\alpha 4\beta 1$  e  $\alpha 5\beta 1$ . Para tanto, células da medula óssea de camundongos selvagens e *Arhgap21*<sup>+/-</sup> foram retiradas e marcadas com anti-CD49d/CD29 ( $\alpha 4\beta 1$ ), anti-CD49e/CD29 ( $\alpha 5\beta 1$ ) e marcadores de linhagem hematopoéticas, os quais foram analisadas por citometria de fluxo.

As células progenitoras hematopoéticas *Arhgap21*<sup>+/-</sup> apresentaram redução da expressão da integrina  $\alpha 4\beta 1$  quando comparadas às selvagens (Figura 28A; WT: 83.76 ± 4.35; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>: 71.06 ± 7.00), entretanto não foi observada diferença na expressão da integrina  $\alpha 5\beta 1$  (Figura 28B; WT: 77.82 ± 4.68; 74.68 ± 6.09). Dessa forma, a adesão reduzida das células originadas dos camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> parece estar relacionada à redução da integrina  $\alpha 4\beta 1$  em consequência da deficiência de *Arhgap21*.

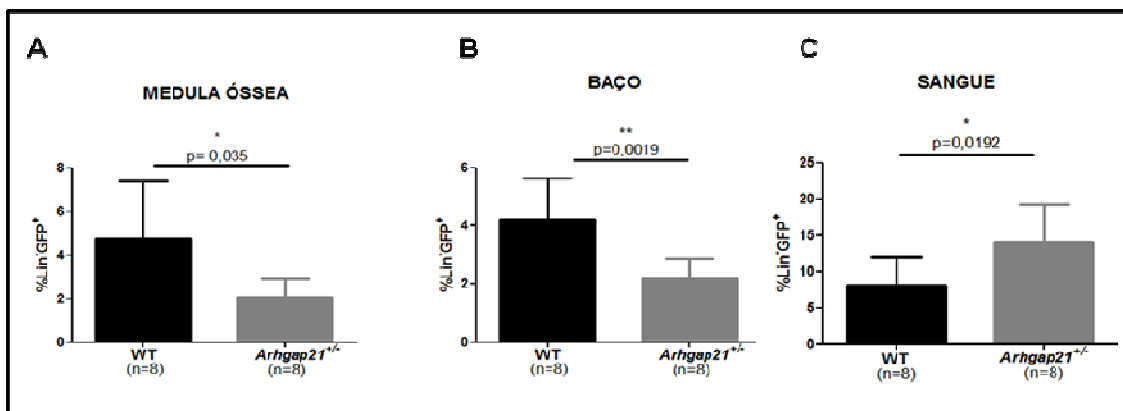


**Figura 28: Expressão de  $\alpha 4\beta 1$  as células progenitoras  $\text{Lin}^-$  de camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> está reduzida.** (A) Células Progenitoras hematopoéticas  $\text{Lin}^-$  com deficiência de *Arhgap21* apresentam redução da integrinas  $\alpha 4\beta 1$ , comparadas às selvagens (WT:  $83.76 \pm 4.35$ ; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>:  $71.06 \pm 7.00$ ). (B) Não foi observada diferença para a integrina  $\alpha 5\beta 1$  (WT:  $77.82 \pm 4.68$ ; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>:  $74.68 \pm 6.09$ ). Média  $\pm$  SD.

### **Homing para a medula óssea e para o baço dos camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> também está comprometido**

As células e fatores que compõem o nicho hematopoético são cruciais para a chegada das células progenitoras hematopoéticas na medula óssea. Dessa maneira, perguntamo-nos se poderia ocorrer alteração do *homing* de células progenitoras hematopoéticas normais para a medula óssea com redução de *Arhgap21*. Para isso, realizamos novo transplante de medula óssea, usando como animais receptores os camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> e injetamos células da medula óssea normal, obtida de camundongos GFP.

Como demonstrado na figura 29, menor porcentagem de células progenitoras hematopoéticas  $\text{Lin}^- \text{GFP}^+$  chegam na medula óssea (Figura 29A) e no baço (Figura 29B) dos camundongos receptores *Arhgap21*<sup>+/-</sup>, enquanto ficam retidas no sangue periférico. Este resultado indica que o *homing* de células progenitoras hematopoéticas também ineficaz quando a redução de *Arhgap21* está no nicho hematopoético.



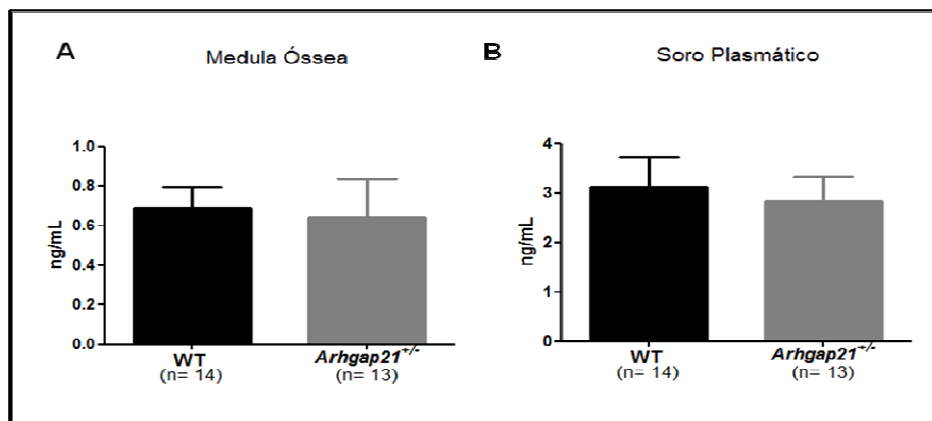
**Figura 29: O Homing das células progenitoras hematopoéticas normais para medula óssea e baço *Arhgap21*<sup>+/-</sup> é ineficaz.** A porcentagem de células progenitoras hematopoéticas do doador selvagem (GFP<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>) que chegam na medula óssea (A) (WT: 4,76 ± 2,60; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>: 2,07 ± 0,85) e no baço (B) (WT: 4,22 ± 1,39; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>: 2,17 ± 0,69) do camundongo receptor *Arhgap21*<sup>+/-</sup> é menor do que a observada no receptor selvagem. As células progenitoras ficam retidas na circulação sanguínea (C) (WT: 8,07 ± 3,85; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>: 14,07 ± 5,20). O resultado obtido foi expresso em porcentagem das células progenitoras não comprometidas (Lin<sup>-</sup>) do doador GFP<sup>+</sup>. Média ± SD .

### **A secreção de CXCL-12 na medula óssea e no soro dos camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> não está alterada**

Para verificar se a ineficiência do *homing* das células progenitoras hematopoéticas selvagens para o nicho com redução da *Arhgap21* pudesse estar relacionada com alteração da secreção de CXCL-12 na medula óssea dos camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup>, realizamos o ensaio de ELISA.

A concentração de CXCL-12 na medula óssea dos camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> não está alterada comparando-se com os camundongos selvagens (Figura 29A). O mesmo resultado foi obtido no soro plasmático (Figura 29B). Estes resultados indicam que a alteração observada no *homing* das células selvagens para a medula óssea *Arhgap21*<sup>+/-</sup> parece não estar associada à alteração na concentração desta quimiocina na medula óssea e no soro dos mesmos.



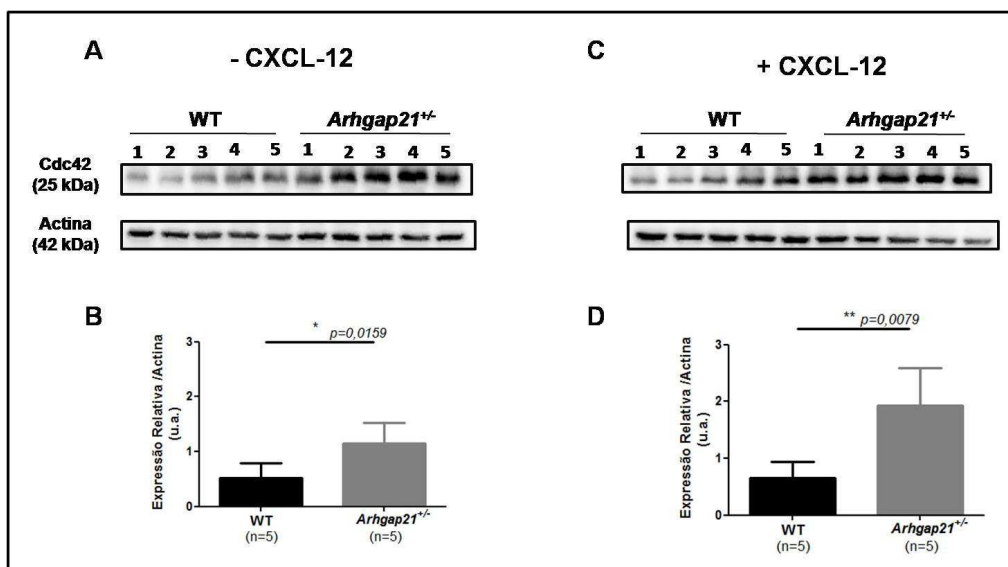


**Figura 30: Concentração de CXCL-12 na medula óssea e no soro dos camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> não está alterada.** Através de análise por ensaio de ELISA, observa-se que a concentração de CXCL-12 na medula óssea (WT: 0,68 ± 0,10; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>: 0,63 ± 0,19) e soro ( WT: 3,11 ± 0,60; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>: 2,82 ± 0,50) dos camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> não está alterada quando comparada com os camundongos selvagens. Média ± SD.

### **A expressão protéica e atividade de Cdc42 na medula óssea de camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> parece aumentada**

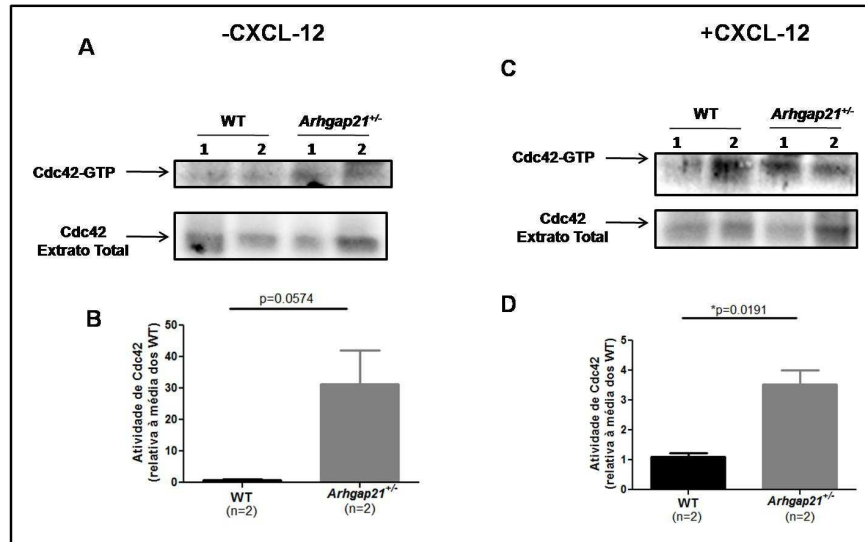
Cdc42 é uma GTPase fundamental para a dinâmica do citoesqueleto de actina e controla diversos eventos celulares na hematopoese, dentre os quais migração e adesão dos progenitores hematopoéticos [48, 49, 60, 61, 85]. A ARHGAP21 é uma RhoGAP para Cdc42 em diferentes modelos celulares [68-70, 72] e portanto, tem se mostrado importante proteína reguladora das funções biológicas mediadas por Cdc42. Nesse sentido, buscou-se avaliar se a atividade de Cdc42 estaria alterada na medula óssea de camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup>.

Observou-se aumento da expressão proteica de Cdc42 nas células da medula óssea de camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> (Figura 31 A-B; WT: 0.51 ± 0.27; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>: 1.15 ± 0.37). Este aumento também foi observado quando as células foram estimuladas com CXCL-12 (Figura 31C-D; WT: 0.65 ± 0.28; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>: 1.93 ± 0.65), indicando que a deficiência de *Arhgap21* leva ao aumento da síntese proteica da GTPase CDC42.



**Figura 31: Aumento da expressão proteica de Cdc42 na medula óssea de camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>* com ou sem estímulo de CXCL-12.** Observa-se aumento da expressão de Cdc42 tanto na ausência (A-B; WT:  $0.51 \pm 0.27$ ; *Arhgap21<sup>+/-</sup>*:  $1.15 \pm 0.37$ ) quanto na presença de CXCL-12 (C-D; WT:  $0.65 \pm 0.28$ ; *Arhgap21<sup>+/-</sup>*:  $1.93 \pm 0.65$ ) nas células da medula óssea de camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>*. A-C: correspondem ao gel de acrilamida no qual as proteínas foram fracionadas e marcadas com anticorpo anti-Cdc42. B-D: correspondem à quantificação da intensidade da banda correspondente à Cdc42 em relação à actina (controle endógeno). Média  $\pm$  desvio padrão.

A Cdc42 encontra-se ativa quando ligada a GTP e, portanto para analisar a atividade desta GTPase realizou-se um ensaio de *pull down* com a proteína recombinante efetora PAK-1 conjugada a GST. Os resultados indicam que as células da medula óssea do camundongo *Arhgap21<sup>+/-</sup>* possuem maior atividade de Cdc42 quando comparadas às selvagens, tanto na ausência (Figura 32 A-B; WT:  $1 \pm 0.2$ ; *Arhgap21<sup>+/-</sup>*:  $31.20 \pm 7.6$ ) quanto na presença (Figura 32C-D; WT:  $1 \pm 0.2$ ; *Arhgap21<sup>+/-</sup>*:  $3.54 \pm 0.32$ ) de CXCL-12.



**Figura 32: Aumento da atividade de Cdc42 na medula óssea de camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> com ou sem estímulo de CXCL-12.** Observa-se aumento da atividade de Cdc42 (Cdc42-GTP) tanto na ausência (A-B; WT: 1 ± 0.2; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>: 31.20 ± 7.6) quanto na presença de CXCL-12 (C-D; WT: 1 ± 0.2; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>: 3.54 ± 0.32) nas células da medula óssea de camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup>. A-C: correspondem ao gel de acrilamida no qual as proteínas foram fracionadas após serem submetidas ao ensaio de *pull down* e marcadas com anticorpo anti-Cdc42. B-D: correspondem à quantificação da intensidade da banda correspondente à Cdc42 em relação ao extrato total, normalizada pelos selvagens. Média ± desvio padrão.



# **Discussão**



As células-tronco e progenitoras hematopoéticas são capazes de migrar em resposta a moléculas quimiotáticas e são recrutadas para outros órgãos, onde podem proliferar e se diferenciar. Esta capacidade migratória também é observada no estado fisiológico, já que algumas células são encontradas na circulação sanguínea e em outros órgãos, como o baço. A mobilização (saída das células da medula óssea) e o *homing* (chegada da célula na medula óssea) envolvem diferentes funções celulares, tais como rearranjo do citoesqueleto, migração, adesão, ativação gênica e sobrevivência. Os mecanismos moleculares que regem essa migração ainda não estão completamente elucidados, embora muito avanço já tenha ocorrido neste campo nas últimas décadas [15, 17, 18, 25, 86].

A ARHGAP21 é uma proteína da família RhoGAP, cuja principal função é regular negativamente as RhoGTPases [62, 66] . Estas, por sua vez, são importantes proteínas reguladoras do citoesqueleto de actina, e por isso estão envolvidas na migração, no *homing*, na colonização e na mobilização das células-tronco e progenitoras hematopoéticas. Por outro lado, pouco se conhece sobre o papel das RhoGAPs na hematopoese [48].

O desenvolvimento de um modelo animal nocaute para *Arhgap21* se mostrou essencial para o estudo das funções biológicas nas quais esta proteína atua, especialmente na hematopoese. Os resultados do PCR em tempo real nos indicam que até o momento (observados três cruzamentos) não foi gerado nenhum camundongo nocaute. A padronização da genotipagem, utilizando iniciadores na sequência da *Arhgap21* e na do vetor simultaneamente, como explicado na figura 11, seria ideal para diferenciar os camundongos nocautes homozigotos (*Arhgap21<sup>-/-</sup>*) dos heterozigotos (*Arhgap21<sup>+/-</sup>*) e afirmar que não há geração do homozigoto. Caso se confirme que os nocautes não são viáveis, será realizada investigação do estágio de desenvolvimento embrionário que se daria a morte bem como as suas causas. Interessante relatar que foi observado pelo nosso grupo que há expressão gênica de *Arhgap21* desde o início do desenvolvimento do sistema nervoso do embrião e que no fígado fetal essa expressão tem um pico em E18.5 (figura 14) o que nos indica que ela possa

desempenhar alguma função durante o desenvolvimento embrionário e que a sua ausência possa acarretar em letalidade dos embriões.

Embora ainda não se possa afirmar que o animal nocaute não é gerado, iniciaram-se os estudos das funções da Arhgap21 usando como modelo os animais *Arhgap21<sup>+/-</sup>* que apresentam redução da expressão gênica e proteica de Arhgap21 (figura 20). Estes animais vivem bem em condições normais de manutenção. E os resultados de hemograma mostram que, embora haja pequenas diferenças entre estes e os selvagens, as suas taxas encontram-se dentro do esperado para linhagem C57/Bl6.

A ARHGAP21 possui atividade GAP para Cdc42, RhoA e RhoC em diferentes tipos celulares, indicando que a sua função RhoGAP parece ser célula-específica [68, 70, 73, 74]. Mas além de sua função GAP, ARHGAP21 interage com outras proteínas: PKC $\zeta$  [75], FAK [68, 75],  $\alpha$ -catenina [70],  $\beta$ -arrestina [73], ARF-1 [87],  $\alpha$ -tubulina [77] e sofre sumoilação *in vitro* por SUMO 2/3 [76]. Sendo assim, a ARHGAP21 está envolvida em diversos eventos biológicos, especialmente migração e adesão celular. Ainda não se sabe do seu envolvimento na hematopoese e por isso, buscou-se investigar os estudos da sua função na hematopoese normal, especialmente na migração e adesão celular.

Os resultados obtidos mostraram que as células progenitoras hematopoéticas da medula óssea de camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>* apresentam redução da quimotaxia induzida por CXCL-12 (Figura 22). Estes resultados indicam que as células progenitoras hematopoéticas deficientes em Arhgap21 não respondem adequadamente ao estímulo com CXCL-12, o que leva à quimiotaxia ineficaz. Os dados já publicados nos quais se estudou a migração celular após inibição de ARHGAP21 são contrários aos observados neste trabalho. Todos eles utilizaram modelos de células aderentes tumorais que apresentaram aumento da migração celular após inibição da ARHGAP21. A linhagem celular de glioblastoma humano (T98G) inibida para ARHGAP21 apresentou maior migração em ensaio de placa *transwell*, que estava associado ao aumento de secreção da MMP-2, fosforilação da FAK e maior atividade de Cdc42 [68]. Os níveis de migração



também estavam aumentados em células SW480 e DU145 (linhagens humanas de adenocarcinoma de cólon e câncer de próstata, respectivamente) depletadas para ARHGAP21. Nesta última, observou-se que a ARHGAP21 interagia com  $\alpha$ -tubulina e estava presente na porção frontal das células polarizadas após o início da migração [77]. Por fim, a inibição da ARHGAP21 em células PC3 (adenocarcinoma de próstata humano) levou ao aumento da migração celular em fibronectina, que poderia estar associado ao aumento da atividade de RhoC [74]. O papel da ARHGAP21 na migração celular parece ser específico para cada tipo de célula; enquanto em células tumorais aderentes ela parece inibir a migração, em células progenitoras hematopoéticas - células primárias não aderentes- parece ser importante para a migração das mesmas.

Pouco se sabe sobre o papel da ARHGAP21 na adesão celular. Ela é uma RhoGAP, com atividade para RhoA, RhoC e Cdc42, e interage com outras proteínas como FAK e  $\alpha$ -catenina, importantes proteínas envolvidas na adesão celular. Barcellos e colaboradores observaram que a inibição de ARHGAP21 em células SW480 (adenocarcinoma de cólon humano) levou a uma adesão célula-célula mais fraca, visto que os agregados celulares formados no ensaio de gota pendente eram defeitos após a trituração [77]. Os nossos resultados mostraram menor adesão das células progenitoras hematopoéticas com redução da Arhgap21 à fibronectina, importante componente da matriz extracelular da medula óssea (Figura 23), que pode estar associada à redução da expressão de  $\alpha 4\beta 1$  (Figura 28A). A adesão das células progenitoras hematopoéticas às células do estroma da medula bem como aos componentes da matriz extracelular é um evento crítico para a sua manutenção e hematopoese eficaz. As integrinas  $\alpha 4\beta 1$  e  $\alpha 5\beta 1$  participam principalmente da ancoragem das células progenitoras hematopoéticas ao nicho, através da ligação destas com a matriz extracelular, eventos cruciais para o *homing* e colonização adequados. Sendo assim, a Arhgap21 parece participar da adesão das células progenitoras à medula óssea, através da ligação das mesmas à fibronectina, provavelmente através da modulação da expressão da integrina  $\alpha 4\beta 1$ .

Visto que foi observada redução da quimiotaxia induzida por CXCL-12 e a adesão à fibronectina nas células progenitoras com redução de *Arhgap21*, buscou-se investigar se a capacidade destas células em realizar o *homing* para a medula óssea também estava alterada. Como esperado, foi observada uma redução das células progenitoras Lin<sup>-</sup> na medula óssea e no baço dos animais que receberam células do camundongo *Arhgap21*<sup>+/-</sup>, acompanhada por um acúmulo destas mesmas células no sangue periférico (Figura 25), indicando que o *homing* das células progenitoras hematopoéticas com redução de *Arhgap21* é ineficaz e provavelmente está relacionado à redução na capacidade migratória e de adesão destas células.

O receptor CXCR-4 e o seu ligante CXCL-12 (ou SDF-1) são a principal via de sinalização que regula a migração, a adesão e o *homing* das células progenitoras hematopoéticas e por isso a redução destas funções biológicas poderia estar relacionada a uma menor expressão do receptor na medula óssea dos camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup>. No entanto, não foi observada alteração na expressão gênica bem como na quantidade de células progenitoras que expressam CXCR-4 (Figuras 26 e 27, respectivamente), indicando que a redução na migração, na adesão e no *homing* observada não está associada à alteração do receptor CXCR-4 nas células progenitoras hematopoéticas causada pela redução da *Arhgap21*.

Os mecanismos moleculares envolvidos com a redução de *Arhgap21*, que levam à alteração da migração, adesão e *homing* das células progenitoras hematopoéticas ainda não foram elucidados. Dessa forma, outras moléculas estão envolvidas e estão sendo investigadas, dentre as quais a GTPase Cdc42, importante regulador da migração e adesão das células progenitoras hematopoéticas. Foi demonstrado que a expressão proteica de Cdc42 está aumentada nas células da medula óssea dos camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> (Figura 31). Estes dados corroboram resultado obtido em ilhotas pancreáticas de camundongos com inibição de *Arhgap21*, obtido através de sequência antissenso, no qual também foi observado aumento da expressão proteica de Cdc42 [88]. Os

primeiros resultados obtidos com ensaio de *pull down* sugerem que a atividade de Cdc42 também se encontra aumentada (Figura 32) na medula óssea dos camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>*. Sendo assim, a *Arhgap21* parece atuar como uma RhoGAP de Cdc42 também nas células da medula óssea e além disso, modula a expressão da proteína Cdc42. Diante desses resultados, pode-se supor que as alterações observadas na quimiotaxia induzida por CXCL-12, na adesão à fibronectina e no *homing* das células progenitoras hematopoéticas deficientes em *Arhgap21*, provenientes dos camundongos heterozigotos, é consequência do aumento da atividade de Cdc42.

Quanto à função das RhoGAPs na hematopoese, pouco se sabe sobre o papel que desempenham na migração, adesão e *homing* das células progenitoras hematopéticas. Animais nocautes para p190-B GAP morrem antes do nascimento [89]. O fígado fetal dos embriões nocautes para esta GAP apresenta aumento da atividade de RhoA especificamente. A hematopoese é ineficaz nestes embriões, apesar das células-tronco hematopoéticas apresentarem maior potencial de autorrenovação. Observou-se aumento da quimiotaxia induzida por CXCL-12 e da adesão à fibronectina das células-tronco/progenitoras hematopoéticas do fígado fetal dos embriões nocautes, o que levaria ao aumento do *homing* destas células [44, 58]. Mais recentemente, foi descrito p-190-B GAP é um regulador extrínseco da hematopoese, ou seja, seu papel está mais associado à formação do nicho hematopoético, de maneira que as alterações observadas nas células-tronco hematopoéticas são efeitos causados por alterações nas células e moléculas que compõem o nicho do fígado fetal na ausência desta RhoGAP [58].

Por outro lado, os animais nocautes para outra RhoGAP, a Cdc42GAP, apresentam uma taxa de mortalidade 1 semana após o nascimento de 93%; os que sobrevivem são capazes de chegar à vida adulta, mas apresentam anemia. O fígado fetal destes animais apresentou maior atividade de Cdc42 especificamente. As células-tronco e progenitoras hematopoéticas de fígado fetal dos camundongos *Cdc42GAP<sup>-/-</sup>* apresentaram redução da quimiotaxia induzida por CXCL-12 e da adesão à fibronectina. A inibição desta GAP mostrou-se importante para alteração

na colonização das células-tronco e progenitoras hematopoéticas [90]. Estes resultados são similares aos nossos e, portanto corroboram a hipótese de que o aumento da atividade de Cdc42 em consequência da deficiência de Arhgap21 possa levar às alterações celulares observadas aqui: redução da quimiotaxia e da adesão à fibronectina, e *homing* ineficaz.

A atuação de Arhgap21 também foi avaliada no *homing* de células progenitoras hematopoéticas normais para a medula óssea com redução da Arhgap21. Os resultados mostraram que a redução da Arhgap21 no nicho também leva a um *homing* ineficaz, tanto para a medula quanto para o baço, com consequente retenção destas células na circulação sanguínea (Figura 29). Assim, o mecanismo de ação da Arhgap21 no controle do *homing* das células progenitoras hematopoéticas parece ser tanto direto, através do controle direto da migração e adesão das células progenitoras hematopoéticas, quanto indireto, através da sua atuação no microambiente da medula e também do baço. No entanto, não foi observada diferença na secreção de CXCL-12 pelas células da medula óssea e no soro plasmático dos camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>* (Figura 30). Sendo assim, ineficiência do *homing* não está relacionada com a secreção de CXCL-12 na medula óssea dos camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>*.

Pela primeira vez se descreve o papel da Arhgap21 na hematopoese normal, demonstrando que é uma importante proteína para migração e adesão das células progenitoras hematopoéticas, levando à alteração da capacidade das mesmas em realizar o *homing* para a medula óssea e o baço. Além disso, a sua atuação neste processo também parece ser indireta, através de seu papel no microambiente que recebe estas células.

# *Conclusão*



- Ainda não foi possível a obtenção dos animais nocautes para *Arhgap21*, pois os resultados indicam que há letalidade durante o desenvolvimento embrionário.
- Os camundongos heterozigotos (*Arhgap21<sup>+/-</sup>*) possuem redução de na expressão gênica e proteica de *Arhgap21*.
- As células progenitoras hematopoéticas obtidas dos camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>* apresentam menor quimiotaxia induzida por CXCL-12.
- As células progenitoras *Arhgap21<sup>+/-</sup>* apresentam redução da adesão à fibronectina.
- O *homing* das células progenitoras hematopoéticas *Arhgap21<sup>+/-</sup>* para medula óssea e para o baço mostrou-se ineficiente.
- Não foi observada alteração na expressão gênica de CXCR-4 e na frequência de células progenitoras hematopoéticas expressando este receptor nos camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>*.
- Observou-se aumento da expressão protéica de Cdc42 nas células da medula óssea dos camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>*, além de indicação do aumento da sua atividade.
- O *homing* das células progenitoras hematopoéticas selvagens para a medula óssea e baço *Arhgap21<sup>+/-</sup>* também se encontra reduzido.
- Não foi observada alteração na produção de CXCL-12 na medula óssea e no soro dos camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>*.

Este é o primeiro estudo que demonstra algum aspecto funcional da *Arhgap21* na hematopoese normal, sugerindo que esta proteína é importante para a migração, adesão e *homing* das células progenitoras hematopoéticas, eventos cruciais para a homeostasia do sistema hematopoético.





**Referências**  
**Bibliográficas**



1. Rieger, M. A. and Schroeder, T., *Hematopoiesis*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2012. **4**(12).
2. Ottersbach, K. and Dzierzak, E., *The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region*. Developmental Cell, 2005. **8**(3): p. 377-387.
3. Medvinsky, A., Rybtsov, S., and Taoudi, S., *Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions*. Development, 2011. **138**(6): p. 1017-1031.
4. Ottersbach, K., Smith, A., Wood, A., and Gottgens, B., *Ontogeny of haematopoiesis: recent advances and open questions*. British Journal of Haematology, 2010. **148**(3): p. 343-355.
5. Cao, H. M., Oteiza, A., and Nilsson, S. K., *Understanding the role of the microenvironment during definitive hemopoietic development*. Experimental Hematology, 2013. **41**(9): p. 761-768.
6. Morrison, S. J. and Scadden, D. T., *The bone marrow niche for haematopoietic stem cells*. Nature, 2014. **505**(7483): p. 327-34.
7. Wilson, A. and Trumpp, A., *Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(2): p. 93-106.
8. Kunisaki, Y., Bruns, I., Scheiermann, C., Ahmed, J., Pinho, S., Zhang, D. C., et al., *Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence*. Nature, 2013. **502**(7473): p. 637-+.
9. Park, D., Spencer, J. A., Koh, B. I., Kobayashi, T., Fujisaki, J., Clemens, T. L., et al., *Endogenous Bone Marrow MSCs Are Dynamic, Fate-Restricted*

- Participants in Bone Maintenance and Regeneration*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(3): p. 259-272.
10. Zhang, J. W., Niu, C., Ye, L., Huang, H. Y., He, X., Tong, W. G., et al., *Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 836-841.
  11. Ellis, S. L., Grassinger, J., Jones, A., Borg, J., Camenisch, T., Haylock, D., et al., *The relationship between bone, hemopoietic stem cells, and vasculature*. Blood, 2011. **118**(6): p. 1516-1524.
  12. Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., et al., *Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment*. Cell, 2007. **131**(2): p. 324-336.
  13. Ding, L. and Morrison, S. J., *Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches*. Nature, 2013. **495**(7440): p. 231-235.
  14. Kaplan, R. N., Psaila, B., and Lyden, D., *Niche-to-niche migration of bone-marrow-derived cells*. Trends Mol Med, 2007. **13**(2): p. 72-81.
  15. Sahin, A. O. and Buitenhuis, M., *Molecular mechanisms underlying adhesion and migration of hematopoietic stem cells*. Cell Adh Migr, 2012. **6**(1): p. 39-48.
  16. Yin, T. and Li, L., *The stem cell niches in bone*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1195-201.

17. Wright, D. E., Wagers, A. J., Gulati, A. P., Johnson, F. L., and Weissman, I. L., *Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1933-6.
18. Papayannopoulou, T., *Bone marrow homing: the players, the playfield, and their evolving roles*. Current Opinion in Hematology, 2003. **10**(3): p. 214-9.
19. Levesque, J. P., Hendy, J., Takamatsu, Y., Simmons, P. J., and Bendall, L. J., *Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide*. J Clin Invest, 2003. **111**(2): p. 187-96.
20. Brenner, S., Whiting-Theobald, N., Kawai, T., Linton, G. F., Rudikoff, A. G., Choi, U., et al., *CXCR4-transgene expression significantly improves marrow engraftment of cultured hematopoietic stem cells*. Stem Cells, 2004. **22**(7): p. 1128-33.
21. Broxmeyer, H. E., Orschell, C. M., Clapp, D. W., Hangoc, G., Cooper, S., Plett, P. A., et al., *Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist*. Journal of Experimental Medicine, 2005. **201**(8): p. 1307-1318.
22. Peled, A., Petit, I., Kollet, O., Magid, M., Ponomaryov, T., Byk, T., et al., *Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4*. Science, 1999. **283**(5403): p. 845-848.
23. Mendez-Ferrer, S., Chow, A., Merad, M., and Frenette, P. S., *Circadian rhythms influence hematopoietic stem cells*. Current Opinion in Hematology, 2009. **16**(4): p. 235-242.

24. Massberg, S., Schaerli, P., Knezevic-Maramica, I., Kollnberger, M., Tubo, N., Moseman, E. A., et al., *Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues*. *Cell*, 2007. **131**(5): p. 994-1008.
25. Lapidot, T., Dar, A., and Kollet, O., *How do stem cells find their way home?* *Blood*, 2005. **106**(6): p. 1901-10.
26. Sharma, M., Afrin, F., Satija, N., Tripathi, R. P., and Gangenahalli, G. U., *Stromal-derived factor-1/CXCR4 signaling: indispensable role in homing and engraftment of hematopoietic stem cells in bone marrow*. *Stem Cells and Development*, 2011. **20**(6): p. 933-46.
27. Greenbaum, A., Hsu, Y. M., Day, R. B., Schuettpelz, L. G., Christopher, M. J., Borgerding, J. N., et al., *CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance*. *Nature*, 2013. **495**(7440): p. 227-30.
28. Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T., *Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches*. *Immunity*, 2006. **25**(6): p. 977-88.
29. Schajnovitz, A., Itkin, T., D'Uva, G., Kalinkovich, A., Golan, K., Ludin, A., et al., *CXCL12 secretion by bone marrow stromal cells is dependent on cell contact and mediated by connexin-43 and connexin-45 gap junctions*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(5): p. 391-8.
30. Hattori, K., Heissig, B., Tashiro, K., Honjo, T., Tateno, M., Shieh, J. H., et al., *Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells*. *Blood*, 2001. **97**(11): p. 3354-60.

31. Sweeney, E. A., Lortat-Jacob, H., Priestley, G. V., Nakamoto, B., and Papayannopoulou, T., *Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells*. Blood, 2002. **99**(1): p. 44-51.
32. Carstanjen, D., Gross, A., Kosova, N., Fichtner, I., and Salama, A., *The alpha4beta1 and alpha5beta1 integrins mediate engraftment of granulocyte-colony-stimulating factor-mobilized human hematopoietic progenitor cells*. Transfusion, 2005. **45**(7): p. 1192-200.
33. Peled, A., Kollet, O., Ponomaryov, T., Petit, I., Franitza, S., Grabovsky, V., et al., *The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice*. Blood, 2000. **95**(11): p. 3289-96.
34. Goichberg, P., Kalinkovich, A., Borodovsky, N., Tesio, M., Petit, I., Nagler, A., et al., *cAMP-induced PKCzeta activation increases functional CXCR4 expression on human CD34+ hematopoietic progenitors*. Blood, 2006. **107**(3): p. 870-9.
35. Petit, I., Goichberg, P., Spiegel, A., Peled, A., Brodie, C., Seger, R., et al., *Atypical PKC-zeta regulates SDF-1-mediated migration and development of human CD34+ progenitor cells*. J Clin Invest, 2005. **115**(1): p. 168-76.
36. Wang, J. F., Park, I. W., and Grooman, J. E., *Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C*. Blood, 2000. **95**(8): p. 2505-13.

37. Bug, G., Rossmanith, T., Henschler, R., Kunz-Schughart, L. A., Schroder, B., Kampfmann, M., et al., *Rho family small GTPases control migration of hematopoietic progenitor cells into multicellular spheroids of bone marrow stroma cells*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(4): p. 837-45.
38. Cancelas, J. A., Lee, A. W., Prabhakar, R., Stringer, K. F., Zheng, Y., and Williams, D. A., *Rac GTPases differentially integrate signals regulating hematopoietic stem cell localization*. Nature Medicine, 2005. **11**(8): p. 886-891.
39. Fuhler, G. M., Drayer, A. L., Olthof, S. G. M., Schuringa, J. J., Coffey, P. J., and Vellenga, E., *Reduced activation of protein kinase B, Rac, and F-actin polymerization contributes to an impairment of stromal cell-derived factor-1-induced migration of CD34(+) cells from patients with myelodysplasia*. Blood, 2008. **111**(1): p. 359-368.
40. Ghiaur, G., Lee, A., Bailey, J., Cancelas, J. A., Zheng, Y., and Williams, D. A., *Inhibition of RhoA GTPase activity enhances hematopoietic stem and progenitor cell proliferation and engraftment*. Blood, 2006. **108**(6): p. 2087-94.
41. Gottig, S., Mobest, D., Ruster, B., Grace, B., Winter, S., Seifried, E., et al., *Role of the monomeric GTPase Rho in hematopoietic progenitor cell migration and transplantation*. Eur J Immunol, 2006. **36**(1): p. 180-9.
42. Gu, Y., Jasti, A. C., Jansen, M., and Siefring, J. E., *RhoH, a hematopoietic-specific Rho GTPase, regulates proliferation, survival, migration, and engraftment of hematopoietic progenitor cells*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1467-75.



43. Henschler, R., Piiper, A., Bistran, R., and Mobest, D., *SDF-1alpha-induced intracellular calcium transient involves Rho GTPase signalling and is required for migration of hematopoietic progenitor cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **311**(4): p. 1067-71.
44. Xu, H. M., Eleswarapu, S., Geiger, H., Szczur, K., Daria, D., Zheng, Y., et al., *Loss of the Rho GTPase activating protein p190-B enhances hematopoietic stem cell engraftment potential*. *Blood*, 2009. **114**(17): p. 3557-3566.
45. Yang, F. C., Atkinson, S. J., Gu, Y., Borneo, J. B., Roberts, A. W., Zheng, Y., et al., *Rac and Cdc42 GTPases control hematopoietic stem cell shape, adhesion, migration, and mobilization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(10): p. 5614-8.
46. Yang, L., Wang, L., Geiger, H., Cancelas, J. A., Mo, J., and Zheng, Y., *Rho GTPase Cdc42 coordinates hematopoietic stem cell quiescence and niche interaction in the bone marrow*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. **104**(12): p. 5091-5096.
47. Heasman, S. J. and Ridley, A. J., *Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008. **9**(9): p. 690-701.
48. Mulloy, J. C., Cancelas, J. A., Filippi, M. D., Kalfa, T. A., Guo, F., and Zheng, Y., *Rho GTPases in hematopoiesis and hemopathies*. *Blood*, 2010. **115**(5): p. 936-47.
49. Cancelas, J. A. and Williams, D. A., *Rho GTPases in hematopoietic stem cell functions*. *Current Opinion in Hematology*, 2009. **16**(4): p. 249-54.

50. Hakoshima, T., Shimizu, T., and Maesaki, R., *Structural basis of the Rho GTPase signaling*. J Biochem, 2003. **134**(3): p. 327-31.
51. van Helden, S. F., Anthony, E. C., Dee, R., and Hordijk, P. L., *Rho GTPase expression in human myeloid cells*. Plos One, 2012. **7**(8): p. e42563.
52. Williams, D. A., Zheng, Y., and Cancelas, J. A., *Rho GTPases and regulation of hematopoietic stem cell localization*. Methods Enzymol, 2008. **439**: p. 365-93.
53. Sweet, J. J., Peck, E. A., 3rd, Abramowitz, C., and Etzweiler, S., *National Academy of Neuropsychology/Division 40 of the American Psychological Association practice survey of clinical neuropsychology in the United States, Part I: practitioner and practice characteristics, professional activities, and time requirements*. Clin Neuropsychol, 2002. **16**(2): p. 109-27.
54. del Pozo, M. A., Vicente-Manzanares, M., Tejedor, R., Serrador, J. M., and Sanchez-Madrid, F., *Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes*. Eur J Immunol, 1999. **29**(11): p. 3609-20.
55. Jansen, M., Yang, F. C., Cancelas, J. A., Bailey, J. R., and Williams, D. A., *Rac2-deficient hematopoietic stem cells show defective interaction with the hematopoietic microenvironment and long-term engraftment failure*. Stem Cells, 2005. **23**(3): p. 335-346.
56. Gu, Y., Filippi, M. D., Cancelas, J. A., Siefring, J. E., Williams, E. P., Jasti, A. C., et al., *Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases*. Science, 2003. **302**(5644): p. 445-9.

57. Zhou, X., Florian, M. C., Arumugam, P., Chen, X. Y., Cancelas, J. A., Lang, R., et al., *RhoA GTPase controls cytokinesis and programmed necrosis of hematopoietic progenitors*. *Journal of Experimental Medicine*, 2013. **210**(11): p. 2371-2385.
58. Raman, R., Kumar, R. S., Hinge, A., Kumar, S., Nayak, R., Xu, J., et al., *p190-B RhoGAP regulates the functional composition of the mesenchymal microenvironment*. *Leukemia*, 2013. **27**(11): p. 2209-19.
59. Xing, Z., Ryan, M. A., Daria, D., Nattamai, K. J., Van Zant, G., Wang, L., et al., *Increased hematopoietic stem cell mobilization in aged mice*. *Blood*, 2006. **108**(7): p. 2190-7.
60. Florian, M. C., Dorr, K., Niebel, A., Daria, D., Schrezenmeier, H., Rojewski, M., et al., *Cdc42 activity regulates hematopoietic stem cell aging and rejuvenation*. *Cell Stem Cell*, 2012. **10**(5): p. 520-30.
61. Wang, L., Yang, L., Filippi, M. D., Williams, D. A., and Zheng, Y., *Genetic deletion of Cdc42GAP reveals a role of Cdc42 in erythropoiesis and hematopoietic stem/progenitor cell survival, adhesion, and engraftment*. *Blood*, 2006. **107**(1): p. 98-105.
62. Tcherkezian, J. and Lamarche-Vane, N., *Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins*. *Biol Cell*, 2007. **99**(2): p. 67-86.
63. Chiang, S. H., Hwang, J., Legendre, M., Zhang, M., Kimura, A., and Saltiel, A. R., *TCGAP, a multidomain Rho GTPase-activating protein involved in insulin-stimulated glucose transport*. *EMBO J*, 2003. **22**(11): p. 2679-91.

64. Yao, L., Janmey, P., Frigeri, L. G., Han, W., Fujita, J., Kawakami, Y., et al., *Pleckstrin homology domains interact with filamentous actin*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(28): p. 19752-61.
65. Saras, J. and Heldin, C. H., *PDZ domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**(12): p. 455-8.
66. Basseres, D. S., Tizzei, E. V., Duarte, A. A., Costa, F. F., and Saad, S. T., *ARHGAP10, a novel human gene coding for a potentially cytoskeletal Rho-GTPase activating protein*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **294**(3): p. 579-85.
67. Carles, A., Millon, R., Cromer, A., Ganguli, G., Lemaire, F., Young, J., et al., *Head and neck squamous cell carcinoma transcriptome analysis by comprehensive validated differential display*. Oncogene, 2006. **25**(12): p. 1821-31.
68. Bigarella, C. L., Borges, L., Costa, F. F., and Saad, S. T., *ARHGAP21 modulates FAK activity and impairs glioblastoma cell migration*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(5): p. 806-16.
69. Dubois, T., Paleotti, O., Mironov, A. A., Fraisier, V., Stradal, T. E., De Matteis, M. A., et al., *Golgi-localized GAP for Cdc42 functions downstream of ARF1 to control Arp2/3 complex and F-actin dynamics*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(4): p. 353-64.
70. Sousa, S., Cabanes, D., Archambaud, C., Colland, F., Lemichez, E., Popoff, M., et al., *ARHGAP10 is necessary for alpha-catenin recruitment at adherens junctions and for Listeria invasion*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(10): p. 954-60.

71. Hehnly, H., Longhini, K. M., Chen, J. L., and Stamnes, M., *Retrograde Shiga toxin trafficking is regulated by ARHGAP21 and Cdc42*. *Mol Biol Cell*, 2009. **20**(20): p. 4303-12.
72. Schultz, M. L., Tecedor, L., Stein, C. S., Stamnes, M. A., and Davidson, B. L., *CLN3 deficient cells display defects in the ARF1-Cdc42 pathway and actin-dependent events*. *Plos One*, 2014. **9**(5): p. e96647.
73. Anthony, D. F., Sin, Y. Y., Vadrevu, S., Advant, N., Day, J. P., Byrne, A. M., et al., *beta-Arrestin 1 inhibits the GTPase-activating protein function of ARHGAP21, promoting activation of RhoA following angiotensin II type 1A receptor stimulation*. *Mol Cell Biol*, 2011. **31**(5): p. 1066-75.
74. Lazarini, M., Traina, F., Machado-Neto, J. A., Barcellos, K. S., Moreira, Y. B., Brandao, M. M., et al., *ARHGAP21 is a RhoGAP for RhoA and RhoC with a role in proliferation and migration of prostate adenocarcinoma cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1832**(2): p. 365-74.
75. Borges, L., Bigarella, C. L., Baratti, M. O., Crosara-Alberto, D. P., Joazeiro, P. P., Franchini, K. G., et al., *ARHGAP21 associates with FAK and PKCzeta and is redistributed after cardiac pressure overload*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **374**(4): p. 641-6.
76. Bigarella, C. L., Ferro, K. P., Barcellos, K. S., Martins-de-Souza, D., Traina, F., Novello, J. C., et al., *Post-translational modification of the RhoGTPase activating protein 21, ARHGAP21, by SUMO2/3*. *FEBS Lett*, 2012. **586**(19): p. 3522-8.
77. Barcellos, K. S., Bigarella, C. L., Wagner, M. V., Vieira, K. P., Lazarini, M., Langford, P. R., et al., *ARHGAP21 protein, a new partner of alpha-tubulin involved in cell-cell adhesion formation and essential for epithelial-*

- mesenchymal transition*. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(4): p. 2179-89.
78. Aspenstrom, P., Ruusala, A., and Pacholsky, D., *Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho GTPases*. Experimental Cell Research, 2007. **313**(17): p. 3673-9.
  79. Consortium, I. G. T. *Gene Trap Tutorial*. 2010; Available from: <http://www.genetrap.org/tutorials/overview.html>.
  80. Lazarini, M. Estudo funcional da proteína ARHGAP21 em células endoteliais e de câncer de próstata [Tese de doutorado] Campinas Universidade de Campinas 2010
  81. Ren, X. D. and Schwartz, M. A., *Determination of GTP loading on Rho. Regulators and Effectors of Small Gtpases, Pt D*, 2000. **325**: p. 264-272.
  82. Bigarella, C. L. Análise da expressão e da função de ARHGAP21 em sistema nervoso normal e neoplásico [Tese de doutorado] Campinas Unicamp 2009
  83. Laboratory, T. J. *JAX<sup>R</sup> Mice database*. 2014 [cited 2014 20/04/2014]; Available from: <http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>.
  84. Filip, S., Mokry, J., Vavrova, J., Cizkova, D., Sinkorova, Z., Micuda, S., et al., *Splenectomy Influences Homing of Transplanted Stem Cells in Bone Marrow-Ablated Mice*. Stem Cells and Development, 2012. **21**(5): p. 702-709.
  85. Yang, L., Wang, L., Geiger, H., Cancelas, J. A., Mo, J., and Zheng, Y., *Rho GTPase Cdc42 coordinates hematopoietic stem cell quiescence and niche*

- interaction in the bone marrow*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(12): p. 5091-6.
86. Schroeder, M. A. and DiPersio, J. F., *Mobilization of hematopoietic stem and leukemia cells*. J Leukoc Biol, 2012. **91**(1): p. 47-57.
87. Menetrey, J., Perderiset, M., Cicolari, J., Dubois, T., Elkhatib, N., El Khadali, F., et al., *Structural basis for ARF1-mediated recruitment of ARHGAP21 to Golgi membranes*. EMBO J, 2007. **26**(7): p. 1953-62.
88. Ferreira, S. M. Arhgap21 inibe a secreção de insulina estimulada por glicose através da modulação de FAK, Cdc42 e PKCζ. [Tese de doutorado] Campinas Universidade Estadual de Campinas 2011
89. Sordella, R., Classon, M., Hu, K. Q., Matheson, S. F., Brouns, M. R., Fine, B., et al., *Modulation of CREB activity by the Rho GTPase regulates cell and organism size during mouse embryonic development*. Developmental Cell, 2002. **2**(5): p. 553-65.
90. Wang, L., Yang, L. D., Filippi, M. D., Williams, D. A., and Zheng, Y., *Genetic deletion of Cdc42GAP reveals a role of Cdc42 in erythropoiesis and hematopoietic stem/progenitor cell survival, adhesion, and engraftment*. Blood, 2006. **107**(1): p. 98-105.