

Diana Santos Branco

**“Análise funcional de novos genes candidatos
durante a diferenciação eritroide”**

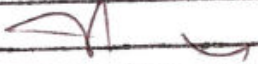
**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

DIANA SANTOS BRANCO

**“Análise funcional de novos genes candidatos durante a
diferenciação eritroide”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
DIANA SANTOS BRANCO

e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa
Coorientador: Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

**CAMPINAS,
2013**

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

B732a	<p>Branco, Diana Santos, 1983- Análise funcional de novos genes candidatos durante a diferenciação eritroide / Diana Santos Branco. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.</p> <p>Orientador: Fernando Ferreira Costa. Coorientador: Anderson Ferreira da Cunha. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Análise serial da expressão gênica. 2. Eritropoese. 3. Silenciamento gênico. 4. Cultura de células. 5. Danio rerio. I. Costa, Fernando Ferreira, 1950-. II. Cunha, Anderson Ferreira da. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Functional analysis of new candidate genes involved in erithropoiesis

Palavras-chave em Inglês:

Serial analysis of gene expression (SAGE)

Erithropoiesis

Gene silencing

Cell culture

Danio rerio

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Fernando Ferreira Costa [Orientador]

Barry Htin Paw

Gisele Wally Braga Colleoni

José Xavier Neto

Maria Stella Figueiredo

Mônica Barbosa de Melo

Erich Vinicius de Paula

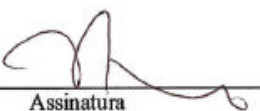
Data da defesa: 31-01-2013

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 31 de janeiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa (Orientador)


Assinatura

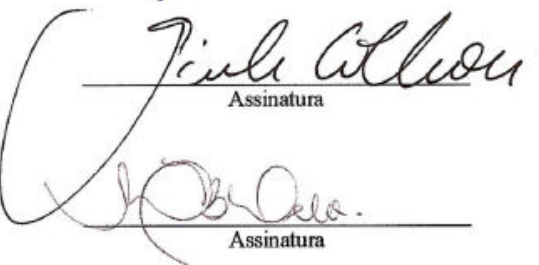
Prof. Dr. Barry Paw


Assinatura

Prof. Dr. José Xavier Neto


Assinatura

Profa. Dra. Gisele Wally Braga Colleoni


Assinatura

Profa. Dra. Monica Barbosa de Melo


Assinatura

Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo


Assinatura

Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Assinatura

Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Assinatura

“O sucesso é o inimigo do sucesso futuro.”
- Gary Kasparov

“O que a vida quer da gente é coragem.”
- Riobaldo, *Grande Sertão: Veredas*

Dedicatória

Dedico esta tese à pessoa mais forte,
justa, adorável e sábia que conheço,
minha querida mãezinha.

Agradecimentos

Ao Prof. Fernando, pela oportunidade, paciência e, sobretudo, pelos ensinamentos. A correnteza foi forte, mas sua ajuda permitiu que me mantivesse firme nas tórridas águas da ciência. Ao meu grande mentor, meu mais sincero obrigado. Contudo, as chances de me fazer usar a camiseta do seu time sofreram *knockdown* por *morpholino*, ou melhor, *Knockout* por *zinc finger* nucleases.

Ao Dr. Barry Paw, que me recebeu tão calorosamente em uma terra gélida e distante. Que me ensinou a ser crítica cientificamente e me fez acreditar que poderia levar grandes profissionais da ciência à “terra prometida”. Obrigada por me proporcionar um dos maiores e melhores aprendizados da minha vida.

Ao Anderson, meu coorientador, que me deixou com essa “bomba” nas mãos e possibilitou meu crescimento como aluna. Obrigada pelas discussões de resultados por *Skype*, correções de relatórios e por se dedicar à sua aluna, mesmo estando distante.

Aos membros da Banca Prévia, Dr. Erich Vinicius de Paula e Dr. Andrès Yunes, pela participação, críticas e excelente discussão.

Aos membros da Banca (ou Giga Banca), Dra. Gisele Colleoni, Dra. Maria Stella Figueiredo, Dra. Mônica Barbosa de Melo, Dr. Erich Vinicius de Paula, Dr. José Xavier Neto e Dr. Barry Paw, pela participação e críticas.

Aos meus queridos pais, Maria Aparecida e João, meus pilares de sustentação, aqueles a quem, simplesmente, devo minha vida.

Ao meu amado irmãozinho Glauco, que mais parece meu irmãozão mais velho, que está ao meu lado sempre, em quem me espelho todos os dias, te amo gordinho.

Ao Alexandre, meu companheiro querido e grande amigo. Aquela pessoa que te faz crescer pessoalmente e profissionalmente, que tem sempre um dado estatístico que fundamente sua teoria, mesmo que seja essa, torcer pela Lusa, a quem tenho profunda admiração e respeito. Agradeço a Deus todos os dias por ter você ao meu lado.

Ao meu querido amigo Felipepe Precog Horácio Filho (nome para publicação), a quem pretendo dar uma bicicleta de presente por toda a ajuda psicológica e técnica prestada.

Ao estimado Jacky “the Hobbit” Chung. Quem diria que me tornaria amiga de um canadense de Hong Kong em Boston. Além das inúmeras contribuições no laboratório, também me ensinou a esplêndida dieta de Ben & Jerry. Poder contar com você como amigo e companheiro crítico de trabalho é magnífico. “*Injectum momentum!*”, “*Are you talking to me or to the box?*”

Ao Andrey, Dulcinéia (e agregado Brutus), Carol Lanaro e Kleber. Obrigada pelo tempo dedicado aos meus experimentos, relatórios, apresentações e a essa tese. A ajuda de vocês foi essencial nessa caminhada (ou maratona).

Aos companheiros do laboratório de Hemoglobina e Genoma, Venina, Angélica, Tatiana, Marília, todas as Flávias (Ana Flávia, Flávia Leonardo, Flávia Lopes, Flávia Palis, quando você não souber o nome de alguém do lab chuta Flávia, que existe 50% de chance de acertar), Cíntia.docouto, Camila, Maria Emília, Regiane, Daniela, Daiana, Carol Ayumi, Thaís com Th e acento, Renata, Vanessa, Telmina, Liciania, Lediania, Carla, Irene, Ana Leda, Sheley, Adriana, Simone e Lena e a nossa grande pesquisadora, Nicola Conran.

Aos companheiros do Paw’s Lab, Gordon, Jeff, Jacky, Yvette, Caiyong, Dhvanit, Jason , Chris Lawrence e Joe Arthur, vocês foram fantásticos.

À FAPESP, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro a este trabalho.

Índice de Figuras

Figura 1. Estágios da hematopoese em camundongo.....	19
Figura 2. Fatores de transcrição requeridos para a hematopoese.....	20
Figura 3. Etapas da diferenciação eritroide.....	23
Figura 4. Visão global da eritropoese: regulação da eritropoese por complexos multiproteicos, hormônios e micro-RNAs.....	24
Figura 5. Esquema da Hemoglobina humana adulta (HbA), organização estrutural genômica dos loci da α -globina e β -globina humanos e expressão dos vários tipos de hemoglobina ao longo do desenvolvimento.....	26
Figura 6. Expressão das diferentes cadeias globínicas durante o desenvolvimento ontogenético normal.....	26
Figura 7. Células coletadas nos dias 7, 10 e 13 de cultura de células CD34 ⁺	30
Figura 8. <i>Dot plots</i> de citometria de fluxo, mostrando maturação das células eritroides.....	31
Figura 9. Células eritroleucêmicas K562 e seu composto indutor da diferenciação eritroide, Hemina.....	33
Figura 10. Desenvolvimento hematopoético em <i>zebrafish</i>	35
Figura 11. Comparação da hematopoese entre as espécies de vertebrados.....	36
Figura 12. Estrutura do <i>Morpholino</i> e aplicação da microinjeção.....	40
Figura 13. Geração e caracterização da linhagem de <i>zebrafish</i> LCR:GFP.....	41
Figura 14. Esquema do gene <i>EYA3</i> humano.....	43
Figura 15. Esquema do gene humano <i>HES6</i>	44
Figura 16. Esquema do gene <i>LXN</i>	45
Figura 17. Esquema que representa a cultura de células CD34 ⁺	54
Figura 18. Esquema que representa a cultura de células K562 e tratamento com Hemina.....	56
Figura 19. Mecanismo de ação da interferência de RNA a partir de shRNAs.....	58
Figura 20. Transdução de lentivírus em células K562, Espinoculação.....	59
Figura 21. Padrão de expressão dos genes <i>EYA3</i> e <i>LXN</i> nos dias 7, 10 e 13 da cultura de células CD34 ⁺ de 3 indivíduos controles diferentes.....	71
Figura 22. Padrão de expressão dos genes <i>EYA3</i> e <i>LXN</i> em linhagem de células K562 induzidas com Hemina.....	72
Figura 23. Padrão de expressão dos genes <i>EYA3</i> e <i>LXN</i> por qRT-PCR em linhagem de células K562 controle, silenciadas para o gene <i>EYA3</i> ou <i>LXN</i>	73
Figura 24. ShRNAs específicos para <i>EYA3</i> e <i>LXN</i> mediados por lentivírus resultaram no silenciamento efetivo de <i>EYA3</i> e <i>LXN</i> em células K562.....	74
Figura 25. Padrão de expressão dos genes <i>EYA3</i> e <i>LXN</i> por qRT-PCR em linhagem de células K562 controle, silenciadas para o gene <i>EYA3</i> ou <i>LXN</i> e tratadas com Hemina.....	75
Figura 26. Padrão de expressão do gene da alfa globina por qRT-PCR em linhagem de células K562 controle, silenciadas para o genes <i>EYA3</i> ou <i>LXN</i> e tratadas com Hemina.....	77
Figura 27. Padrão de expressão do gene da gama globina por qRT-PCR em linhagem de células K562 controle, silenciadas para o genes <i>EYA3</i> ou <i>LXN</i> e tratadas com Hemina.....	78
Figura 28. Padrão de expressão de HbF por citometria de fluxo em linhagem de células K562 controle, silenciadas para o genes <i>EYA3</i> ou <i>LXN</i> e tratadas com Hemina.....	79
Figura 29. Candidatos homólogos em <i>zebrafish</i> para gene humano <i>EYA3</i>	81
Figura 30. Candidatos homólogos em <i>zebrafish</i> para gene humano <i>HES6</i>	82
Figura 31. Candidato homólogo em <i>zebrafish</i> para gene humano <i>LXN</i>	83

Figura 32. Padrão de expressão dos genes <i>EYA3</i> , <i>HES6</i> e <i>LXN</i> em diferentes tipos celulares de <i>Homo sapiens</i> .	86
Figura 33. Análise da expressão do gene <i>lxn</i> em população de embriões de <i>Danio rerio</i> 24hpf.	86
Figura 34. Relação filogenética entre os genes homólogos de <i>Danio rerio</i> , <i>Mus musculus</i> e <i>Homo sapiens</i> dos genes <i>EYA3</i> , <i>HES6</i> e <i>LXN</i> .	88
Figura 35. Análise do padrão de expressão dos genes <i>eya1</i> , <i>eya3</i> , <i>eya4</i> em embriões de <i>Danio rerio</i> 24hpf.	89
Figura 36. Análise do padrão de expressão dos genes <i>hes6</i> e <i>hes13</i> em embriões de <i>Danio rerio</i> 24hpf.	90
Figura 37. Análise do padrão de expressão do gene <i>lxn</i> em embriões de <i>Danio rerio</i> 24hpf.	92
Figura 38. Análise da expressão do padrão de hemoglobinação e quantificação de eritrócitos em <i>zebrafish</i> 72hpf injetados e não injetados com o <i>lxn-morpholino</i> .	94
Figura 39. Quantificação de eritrócitos em embriões de <i>zebrafish</i> 48hpf injetados e não injetados com o <i>lxn-morpholino</i> .	95
Figura 40. Padrão de expressão dos genes marcadores eritroides Band3, ALAS2 e Mitoferrina por qRT-PCR em linhagem de células K562 controle, silenciadas para o gene <i>LXN</i> e tratadas com Hemina.	97
Figura 41. Padrão de expressão do gene <i>RUNX-1</i> por qRT-PCR em linhagem de células K562 controle, silenciadas para o gene <i>LXN</i> e tratadas com Hemina ou AraC.	98
Figura 42. Análise quantitativa da expressão dos genes <i>EYA3</i> e <i>LXN</i> em reticulócitos de indivíduos controles normais e pacientes SS.	99
Figura 43. Padrão de expressão dos genes <i>EYA3</i> e <i>LXN</i> em reticulócitos de indivíduos controles normais e pacientes TI.	100
Figura 44. Análise do padrão de expressão dos genes <i>clpx1</i> e <i>clpx2</i> em embriões de <i>Danio rerio</i> 24hpf.	101
Figura 45. Análise da expressão do padrão de hemoglobinação e quantificação de eritrócitos em <i>zebrafish</i> 72hpf injetados e não injetados com o <i>clpx1-morpholino</i> .	102
Figura 46. Análise da expressão do padrão de hemoglobinação em <i>zebrafish</i> 72hpf injetados e não injetados com o <i>clpx2-morpholino</i> .	103
Figura 47. Relação filogenética entre os genes homólogos de <i>Danio rerio</i> , <i>Mus musculus</i> e <i>Homo sapiens</i> do gene <i>Trak2</i> .	104
Figura 48. Análise do padrão de expressão dos genes candidatos <i>trak2</i> , <i>trak1.1</i> , <i>trak1.2</i> e <i>trak1.3</i> em embriões de <i>Danio rerio</i> com 20 somitos e 24hpf.	106
Figura 49. Análise do padrão de expressão do gene candidato <i>trak1.1</i> em embriões de <i>Danio rerio</i> 24hpf.	107
Figura 50. Análise da expressão do padrão de hemoglobinação em <i>zebrafish</i> 72hpf injetados e não injetados com o <i>trak1.1-morpholino</i> .	108
Figura 51. Relação filogenética entre os genes da família dos fatores de transcrição <i>Gfi</i> em <i>Danio rerio</i> , <i>Mus musculus</i> e <i>Homo sapiens</i> .	109
Figura 52. Análise do padrão de expressão dos genes <i>gf1aa</i> e <i>gf1b</i> durante as hematopoeses primitiva e definitiva em embriões de <i>Danio rerio</i> .	111
Figura 53. Análise do padrão de hemoglobinação em embriões de <i>zebrafish</i> nos estágios 48, 72 e 120hpf injetados e não injetados com o <i>gf1aa</i> e/ou <i>gf1ab-morpholino</i> .	112
Figura 54. O gene <i>gf1a</i> regula a fase primitiva da hematopoese.	114
Figura 55. O silenciamento de <i>gf1b</i> reduz a população de HSC definitiva.	115

Índice de Abreviaturas

SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
EYA3	Eyes Absent Homolog 3
HES6	<i>Hairy and Enhancer of Split 6</i>
LXN	Latexina
CLPX	<i>Caseinolytic Peptidase X</i>
TRAK2	<i>Trafficking Protein, Kinesin-Binding 2</i>
GFI	<i>Grow Factor Independence</i>
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cell</i>
AGM	Aorta-Gônada-Mesonefros
RUNX-1	<i>Runt-related transcription factor</i>
BFU-E	<i>Burst-Forming Unit Erythroid</i>
CFU-E	<i>Colony-Forming Unit Erythroid</i>
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
HbF	Hemoglobina Fetal
HbA	Hemoglobina Adulta
SS	Anemia Falciforme
TI	Talassemia beta intermediária
ICM	<i>Intermediate Cell Mass</i>
CHT	<i>Caudal Hematopoietic Tissue</i>
ALM	<i>Anterior Lateral Mesoderm</i>
PLM	<i>Posterior Lateral Mesoderm</i>
CPA	carboxipeptidase A
<i>WISH</i>	<i>Whole mount In Situ Hybridization</i>
WT	Wild Type

MO *morpholino*

EPO Eritropoetina

mRNA RNA mensageiro

GFP *Green Fluorescence Protein*

Sumário

ABSTRACT	xiv
RESUMO.....	xvi
1-) INTRODUÇÃO.....	18
1.1-) Hematopoese:.....	18
1.2-) Eritropoese:.....	21
1.3-) Hemácias:.....	24
1.4-) Distúrbios das hemoglobinas:.....	27
1.5-) Modelos de estudo da eritropoese in vitro.....	29
- <i>Cultura de células primárias CD34⁺ humana</i>	29
- <i>Cultura da linhagem celular K562</i>	32
1.6-) Modelo de estudo da eritropoese in vivo – zebrafish.....	33
- <i>Hematopoese em zebrafish</i>	34
- <i>Mutantes de zebrafish</i>	36
- <i>Duplicação em zebrafish</i>	37
- <i>Métodos genéticos para estudo da hematopoese em zebrafish</i>	39
b-) Linhagens transgênicas repórteres.....	40
1.7-) SAGE e genes com potencial participação na eritropoese.....	42
1.8-) Outros genes de interesse na eritropoese: CLPX, TRAK e GFI.....	45
2-) OBJETIVOS.....	49
2.1-) Gerais:.....	49
2.2-) Específicos:.....	49
3-) ASPECTOS ÉTICOS.....	51
- Casuística.....	51
4-) MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
4.1-) Cultura de células CD 34 ⁺ hematopoéticas de sangue periférico.....	52
4.2-) Cultura de Linhagem K562.....	55
4.3-) Transdução por meio de lentivírus.....	56
4.4-) Citometria de fluxo.....	59
4.5-) Extração de RNA.....	61
4.6-) Síntese de cDNA.....	62
4.7-) PCR quantitativo em tempo Real (qRT-PCR).....	62
4.8-) Análise dos dados do qRT-PCR.....	65
4.9-) Western Blot.....	66
4.10-) Linhagens WT e transgênicas de zebrafish.....	68
4.11-) Análise das sequências e bioinformática.....	68
4.12-) Identificação dos genes homólogos humanos em zebrafish.....	68
4.13-) Hibridização in situ (<i>WISH</i>) e marcação por o-dianisidina.....	69
4.14-) Injeção de morpholino.....	69
4.15-) Isolamento de RNA, síntese de cDNA e qRT-PCR.....	70
5-) RESULTADOS.....	71
5.1-) Expressão dos genes EYA3 e LXN em cultura de células CD34 ⁺	71
5.2-) Expressão dos genes EYA3 e LXN em linhagem de células K562 induzida com Hemina.....	72
5.3-) Avaliação do silenciamento de EYA3 e LXN em células K562.....	73
5.4-) Análise do padrão de expressão do gene da globina alfa após silenciamento dos genes EYA3 e LXN em linhagem de células K562.....	76
5.5-) Análise do padrão de expressão do gene da globina gama após silenciamento dos genes EYA3 e LXN em linhagem de células K562.....	77

5.6-) Análise da expressão de Hemoglobina Fetal após silenciamento dos genes EYA3 e LXN em linhagem de células K562.....	78
5.7-) Identificação dos genes homólogos em zebrafish dos genes humanos EYA3, HES6 e LXN	80
5.9-) Análise da relação filogenética entre os membros de zebrafish e mamíferos dos fatores de transcrição EYA3, HES6 e do inibidor de carboxipeptidase LXN.....	87
5.10-) Expressão dos genes <i>eya1</i> , <i>eya2</i> , <i>eya3</i> e <i>eya4</i> em <i>Danio rerio</i> por Hibridização in situ	89
5.11-) Expressão dos genes <i>hes6</i> e <i>hes13</i> em <i>Danio rerio</i> por Hibridização in situ ...	90
5.12-) Expressão do gene <i>lxn</i> em <i>Danio rerio</i> por Hibridização in situ	91
5.13-) Avaliação do padrão de hemoglobinizacão e quantificacão de eritrócitos em zebrafish 72hpf injetados e não injetados com o <i>lxn</i> -morpholino	93
5.14-) Quantificacão de eritrócitos em embriões de zebrafish 48hpf injetados e não injetados com o <i>lxn</i> -morpholino	95
5.15-) Análise do padrão de expressão de marcadores eritroides e RUNX-1 após silenciamento do gene LXN em linhagem de células K562 induzida com Hemina e AraC.	96
5.16-) Expressão dos genes EYA3 e LXN em reticulócitos de pacientes com anemia falciforme (SS) e Talassemia beta intermediária (TI).....	99
5.17-) Expressão dos genes candidatos <i>clpx1</i> e <i>clpx2</i> em <i>Danio rerio</i> por Hibridização in situ	101
5.18-) Avaliação do padrão de hemoglobinizacão e quantificacão de eritrócitos em zebrafish 72hpf injetados e não injetados com o <i>clpx1</i> e <i>clpx2</i> -morpholino	101
5.19-) Identificacão dos candidatos ortólogos em zebrafish dos genes humanos TRAK	104
5.20-) Expressão dos genes <i>trak2</i> , <i>trak1.1</i> , <i>trak1.2</i> e <i>trak1.3</i> em <i>Danio rerio</i> por Hibridização in situ.	105
5.21-) Avaliação do padrão de hemoglobinizacão e quantificacão de eritrócitos em zebrafish 72hpf injetados e não injetados com o <i>trak1.1</i> -morpholino	108
5.22-) Participacão dos fatores de transcriçã da família Gfi, em teleóteos, nas sucessivas ondas de hematopoese	109
6-) DISCUSSÃO.....	116
7-) CONCLUSÕES	123
8-) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
9-) ANEXO.....	135

ABSTRACT

Molecular mechanisms involved in expression profile during erythropoiesis have been the subject of numerous investigations such study of gene regulation in erythroid cell culture. These studies allow us to identify new genes potentially involved in erythroid differentiation and additionally to investigate genes already known as regulators of red blood cells and hemoglobin production.

Our research group identified several genes differentially expressed during erythropoiesis. Among them, the transcription factors, *EYA3* and *HES6* and the latexin, *LXN*, were found to have higher expression in the final phase of the *in vitro* erythropoiesis. Our data suggest that *EYA3* and *LXN* are involved in the intermediate and final stages of erythropoiesis, expression pattern of alfa and gama globin and HbF production *in vitro*.

Additionally in zebrafish model, *eya1*, *eya2*, *eya3*, *eya4*, *hes6* and *hes13* showed a ubiquitous expression pattern, while *lxn* showed specific expression in the ICM, making it the most promising candidate to be knockdowned. *lxn* knockdown in zebrafish showed anemic phenotype at 72hpf embryos, but not at 48hpf, suggesting that the anemia results is due to a process in the end of the erythroid differentiation, corroborating the results found for *in vitro* cultures. Additional studies are necessary to understand the mechanisms and pathways involved in the participation of the *LXN* gene during the process of erythroid differentiation.

CLPX, TRAK2 and GFI transcription factors are also potentially candidates to be involved in erythropoiesis. CLPX gene codes for *caseinolytic peptidase X*, a protein highly conserved during evolution, which presents an ATP-dependent chaperone function. Data from this study showed that *clpx1* knockdown reduced significantly hemoglobinization levels and erythroid production in zebrafish. However, future studies

for the *clpx2* gene are needed to better understand the function of these genes in the heme production.

TRAK2 gene, in turn, is a *Trafficking Protein, Kinesin-Binding 2*, involved in mitochondrial movement along microtubules. Results obtained in collaboration with the researcher Jeffrey Miller, M.D. (NIH/NIDDK), showed the involvement of this gene in erythropoiesis in primary culture *in vitro* models. In this study, from the orthologs for the human *TRAK2* gene analyzed, only *trak1.1* appears to have its function conserved in teleosts. The silencing of this gene generated anemic phenotype in the embryos tested, corroborating the original results obtained in primary cell culture.

Finally, *gf1aa*, *gf1ab* and *gf1b* zebrafish transcription factors, orthologous to the Grow Factor Independence (GFI) family transcription factors in humans, also had their function evaluated in hematopoiesis. Our data suggest is involved in the initial phase of hematopoiesis while *gf1b* has a role in the definite hematopoiesis. The epistatic relation between the *gfi* and the hematopoietic key transcription factors was also determined, showing that *gf1aa* and *gf1b*, together with *lmo2*, *scl*, *runx-1* and *c-myb* also act as regulators of HSPC in teleosts.

RESUMO

Os mecanismos moleculares envolvidos no perfil de expressão durante a eritropoese têm sido objeto de numerosas investigações como, por exemplo, o estudo da regulação gênica em células de linhagem eritroide. Esses estudos permitem a identificação de novos genes com potencial participação nesse processo e, adicionalmente, possibilitam um melhor entendimento dos genes já identificados na maturação das células eritroides e que possam estar envolvidos na produção de hemoglobinas.

Nosso grupo de pesquisa identificou diversos genes diferencialmente expressos durante a eritropoese. Dentre eles, os fatores de transcrição, *EYA3* e *HES6* e a latexina, *LXN*, apresentaram maior expressão na fase final da eritropoese *in vitro*. Nossos dados sugerem participação dos genes *EYA3* e *LXN* nas fases intermediária e final da diferenciação eritroide, na expressão dos genes das globinas alfa e gama e na produção de HbF *in vitro*.

Adicionalmente, no modelo *in vivo zebrafish*, os genes *eya1*, *eya2*, *eya3*, *eya4*, *hes6* e *hes13* apresentaram padrão de expressão ubíquo, enquanto que o gene *lxn* apresentou expressão específica na ICM, tornando-o o candidato mais promissor para ser silenciado. O silenciamento desse gene em *zebrafish* apresentou fenótipo anêmico em embriões 72hpf, mas não em 48hpf, sugerindo que a anemia é decorrente de um processo no final da diferenciação eritroide, corroborando os dados encontrados em cultura *in vitro*. Estudos adicionais são necessários para compreensão dos mecanismos e vias envolvidos na participação do gene *LXN* durante o processo de diferenciação eritroide.

Outros genes com potencial participação no processo de eritropoese são CLPX, TRAK2 E GFI. O gene CLPX codifica a *caseinolytic peptidase X*, uma proteína

altamente conservada durante a evolução e que apresenta função de chaperona dependente de ATP. Os dados deste trabalho mostram que o silenciamento do gene *clpx1* reduziu significativamente os níveis de hemoglobinizacão e produçao de eritrócitos em *zebrafish*. Contudo, estudos adicionais para o gene *clpx2* precisam ser realizados para melhor compreender a possível função desses genes na produçao de Heme.

O gene *TRAK2*, por sua vez, é uma *Trafficking Protein, Kinesin-Binding 2*, envolvida no movimento da mitocôndria ao longo dos microtúbulos. Os resultados obtidos em colaboraçao com o pesquisador Jeffrey Miller, M.D. (NIH/NIDDK) mostraram envolvimento desse gene na eritropoese em modelo *in vitro* de cultura primária. No presente estudo, dentre os ortólogos para o gene *TRAK2* humano avaliados, apenas o *trak1.1* parece ter sua função conservada nos teleósteos. O silenciamento desse gene gerou fenótipo anêmico nos embriões avaliados, corroborando os dados obtidos originalmente em cultura de células primária.

Finalmente, os fatores de transcriçao de *zebrafish* *gf1aa*, *gf1ab* e *gf1b*, ortólogos aos fatores de transcriçao da família *Grow Factor Independence (GFI)* em humanos também tiveram seu papel avaliado na hematopoese. Nossos dados mostram participaçao de *gf1aa* fase inicial de hematopoese e de *gf1b* na hematopoese definitiva. Também foi determinada a relaçao epistática entre os fatores *gf1* e os fatores de transcriçao chave hematopoéticos, mostrando que *gf1aa* e *gf1b*, juntamente com *lmo2*, *scl*, *runx-1* e *c-myb* atuam como reguladores de HSPC em teleósteos.

1-) INTRODUÇÃO

1.1-) Hematopoese:

O sistema hematopoético humano produz cerca de um trilhão de células sanguíneas por dia (Emerson, 1991). Esse processo contínuo e sequencial envolve a auto-regeneração e o comprometimento de células tronco-hematopoéticas pluripotentes, gradualmente, com células progenitoras mais restritas a uma determinada linhagem. Posteriormente, ocorre a proliferação e diferenciação dessas células para, finalmente, dar origem a células sanguíneas maduras e funcionalmente distintas, como: hemácias, plaquetas, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos/macrófagos e linfócitos.

Todos os organismos vertebrados apresentam as chamadas ondas de hematopoese no seu período de vida (Galloway e Zon, 2003). Durante o desenvolvimento de aves e mamíferos, as primeiras células-tronco hematopoéticas (HSCs) surgem nas ilhas de sangue no saco vitelínico, dando origem a eritrócitos e macrófagos necessários para o rápido crescimento de tecidos nos embriões (Palis e Yoder, 2001). Esse processo, denominado onda primitiva da hematopoese, é transiente. Sucessivamente, a onda definitiva da hematopoese inicia-se dentro do embrião, na região aorta-gônada-mesonefros (AGM). Diferentemente da primeira onda, as HSCs são pluripotentes e dão origem às diferentes linhagens de células do sangue. As HSCs, oriundas da AGM, migram então para o fígado fetal, onde proliferam e povoam a medula óssea, o órgão hematopoético adulto (Cumano e Godin, 2007). A figura 1 mostra os estágios da hematopoese em mamíferos usando como exemplo o desenvolvimento de camundongo.

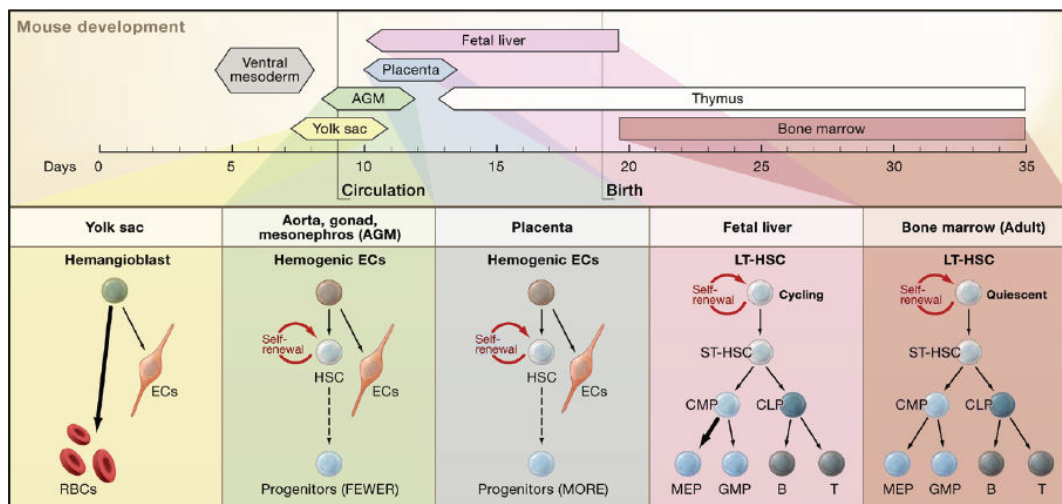


Figura 1. Estágios da hematopoese em camundongo.

As HSCs são derivadas da mesoderme ventral. Os subsequentes sítios de hematopoese incluem: o saco vitelínico, a AGM, fígado fetal, placenta e medula óssea. A primeira onda de produção de células sanguíneas no saco vitelínico é denominada primitiva, cuja principal função é a produção de eritrócitos (RBCs) para facilitar a oxigenação dos tecidos do embrião em crescimento. Os hemangioblastos do saco vitelínico parecem dar origem a células do sangue e endoteliais (ECs). Já a AGM, parece formar as ECs hemogênicas, de onde surgem as HSCs. Número significativo de HSCs é encontrado na placenta. A hematopoese definitiva envolve a colonização do fígado fetal, timo, baço e medula óssea. Nesta fase, as chamadas *long-term* HSCs (LT-HSCs) originam as *short-term* HSCs (ST-HSCs). Estas últimas produzem os progenitores mielóides (CMPs) e linfóides (CLPs). CLPs estão comprometidos com precursores dos linfócitos B e T. CMPs dão origem a progenitores eritroides e megacariocíticos (MEPs), bem como progenitores granulocíticos e macrofocitários (GMPs). GMPs dão origem aos precursores de mastócitos, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos. (Adaptado de Orkin e Zon, 2008).

Os fatores de transcrição são os reguladores determinantes intrínsecos de um fenótipo celular. Desse modo, oferecem um ponto de partida para a melhor compreensão do desenvolvimento de HSCs e do programa genético envolvido na diferenciação dessas em linhagens celulares específicas (Orkin, 2000). Assim, as células hematopoéticas são reguladas pela combinação de diferentes fatores de transcrição (Ness e Engel, 1994). Revisões mais recentes forneceram informações e discussões adicionais a respeito da relação entre fatores de transcrição em diferentes linhagens de células hematopoéticas (Nutt e Kee, 2007; Iwasaki e Akashi, 2007; Kim e Bressnick, 2007; Rothemberg, 2007).

Os fatores de transcrição são, dessa forma, classificados em a-) aqueles envolvidos na formação e funcionamento das HSCs; e b-) aqueles comprometidos com

a diferenciação dessas a uma linhagem celular específica. Os fatores de transcrição, por exemplo, necessários para a produção, sobrevivência e auto-regeneração das células-tronco hematopoéticas são: RUNX-1, TEL/ETV6, SCL/TAL1 e LMO2. Já eritrócitos, mastócitos e megacariócitos coexpressam os fatores GATA-1, TAL1 e NF-E2. As células primárias mieloides expressam c-Myb e células T expressam Ikaros, GATA-3 e LEF-1. Esta classificação é arbitrária, já que existem fatores envolvidos em ambos os processos (Orkin e Zon, 2008). Os fatores de transcrição que regulam a hematopoese em mamíferos estão demonstrados na figura 2.

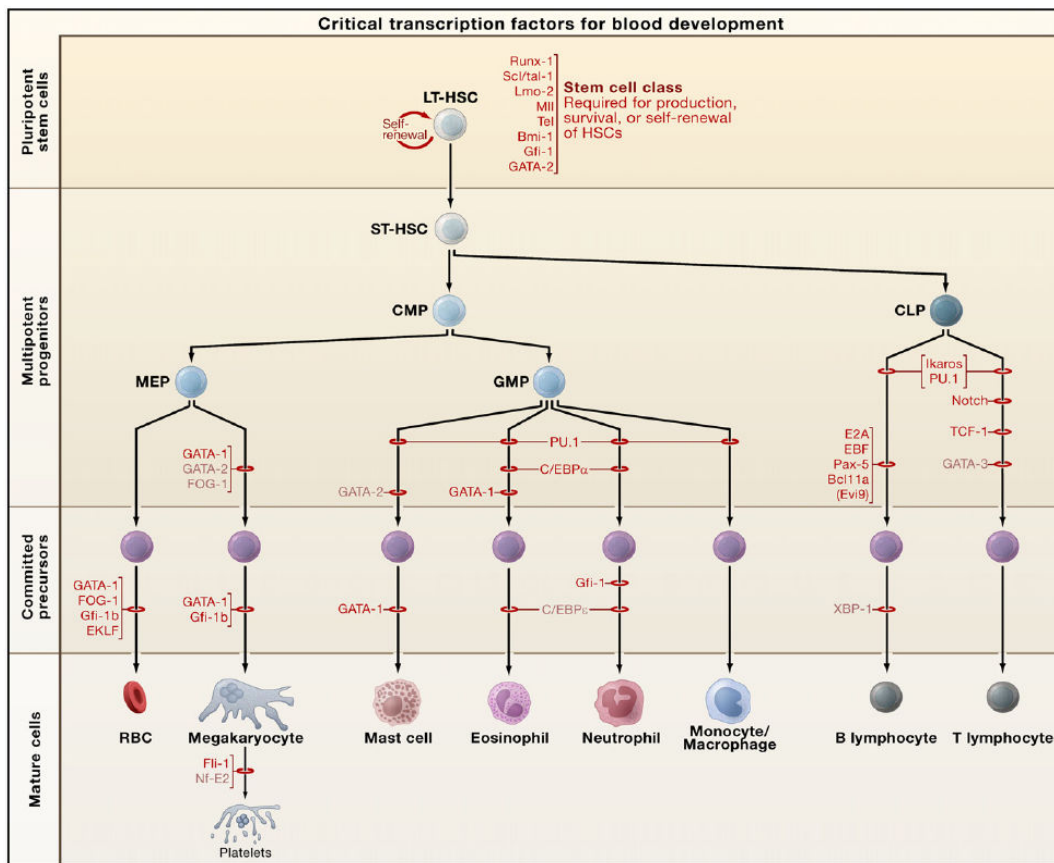


Figura 2. Fatores de transcrição requeridos para a hematopoese.

Os estágios em que a hematopoese é bloqueada na ausência de um determinado fator estão indicados pela barra vermelha. As vias que resultam no comprometimento de células a linhagens hematopoéticas específicas são coordenadas por diferentes fatores de transcrição através de mecanismos combinados. Pode-se observar que os fatores de transcrição que atuam na produção e manutenção das HSCs também participam de processos posteriores e aqueles que desempenham papel em linhagens mais restritas, como PU.1, Gfi e C/EBP α também atuam em fases anteriores. (Adaptado de Orkin e Zon, 2008).

1.2-) Eritropoese:

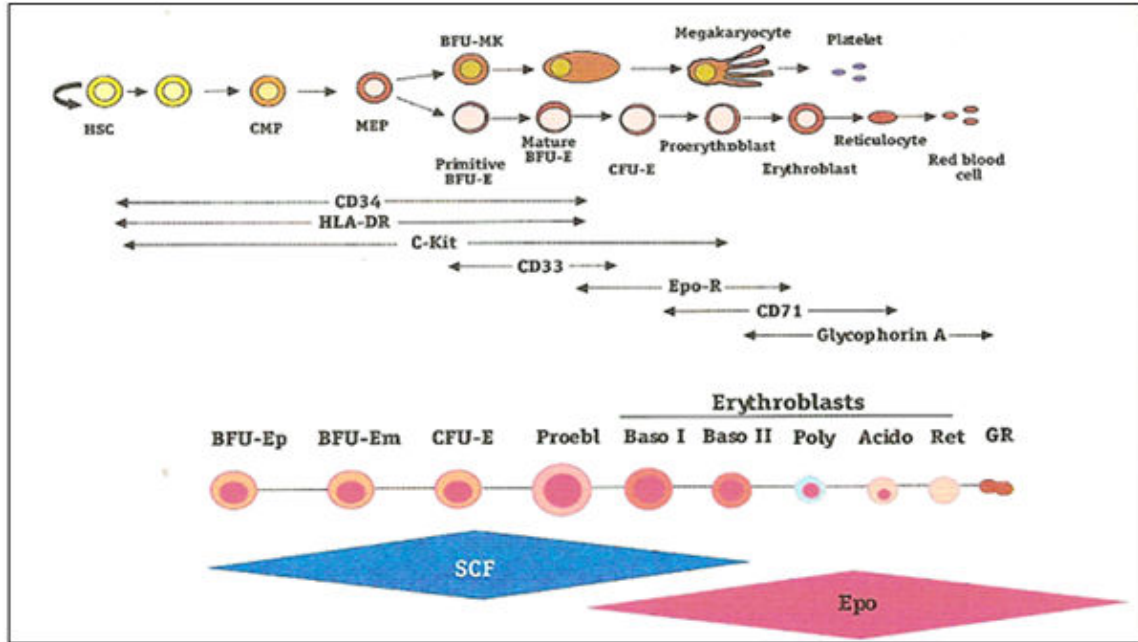
A eritropoese é o complexo mecanismo que ocorre na medula óssea do indivíduo adulto e resulta na produção de hemácias a partir de precursores de células tronco-hematopoéticas. Durante o período embrionário, a eritropoese ocorre em células da mesoderme do saco vitelínico. A partir do segundo mês de gestação, a eritropoese passa a ocorrer no baço e fígado fetal. Essa função é progressivamente assumida pela medula-óssea (Pallis *et al.*, 1998).

As primeiras células progenitoras comprometidas com a linhagem eritroide são as BFU-E (*Burst-Forming Unit Erythroid*). Essas, rapidamente, se desenvolvem e diferenciam-se em CFU-E (*Colony-Forming Unit Erythroid*) (Elliot *et al.*, 2008). Os progenitores dessas, por sua vez, diferenciam-se e sofrem uma série de mudanças que incluem diminuição do tamanho celular, condensação da cromatina e hemoglobinizacão, culminando com a extrusão do núcleo e outras organelas (Fawcett, 1997).

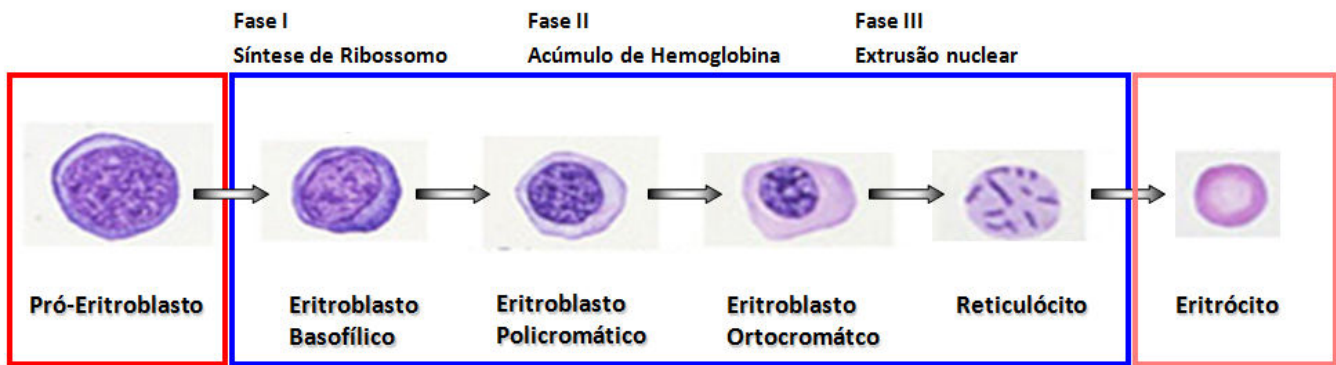
Em humanos, o ciclo de vida de um eritrócito é de 120 dias. Em condições normais, aproximadamente 1% dessas células são sintetizadas por dia, número esse que pode ser significativamente aumentado em situações de estresse agudo ou crônico, como por exemplo, trauma ou hemólise. O mecanismo de controle em curto prazo da eritropoese é bastante aprimorado e é regulado pelo hormônio eritropoetina (Epo), que estimula a proliferação, a inibição da eritropoese e diferenciação dos progenitores das CFU-E (Molineaux *et al.*, 2009). A eritropoetina é, há bastante tempo, conhecida como o principal fator responsável por regular a eritropoese. Ela atua na regulação da expansão, diferenciação, apoptose e ativação de genes específicos eritroides (Molineaux *et al.*, 2009). No entanto, outros hormônios, além da Epo, atuam nas BFU-E, como SCF (*Stem Cell Factor*), IGF-1 (*Insuline like Grow Factor 1*), glicocorticoides (GCs) e as

Interleucinas IL-3 e IL-6 (Dolznic, 2006). Dessa forma, sob ação destes hormônios, as CFU-E diferenciam-se em pró-eritroblastos, esses em eritroblastos basófilos, esses em eritroblastos policromáticos, seguidos de eritroblastos ortocromáticos e, finalmente, em reticulócitos e hemácias (figura 3). Adicionalmente, a eritropoese é mediada por um número relativamente pequeno de fatores de transcrição, que incluem GATA-1, SCL/TAL1, LMO2, LDB1 e KLF1 (Cantor e Orkin, 2002). Estudos recentes mostram modelos de complexos multiprotéicos formados por esses fatores que orquestram a ativação e repressão de genes nas células eritroides (Kerenyi e Orkin, 2010).

A figura 3 mostra um esquema da diferenciação eritroide, os diferentes tipos celulares das diversas etapas, a ação dos hormônios Epo e SCF e os marcadores celulares que identificam as células nas diferentes fases da eritropoese. A figura 4 mostra uma visão global da eritropoese e a regulação desta em diferentes níveis através de complexos proteicos, hormônios e micro-RNAs.



A



B

Figura 3. Etapas da diferenciação eritroide.

Em A, são observados as células nos diferentes estágios da diferenciação eritroide, sob a ação dos hormônios SCF e Epo. Proteínas transmembrana como CD34 identificam células progenitoras. Já as proteínas Glicoforina A e CD71 (Transferrina) marcam células durante os diferentes estágios da eritropoese. A partir do amadurecimento, as células ficam menos positivas para transferrina e mais positivas para glicoforina A. Em B, podem-se observar com maiores detalhes as células em cada fase da eritropoese a partir de pró-eritroblasto, culminando na extrusão nuclear e diferenciação em células maduras e funcionais, os eritrócitos ou hemácias (Elliot *et al*, 2008).

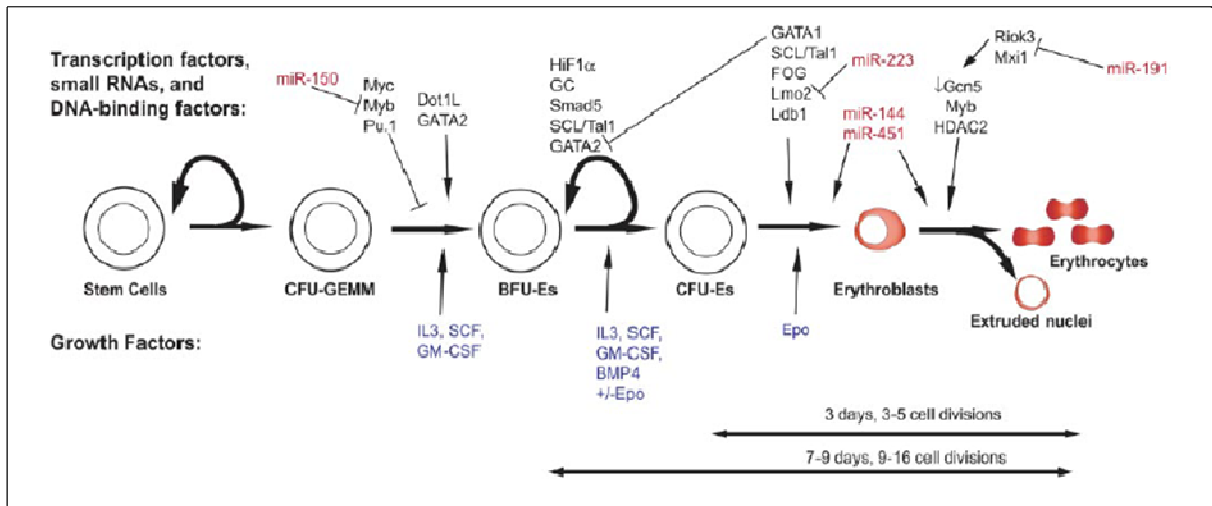


Figura 4. Visão global da eritropoese: regulação da eritropoese por complexos multiproteicos, hormônios e micro-RNAs.

A formação das hemácias a partir das HSCs é regulada pela sinalização de fatores externos (em azul), como as citocinas Epo, IL-3 e SCF, bem como fatores intracelulares, como fatores de transcrição (em preto) e micro-RNAs (em vermelho) (Kerenyi e Orkin, 2010).

1.3-) Hemácias:

As hemácias desempenham papel essencial no transporte de oxigênio aos tecidos e na troca de gases nos pulmões. São as células encontradas em maior quantidade no sangue e estão presentes em um número de aproximadamente quatro milhões por ml em humanos, variando de acordo com o sexo e a idade (Zago *et al.*, 2001). Durante a maturação, alguns fatores podem interferir e alterar estes números levando a anemias ou policitemias.

O principal componente das hemácias é a hemoglobina (aproximadamente 90% do peso da célula). Esta proteína é uma molécula tetramérica, com quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas do tipo alfa (α) e duas do tipo beta (β). Os genes que expressam as cadeias protéicas α e β localizam-se em dois grupamentos cromossômicos diferentes, localizados no braço curto dos cromossomos 16 e 11, respectivamente

(figura 5). No grupamento α incluem os genes para as cadeias zeta (ζ), alfa (α) e teta (θ), enquanto que o grupamento β é constituído dos genes para as cadeias épsilon (ϵ), gama (γ^A e γ^B), delta (δ) e beta (β). Durante o desenvolvimento ontogenético normal, ocorrem mudanças na expressão desses genes, que são os responsáveis pelos diferentes tipos de hemoglobinas humanas (figura 6) (Dzierzak, 2001).

O gene que expressa o polipeptídeo da α -globina passa a ser transcrito abundantemente por volta da décima semana após a concepção e é expresso em indivíduos normais durante o resto da vida. Antes deste período o gene ζ também é produzido e se liga ao polipeptídeo originário do gene ϵ do cluster beta formando a hemoglobina do tipo Gower ($\zeta_2\epsilon_2$). As outras Hemoglobinas formadas durante o período embrionário são Portland ($\zeta_2\gamma_2$), Gower2 ($\alpha_2\epsilon_2$), uma vez que os genes γ e α já começam a ser expressos (figura 5). Na fase fetal, o gene γ é predominante e dá origem a Hemoglobina F (HbF) ($\alpha_2\gamma_2$), enquanto que na fase adulta, o gene β origina a hemoglobina do tipo A (HbA) ($\alpha_2\beta_2$) que corresponde a 97% do total de hemoglobina do indivíduo. Após o nascimento existe ainda a HbA2 ($\alpha_2\delta_2$) que corresponde a 3% do total, além de aproximadamente 1% de HbF que continua sendo produzida.

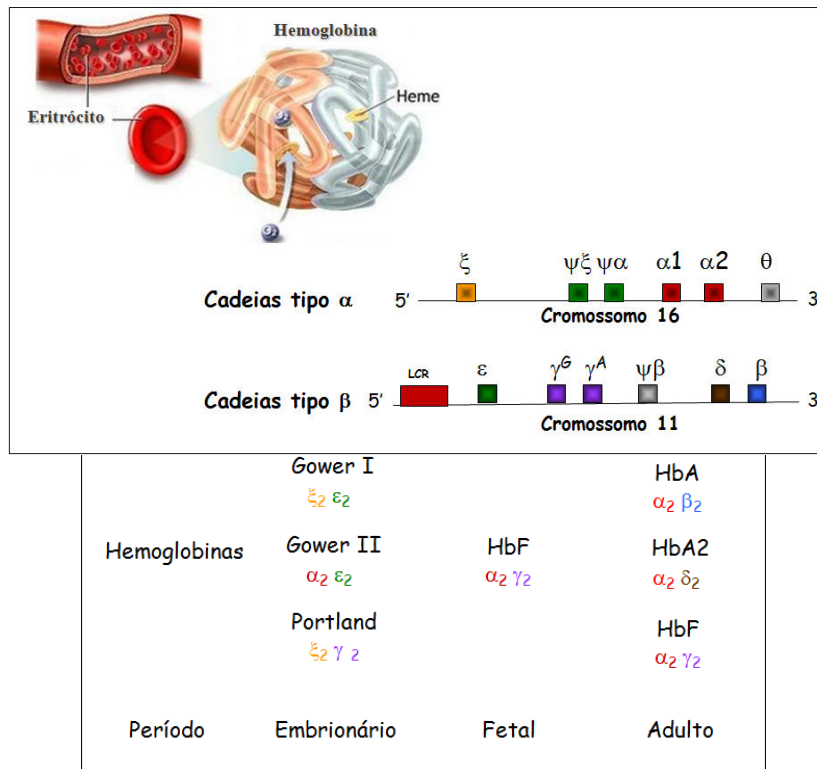


Figura 5. Esquema da Hemoglobina humana adulta (HbA), organização estrutural genômica dos loci da α -globina e β -globina humanos e expressão dos vários tipos de hemoglobina ao longo do desenvolvimento.

Pode-se observar a ordem gênica do locus da α -globina no cromossomo 16 e do locus da β -globina no cromossomo 11. O painel inferior mostra a ordem temporal de produção e os tetrâmeros dos tipos de hemoglobina. LCR (Locus Control Region); HbF (Hemoglobina Fetal); HbA (Hemoglobina Adulta) (Dzierzak, 2001).

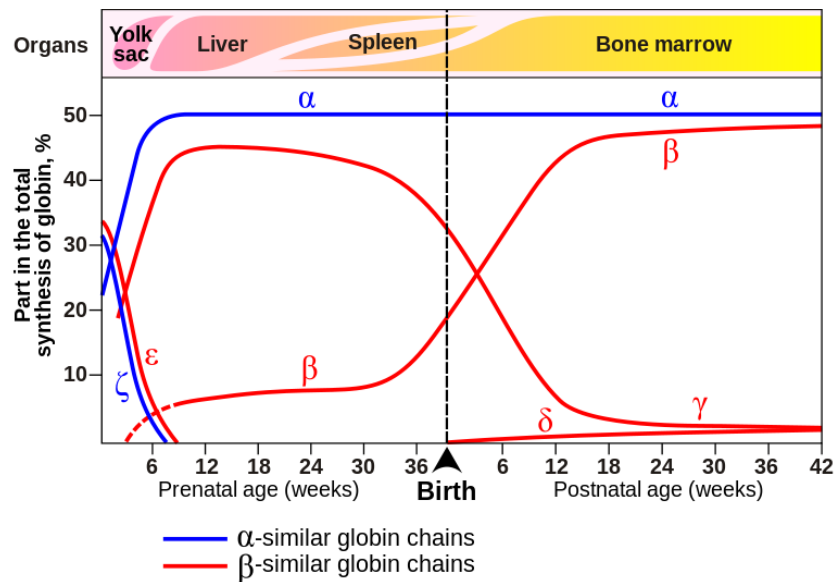


Figura 6. Expressão das diferentes cadeias globínicas durante o desenvolvimento ontogenético normal.

Durante o desenvolvimento ontogenético normal, ocorrem mudanças na expressão dos genes das globinas, que são os responsáveis pelos diferentes tipos de hemoglobinas humanas. (Wood W.G., 1976).

1.4-) Distúrbios das hemoglobinas:

Os distúrbios das hemoglobinas podem ser classificados em em 3 grupos: alterações estruturais, redução no ritmo de síntese das cadeias globínicas (talassemias alfa e beta) e as Persistências Hereditarias de HbF (Bradley & Ranney, 1973; Weatherall, 1977; Weatherall & Clegg, 1979).

Dentre as variantes estruturais da hemoglobina adulta (Hb A), a hemoglobina S (Hb S) representa a mais importante e frequente. A Hb S, responsável pela anemia falciforme, ocorre devido à mutação de ponto no códon 6 do gene da globina- β onde há a substituição de uma Adenina por uma Timina, resultando na troca do aminoácido ácido glutâmico pela valina (Glu \rightarrow Val) e conseqüente formação da hemoglobina anômala (Steinberg *et al*, 2001; Stuart & Nagel, 2004). A Hb S quando em concentração elevada e na forma desoxigenada, torna-se relativamente insolúvel e agrega-se ao redor de um eixo vertical originando, em cortes transversais, anéis de moléculas de hemoglobina empilhados uns sobre os outros. Ao ser reoxigenada, essa agregação pode ser revertida e as hemácias podem recuperar seu formato bicôncavo original. Após alguns ciclos de oxigenação e desoxigenação, as modificações decorrentes da formação de polímeros provocam deformações nas membranas dos eritrócitos, originando as clássicas hemácias em forma de foice (Bunn *et al*, 1977; Dean *et al*, 1978; Steinberg, 1998). A polimerização intracelular da Hb S desoxigenada corresponde, em essência, ao processo fisiopatológico básico subjacente às múltiplas manifestações orgânicas da anemia falciforme como danos oxidativos, desidratação celular, vaso-oclusão, além de manifestações clínicas como acidente vascular cerebral e síndrome torácica aguda (Finch, 1972; Gladwin & Rodgers, 2000). Os indivíduos homozigotos (SS) apresentam quadro clínico grave e os heterozigotos não apresentam nenhuma anormalidade hematológica (Costa, 2001).

Outro distúrbio referente às hemoglobinas são as síndromes talassêmicas, que compreendem um grupo heterogêneo de doenças hereditárias em que existe uma redução no ritmo de síntese de uma ou mais cadeias polipeptídicas da hemoglobina. Esta anormalidade, de natureza complexa, ocasiona, em última análise, a supressão total ou parcial da produção de cadeias alfa (α) nas talassemias alfa e de cadeias beta (β) nas talassemias beta. Daí advém a hemoglobinizacão deficiente e, conseqüentemente, microcitose e hipocromia características dessas síndromes. Além disso, a síntese de cadeias não afetadas permanece inalterada provocando acúmulo e formação de agregados instáveis das cadeias não pareadas. A precipitação desses agregados provoca numerosos efeitos deletérios sobre as hemácias ou seus precursores. São essas lesões as responsáveis pela destruição prematura dos eritroblastos na medula óssea, caracterizando a eritropoese ineficaz comum a essas síndromes, e também pela reduzida sobrevivência dos eritrócitos na circulação, determinante do quadro hemolítico (Bank, 1978; Weatherall & Clegg, 1972).

As talassemias β podem ser classificadas em três grupos: talassemia β^+ , caracterizadas pela supressão parcial na produção de cadeias β ; talassemia β^0 , em que há ausência total de síntese de globina β ; e talassemia $\delta\beta$, onde há síntese deficiente de cadeias δ e β além de outras variantes ainda não bem caracterizadas (Bank, 1978; Weatherall, 1977; Weatherall & Clegg, 1979).

O estado homozigótico da maioria das variantes genéticas de β -talassemia produz o quadro clínico da talassemia maior. Esses pacientes apresentam acentuada anemia a partir do quarto mês de vida e necessitam de transfusões sanguíneas regulares para sobreviverem. Esse processo terapêutico conduz ao acúmulo de ferro sobre glândulas endócrinas, fígado e coração. As complicações cardíacas secundárias à hemocromatose na segunda década da vida representam a causa mais comum de morte

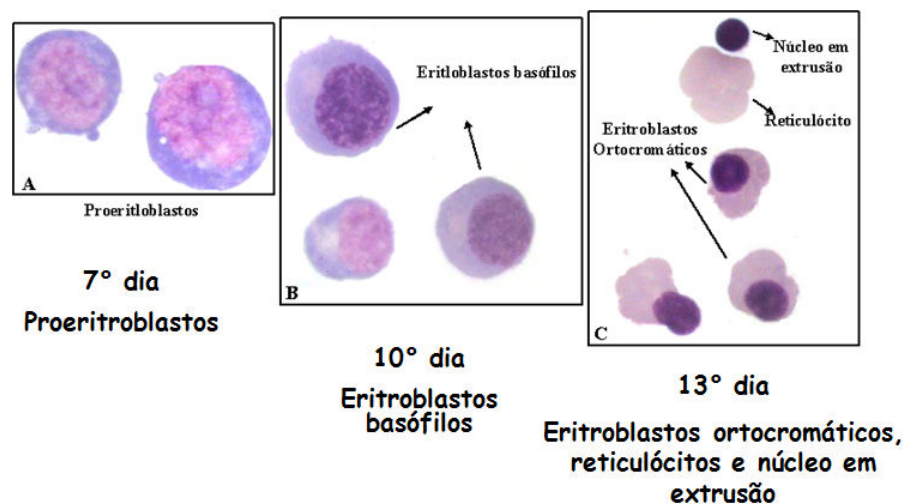
nessa doença (Gill & Kellefer, 1980). Os heterozigotos para β -talassemia apresentam, com raras exceções, apenas discreta anemia. No entanto, as alterações laboratoriais são significativas, caracterizando-se por microcitose, hipocromia e elevação dos níveis de HbA₂ e, algumas vezes, de HbF (Bank, 1978; Weatherall & J.B., 1972). Existe, no entanto, um contingente de talassêmicos heterozigotos sem qualquer anormalidade laboratorial detectável pelos métodos habituais (Weatherall *et al.*, 1980). Entre estes extremos, existem algumas formas de combinações genéticas que resultam em quadros clínicos não tão graves quanto à forma homozigótica clássica, e, se aplica com frequência a denominação de “talassemia intermediária” (Cicidalli *et al.*, 1980; Gallo *et al.*, 1979).

1.5-) Modelos de estudo da eritropoese *in vitro*

- *Cultura de células primárias CD34⁺ humana*

A eritropoese envolve um processo contínuo de proliferação, diferenciação e apoptose celular (Koury *et al.*, 1994). O número de células produzidas entre os elementos mais imaturos e os elementos mais maduros da linhagem eritroide varia de acordo com as necessidades fisiológicas. Vários métodos já foram utilizados para classificar as células eritroides humanas. Dentre esses métodos, está a classificação desse tipo celular a partir de antígenos de superfície que são expressos nas células eritroides nos diversos estágios de maturação (Mayani H, Lansdorp, 1995; Terstappen *et al.*, 1991; Robinson *et al.*, 1981; Yuan *et al.*, 1993). As células eritroides são identificadas pela sua afinidade a anticorpos monoclonais específicos e assim correlacionadas à morfologia e à proliferação.

A expressão de CD34, por exemplo, não é capaz de identificar todas as células hematopoéticas pluripotentes (Zanjani *et al.*, 1998). No entanto, células eritroides primitivas expressam CD34 na membrana plasmática e proliferam e diferenciam-se em células maduras quando expostas a meio, hormônios e fatores apropriados. Com a evolução da eritropoese, as células eritroides passam a expressar o receptor de transferrina, CD71 e perdem CD45, antígeno comum a leucócitos. Outros antígenos como glicoforina A e band3 mantêm sua expressão em hemácias maduras e funcionais (Telen, 1995). A associação entre a morfologia e a expressão de antígenos característicos nas células de linhagem eritroide permitiu a identificação destas através da técnica de citometria de fluxo (Sieff *et al.*, 1982; Loken *et al.*, 1987). A figura 7 mostra as diversas fases de uma cultura primária eritroide a partir de células CD34⁺. Pode-se observar o predomínio de proeritroblastos no 7º dia da cultura (fase inicial) (figura 7a) e de eritroblastos basófilos (fase intermediária) no 10º dia (figura 7b). Já na fase final de cultura (figura 7c), característica do 13º dia, pode-se observar predomínio de eritroblastos ortocromáticos, bem como a presença de reticulócitos e hemácias.



(Carolina Lanaro, 2008)

Figura 7. Células coletadas nos dias 7, 10 e 13 de cultura de células CD34⁺. A figura A corresponde ao 7º dia de cultura, mostrando os proeritroblastos. Na figura B temos células coletadas no 10º dia de cultura, onde as setas indicam a presença de eritroblastos basófilos. Já na figura C, temos o 13º dia de coleta, onde encontramos eritroblastos ortocromáticos, reticulócitos e núcleo em extrusão (Lanaro, 2007).

Como descrito anteriormente, a diferenciação eritroide pode ser acompanhada por citometria de fluxo utilizando os anticorpos anti-receptor de transferrina (CD71) e anti-glicoforina A. Neste caso, observa-se que à medida que ocorre a diferenciação, as células positivas para transferrina passam a “ganhar” marcação anti-glicoforina A, indicando maturação celular (figura 8).

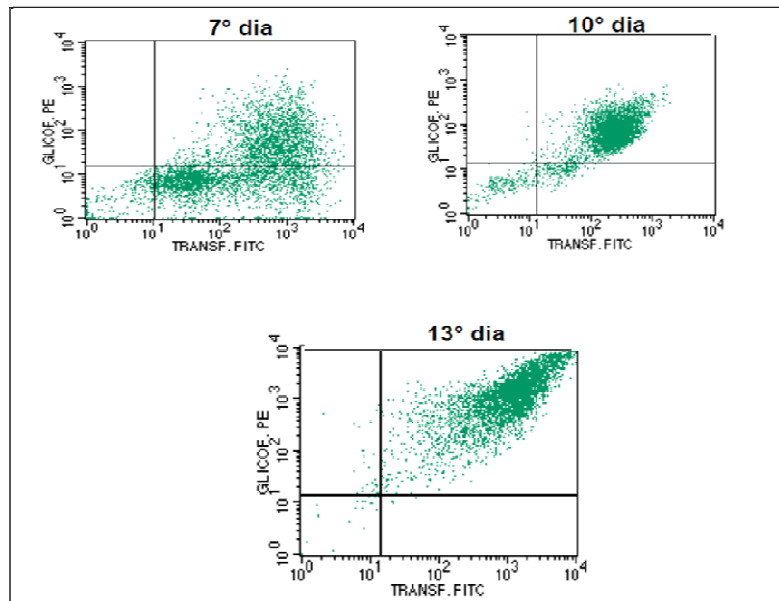


Figura 8. Dot plots de citometria de fluxo, mostrando maturação das células eritroides.

O eixo das abscissas representa a marcação anti-receptor de transferrina e o eixo das ordenadas a marcação anti-glicoforina A. O quadrante superior indica marcação dupla para ambos os anticorpos (Lanaro, 2007).

Diante do exposto, a cultura primária a partir de células CD34⁺ “mimetiza” o ambiente medular, no sentido de que são encontradas células nas diferentes fases de diferenciação e, dessa forma, é um modelo *in vitro* bastante eficiente para se estudar, por exemplo, a expressão gênica global durante a eritropese.

- Cultura da linhagem celular K562

A K562 foi a primeira linhagem celular leucêmica humana imortalizada a ser estabelecida. Estas células são do tipo eritroleucêmica e foram obtidas de uma paciente de 53 anos de idade com leucemia mieloide crônica em crise blástica, sendo positiva para o cromossomo Philadelphia (Lozzio e Lozzio, 1975; Drexler, 2000).

Os processos de proliferação, diferenciação e apoptose de células hematopoéticas estão intimamente ligados e, em condições normais, a proliferação e morte celular estão balanceadas. A indução da diferenciação, no entanto, está associada à perda da capacidade proliferativa e a apoptose acompanha a maturação celular.

Por se tratar de uma linhagem eritroleucêmica, durante a diferenciação de células hematopoéticas, a K562 encontra-se no estágio comum progenitor de células eritroides e megacariocíticas, no entanto, esta diferenciação encontra-se normalmente bloqueada. Contudo, as células K562 podem ser induzidas à diferenciação eritroide através do composto hemina, o qual aumenta a expressão de γ -globina. O aumento da produção de HbF funciona como um marcador da diferenciação (Baliga *et al*, 1993).

A hemina é uma Protoporfirina IX que contém um íon férrico (Heme) com um ligante cloreto (Kaplan, 1984). A adição deste composto às células K562 induz o programa de maturação eritroide, promovendo a produção de hemoglobina embrionária e fetal, mas não de hemoglobina adulta (Rutherford *et al*, 1979).

Dessa forma, as células K562 são bastante estabelecidas na literatura e largamente utilizadas para estudo da eritropoese, já que se trata de uma cultura de fácil e rápida expansão e, cuja adição de compostos como a hemina, induz a diferenciação destas células para a linhagem eritroide.

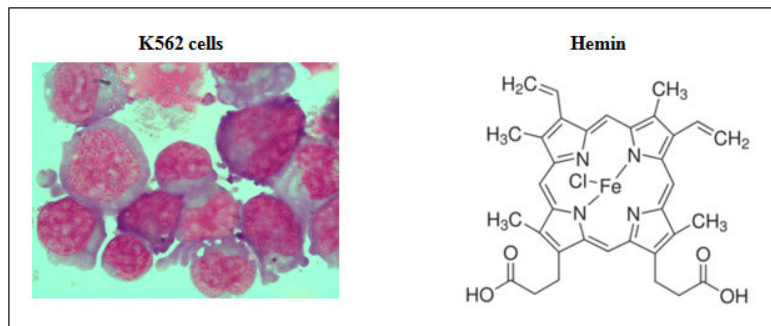


Figura 9. Células eritroleucêmicas K562 e seu composto indutor da diferenciação eritroide, Hemina.

As células K562 que se encontram no estágio comum progenitor de células eritroides e megacariocíticas podem ser induzidas à diferenciação eritroide através do composto Hemina e o aumento da expressão de γ -globina pode funcionar como um marcador da diferenciação (Kaplan, 1984; Rutherford *et al.*, 1979).

1.6-) Modelo de estudo da eritropoese *in vivo* – *zebrafish*

O *zebrafish* (*Danio rerio*) tornou-se um poderoso modelo de estudos da hematopoese de vertebrados, além da embriogênese, desenvolvimento e organogênese (Amatruda e Zon, 1999; Brownlie e Zon, 1999; Dooley e Zon, 2000; Driever e Fishman, 1996; Ward e Lieschke, 2002; Wingert e Zon, 2003).

Diferentemente de mamíferos, os ovos de *zebrafish* são fertilizados externamente ao corpo do animal, o que permite fácil observação e manipulação dos embriões. Além disso, os embriões são transparentes, o que favorece a visualização direta de batimentos cardíacos e circulação das células sanguíneas na vasculatura. Outra vantagem associada a esse modelo, é que os animais atingem a maturidade sexual em três ou quatro meses e fêmeas adultas são capazes de produzir de 100 a 200 ovos semanalmente. Em virtude de seu pequeno tamanho, milhares desses peixes podem ser mantidos em laboratórios, utilizando pouco espaço, o que torna este modelo extremamente vantajoso para rastreamentos genéticos em larga escala (Patton e Zon, 2001). Na década passada, utilizando-se de técnicas de rastreamento genético, milhares

de mutantes foram obtidos, muitos deles com defeitos hematopoéticos, permitindo melhor entendimento da hematopoese (Ransom *et al.*, 1996; Weinstein *et al.*, 1996).

- Hematopoese em zebrafish

Da mesma forma que em outros vertebrados, os teleósteos (peixes ósseos, como *zebrafish*) apresentam duas ondas de hematopoese (Al-Adhami e Kunz, 1977; Amatruda e Zon, 1999; Galloway e Zon, 2003; Zon, 1995) e estas parecem ser bastante conservadas em mamíferos (Liao *et al.*, 2000; Lieschke *et al.*, 2001). No *zebrafish*, a primeira onda de hematopoese ou primitiva ocorre dentro do embrião, na ICM (*Intermediate Cell Mass*) (figura 10). A ICM equivale às ilhas de sangue do saco vitelínico de mamíferos e é onde se originam os eritrócitos primários. Na segunda onda de hematopoese ou definitiva, progenitores pluripotentes são produzidos. As HSCs emergem inicialmente de uma região da aorta dorsal, a AGM (Aorta-Gonada Mesonephros) entre 30 e 36 horas após a fertilização (30-36hpf, de *hours post-fertilization*). Posteriormente, elas surgem na região distal da cauda, a CHT (*Caudal Hematopoietic Tissue*) e, finalmente povoam a medula renal e timo, onde a hematopoese adulta prossegue (Goessling e North, 2011). A figura 10 mostra o desenvolvimento hematopoético de *zebrafish* e as diferentes ondas de hematopoese. A figura 11 mostra um esquema comparativo do desenvolvimento hematopoético conservado entre os vertebrados.

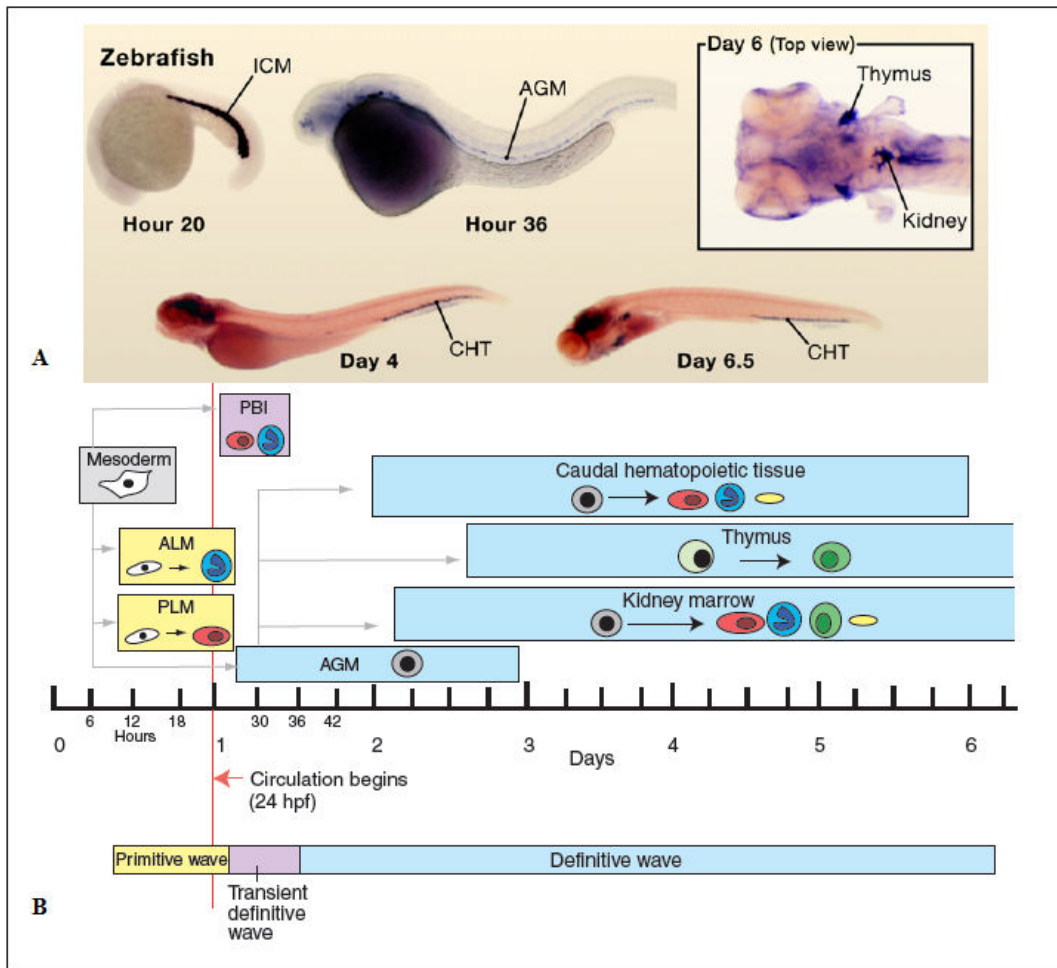


Figura 10. Desenvolvimento hematopoético em zebrafish.

(A) A hematopoese ocorre primeiramente na ICM e, posteriormente, na AGM e CHT, para finalmente tomar posição na medula renal e timo. Hibridização *in situ* (*WISH*) para GATA-1, 30hpf (ICM); c-myb 36hpf (AGM); SCL/TAL1, 4-6.5dpf (CHT) e c-myb 6dpf (medula renal e timo). (B) A hematopoese em *zebrafish* ocorre em ondas consecutivas. A onda primitiva (amarelo) começa por volta de 11hpf, onde hemangioblastos (branco), que apresentam potencial para se tornar tanto células endoteliais vasculares quanto hematopoéticas, surgem na ALM (*Anterior Lateral Mesoderm*) e na PLM (*Posterior Lateral Mesoderm*), que são, coletivamente, análogos às ilhas sanguíneas no saco vitelínico de mamíferos. Os hemangioblastos da PLM formam então a ICM, onde os eritrócitos primitivos (vermelho) entram na circulação. Assim que a circulação começa, a hematopoese na ICM diminui gradualmente. Uma onda definitiva transiente (lilás) inicia-se quando progenitores eritromieloides aparecem na PBI (*Posterior Blood Island*). A partir de 26hpf HSCs definitivas (cinza) emergem na AGM para, posteriormente, povoarem a CHT por volta de 48hpf. Esta última é equivalente ao fígado fetal ou placenta de camundongos. As HSCs da AGM colonizam então o rim a partir de 48hpf. A medula renal, que equivale funcionalmente à medula óssea de mamíferos, origina todas as linhagens das células do sangue (Stuart H. Orkin e Leonard I. Zon, 2008; Lili Jing e Leonard I. Zon, 2011).

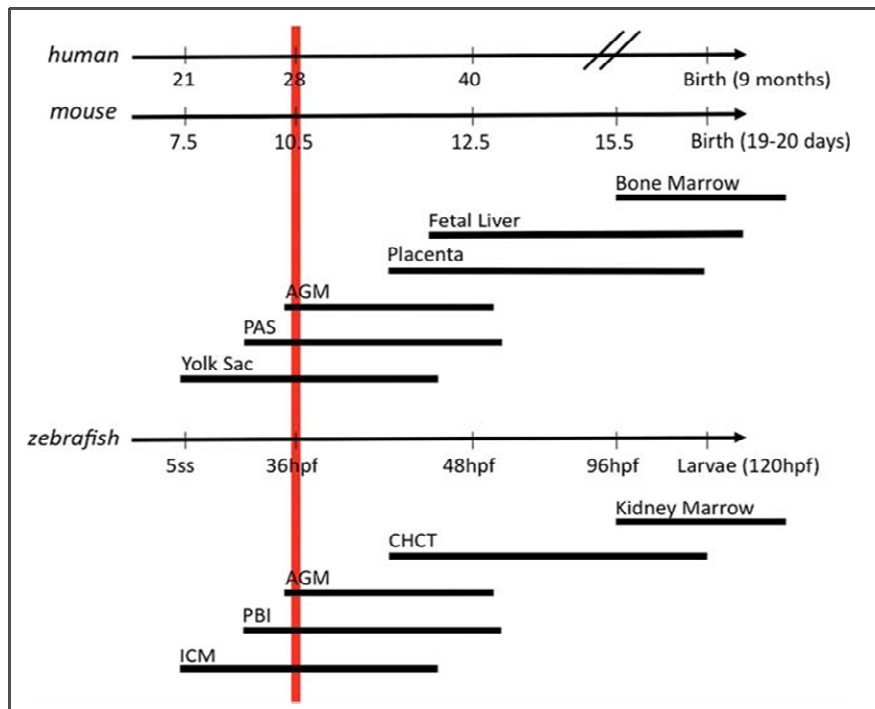


Figura 11. Comparação da hematopoese entre as espécies de vertebrados.

As várias fases da formação das células sanguíneas são definidas como ondas e ocorrem durante o desenvolvimento dos vertebrados. A ICM é equivalente ao saco vitelínico de mamíferos, A CHCT é equivalente ao fígado fetal ou placenta de camundongos. Já a medula renal equivale funcionalmente à medula óssea de mamíferos (Wolfram Goessling e Trista E. North, 2011).

- *Mutantes de zebrafish*

Os mutantes de *zebrafish* possibilitaram análises detalhadas dos passos que levam a formação e diferenciação de HSCs. Esses passos envolvem a formação da mesoderme e hemangioblastos, bem como diferenciação e manutenção das HSCs. Um conjunto de mutantes hematopóéticos foi obtido a partir de mutações espontâneas, rastreamentos mutagênicos, deleções alvo e transgênese induzida. Uma lista detalhada de mutantes hematopóéticos pode ser encontrada na revisão de Jong e Zon (2005).

A linhagem mutante *spadetail* (*spt*^{b104}), por exemplo, apresenta uma mutação no fator de transcrição T-box, *tbx16*, resultando em inúmeros defeitos em órgãos mesodermiais, como nas células hematopéticas, com diminuição da expressão de *tall*, *gata1*, *gata2*, *lmo2* e *fli1a*. Dados recentes sugerem que o *tbx16* pode regular a formação da mesoderme e a hematopoese primitiva (Mueller *et al.*, 2010). A classe de mutantes de *zebrafish* *dino* (*din*^{t250}) apresenta alteração no padrão de formação dorso-ventral do embrião. Esses mutantes apresentam mutação nula no gene *chordin* de *zebrafish*. Durante a formação dorso-ventral do embrião, ocorre expressão desse gene na porção ventral e expressão do gene *bmp2b* no restante do embrião (Schulte-Merker *et al.*, 1997). Tal mutação ocasiona um fenótipo específico conhecido como ventralizado, isto é, os mutantes apresentam uma expansão ventral que dará origem, por exemplo, a tecidos sanguíneo e epidérmico (Hammerschmidt *et al.*, 1996b). Os mutantes *spadetail* e *dino* funcionam, dessa forma, como controles negativo e positivo, respectivamente, da expressão de um determinado gene de interesse na ICM por hibridização *in situ* (*WISH*).

- Duplicação em *zebrafish*

A compreensão da relação filogenética entre os genomas ajuda na orientação de estudos relacionados a características de desenvolvimento e comportamentais. Por exemplo, a relevância do modelo *zebrafish* para doenças em humanos depende do entendimento da semelhança genômica entre ambos os sistemas estudados. A relação entre genomas demanda a identificação de genes ortólogos, isto é, genes de duas espécies diferentes que são descendentes de um ancestral comum. Considerando que todos os genes dentro de um grupo de ortólogos possuem a mesma origem ancestral, a delimitação de um grupo deve facilitar a transferência de informações bioquímicas,

estruturais e funcionais de uma proteína para outra dentro de um mesmo grupo (Tatusov *et al.*, 1997).

Os biólogos podem inferir as relações de ortologia usando a filogenia (Felsenstein, 1978). Contudo, essas relações entre *zebrafish* e outros organismos não são tão claramente identificadas devido ao processo de duplicação gênica durante a evolução dos peixes teleósteos. A duplicação gênica é um processo essencial na diversificação e adaptação de organismos durante o processo de evolução, uma vez que genes duplicados representam adição de variabilidade sob a qual agem forças evolutivas, como mutação e seleção natural, que podem levar ao surgimento de novas funções (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000).

No caso de *zebrafish*, atenta-se para a evolução dos peixes teleósteos. Durante a evolução dos cordados houve três grandes eventos de duplicação, dois deles compartilhados por *zebrafish* e humanos e um deles, ocorrido antes da última radiação entre os peixes teleósteos (Woods *et al.*, 2005; Postlethwait, 1999). A duplicação do genoma de *zebrafish* contribuiu para o aumento da dificuldade na construção de um mapa genético apurado para este organismo, em comparação a camundongos e humanos, por exemplo. Em virtude desta tetraploidização, o *zebrafish* apresentará, frequentemente, dois genes que são ambos ortólogos de um único gene em mamífero (Postlethwait, 1999).

- Métodos genéticos para estudo da hematopoese em zebrafish

a-) Morpholinos

O silenciamento do mRNA para um gene específico de interesse pode ser obtido, em *zebrafish*, através do uso de sequências de oligômeros RNA anti-sense específicas, os *morpholinos* (Nasevicius e Ekker, 2000). Os *morpholinos* (MO) são oligômeros quimicamente modificados (figura 12), com tamanho aproximado de 25 nucleotídeos. No lugar de uma base ribose, existe uma base *morpholino* e ao invés de uma ligação fosfodiéster, existe uma ligação fosforodiamidato, a qual é mais resistente a fosfatases, permitindo maior tempo de atividade anti-sense *in vivo*.

O silenciamento de um gene de interesse é obtido pelo MO-alvo através de duas formas: bloqueando o início do sítio de tradução ou as junções de *splicing* do gene-alvo, neste último, atuando diretamente no processamento do mRNA. A ação dos *morpholinos* é transitória, as micro-injeções são realizadas em embriões com uma ou duas células e podem gerar toxicidade dose-dependente (Heasman, 2002). Os embriões injetados produzidos são chamados de *morphants* e são então avaliados fenotipicamente para perda de alguma função de interesse.

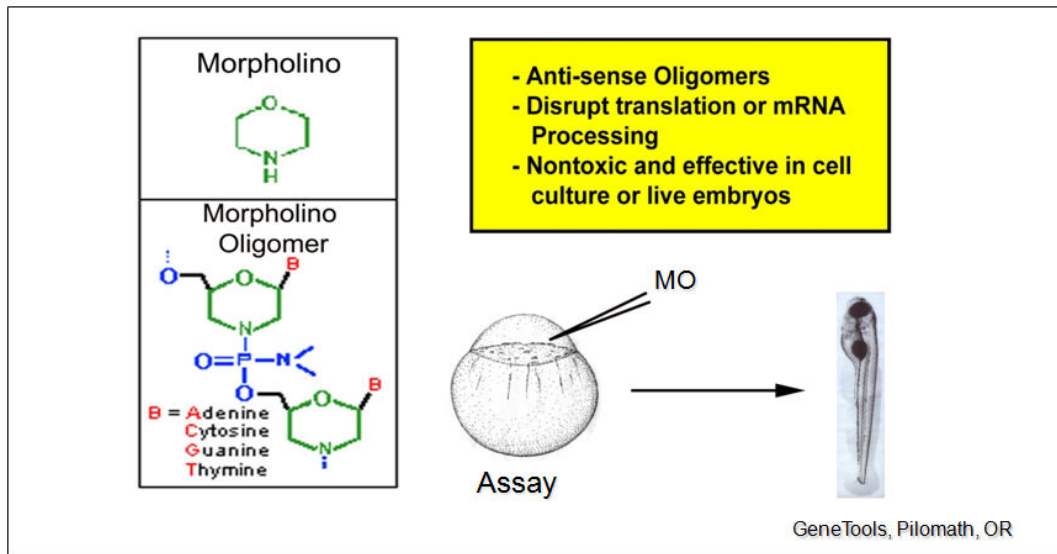


Figura 12. Estrutura do *Morpholino* e aplicação da microinjeção.

Os MOs são oligômeros quimicamente modificados, possuindo maior estabilidade no organismo-alvo. O knockdown do gene de interesse pode ser obtido por modificação no sítio de tradução ou nas junções de splicing. A microinjeção se dá no estágio de 1 ou 2 células do embrião.

b-) Linhagens transgênicas repórteres

Microinjeções de construtos de DNA em uma única célula fertilizada de um embrião de *zebrafish* permitiu a geração de *zebrafish* transgênicos. O uso de proteínas fluorescentes, como GFP e a ligação destas ao promotor de um gene de interesse permitiu a obtenção de vetores repórteres transgênicos tecido-específicos. A linhagem transgênica de *zebrafish* Tg(globin-LCRreGFP) (figura 13) (Ganis *et al*, 2012) apresenta o gene repórter GFP ligada ao locus LCR do promotor do gene da globina e pode, dessa forma, ser utilizada para a quantificação de eritrócitos por FACS *sorting*.

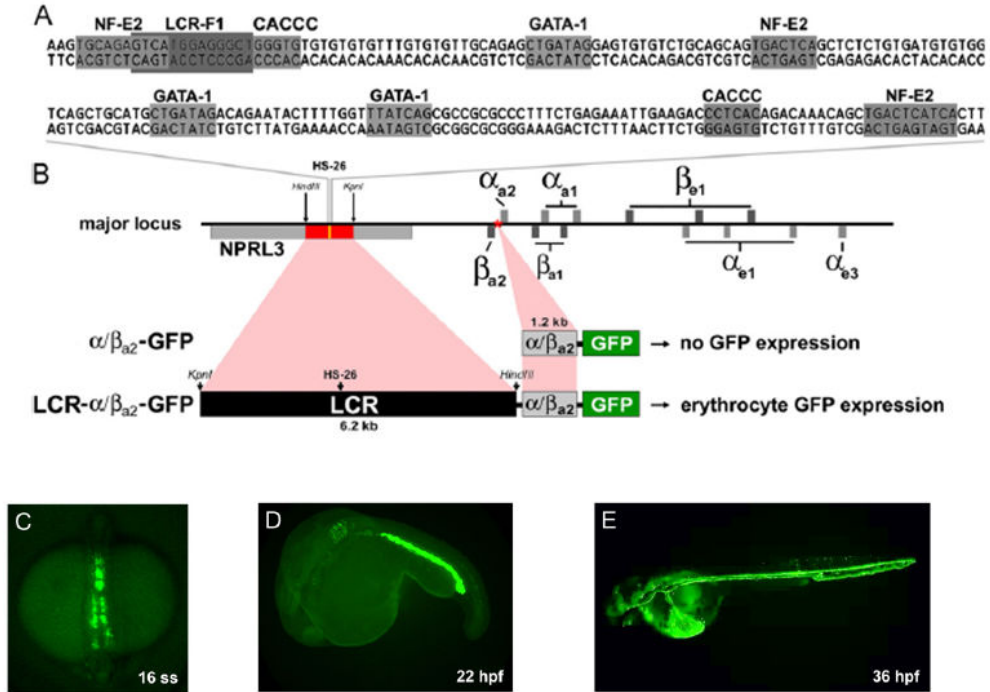


Figura 13. Geração e caracterização da linhagem de zebrafish LCR:GFP.

A linhagem transgênica de zebrafish Tg (globin-LCR:GFP) apresenta o gene repórter GFP ligado ao locus LCR do promotor do gene da globina e pode ser utilizada para a quantificação de eritrócitos por *FACS sorting* (Ganis *et al*, 2012).

1.7-) SAGE e genes com potencial participação na eritropoese

Diante do exposto, o melhor entendimento da eritropoese pode ajudar a elucidar mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia e tratamento das doenças hematológicas. Uma das formas de se melhor compreender um mecanismo como a diferenciação eritroide é avaliar a expressão gênica global durante esse processo.

Um método que pode ser empregado no estudo de expressão gênica diferencial é o da Análise Serial da Expressão Gênica (*Serial Analysis of Gene Expression*). Este método foi descrito por Velculescu e colaboradores (Velculescu *et al.*, 1995) e através dele é possível obter o perfil de todos os genes expressos em um determinado tecido ou tipo celular em diferentes condições, além de possibilitar a quantificação da expressão desses genes (Stollberg *et al.*, 2000; Velculescu *et al.*, 1995).

Para isso, utilizando a técnica SAGE, a partir de uma cultura de duas fases, Cunha e colaboradores, em nosso grupo de pesquisa, identificaram 93 genes diferencialmente expressos durante a diferenciação eritroide (Cunha *et al.*, 2010). Dentre estes genes, três deles, os genes *EYA3*, *HES6* e *LXN* se mostraram mais expressos nas fases intermediária e final da diferenciação, bem como apresentaram expressão em tecidos hematopoéticos.

O gene *EYA* (*Eyes Absent*) foi primeiramente descrito como um componente na maquinaria de reguladores de transcrição no desenvolvimento do olho de *Drosophila*. Em mamíferos, são encontrados 4 tipos de proteínas EYA (1-4). Sabe-se hoje, que o gene *EYA3* (*Eyes Absent homolog 3*) está envolvido no desenvolvimento de órgãos e tecidos dos mais diversos organismos, atuando como um fator de transcrição (Jemc & Rebay, 2007). O *EYA* é o primeiro exemplo de fator de transcrição com atividade de fosfatase intrínseca (Rayapuredi, 2003; Tootle, 2003 e Li, 2003). Krishnan e colaboradores (Krishnan, 2009) mostraram que o *EYA3* funciona como uma proteína

tirosina fosfatase na desfosforilação do resíduo Tyr-142 da Histona H2A.X, atuando no reparo do DNA, apoptose e carcinogênese. Um fato ainda a ser considerado é que os genes *EYA1* e *EYA2* foram identificados em famílias hematopoéticas primordiais (Terskikh, 2003), porém nada foi descrito com relação ao *EYA3*. Estudos de camundongos *Knockout* para o gene *EYA3* realizados por Söker e colaboradores mostram uma leve anemia nos animais cujo gene foi suprimido (dados obtidos através de contato com o grupo responsável pelo trabalho).

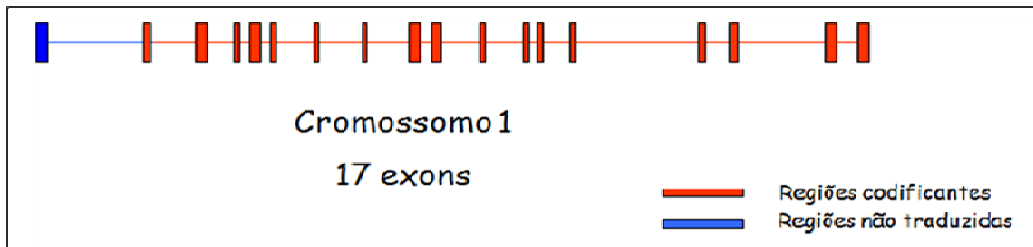


Figura 14. Esquema do gene *EYA3* humano.

O gene humano *EYA3* (NM_001990.3) está localizado no cromossomo 1, apresenta 17 éxons e o cDNA total contém 6040 pares de bases.

O gene *HES6* (*Hairy and Enhancer of Split 6*), também homólogo de *Drosophila*, é um fator de transcrição pertencente à família bHLH e atua em processos de diferenciação do córtex neural (Gratton *et al.*, 2003) e de células mioblásticas (Gao *et al.*, 2001). Estudos ainda mostram a participação do gene *HES6* no controle da proliferação celular via interação com c-AMP no corpo celular na leucemia promielócita (Eun *et al.*, 2008) e ainda é diferencialmente expresso durante a metástase do carcinoma de colon (Swearingen, 2003).

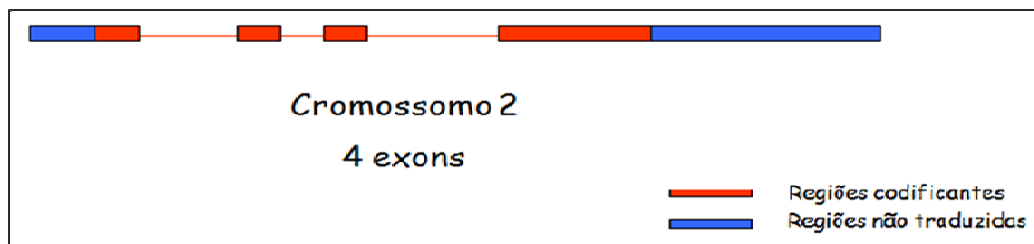


Figura 15. Esquema do gene humano *HES6*.

O gene humano *HES6* está localizado no cromossomo 2 e apresenta 4 éxons. Apresenta 2 isoformas: a primeira, NM_001142853.1 contém 1380 pares de bases e a segunda, NM_018645.4 contém 1386 pares de bases.

O gene *LXN*, por sua vez, corresponde a uma latexina, uma carboxipeptidase inibidora de metalocarboxilases dependentes de zinco. A latexina foi originalmente identificada no neocórtex lateral de cérebros de ratos, funcionando como um marcador de regionalidade e desenvolvimento do sistema nervoso central e periférico (Arimatsu, 1994; Hatanaka *et al.*, 1994). Esse gene também é expresso em outros tecidos, que incluem órgãos hematopoéticos e linfóides (Liu Q *et al.*, 2000). Funcionalmente, a latexina é a única inibidora de carboxipeptidase (CPI) em mamíferos. É uma inibidora poderosa da carboxipeptidase A (CPA) (Uratani *et al.*, 2000; Aagaard *et al.*, 2005). Estudos mostraram que essa proteína influencia no tamanho da população de células pluripotentes hematopoéticas de camundongos: é menos expressa quanto maior o número de HSC (Liang *et al.*, 2007). Esse mecanismo de atuação ocorre de duas diferentes formas: diminuindo a proliferação de células hematopoéticas pluripotentes e aumentando a apoptose dessas. Dessa forma, a latexina pode estar envolvida no tempo de duração das células no sistema hematopoético. Estudos recentes ainda indicam que a latexina mantém a abundância de múltiplas proteínas celulares, incluindo aquelas relacionadas na interação de HSCs (N-cadherin, Tie2 e Robo4) com o nicho de células progenitoras hematopoéticas (Mitsunaga *et al.*, 2012).



Figura 16. Esquema do gene *LXN*.

O gene humano *LXN* (NM_020169.3) está localizado no cromossomo 3, apresenta 6 éxons e o cDNA contém 1132 pares de bases.

Por se tratar de genes cujas funções em células hematopoéticas ainda não foram descritas na literatura, os genes *EYA3*, *HES6* e *LXN* são candidatos potenciais no estudo de suas possíveis atuações na eritropoese humana. Uma das formas de se melhor compreender a função de um gene ou proteína em um organismo ou cultura de células é o silenciamento do gene-alvo de interesse e análise dos fenótipos obtidos em decorrência da diminuição de sua expressão. Em linhagens estabelecidas e culturas primárias *in vitro*, a interferência de RNA (RNAi/siRNA) permite reduzir de forma específica a expressão pós-transcricional dos genes alvo e avaliar as modificações obtidas em decorrência do silenciamento gênico. Em modelos *in vivo* como o *zebrafish*, a técnica de microinjeção de *morpholinos* permite um silenciamento específico e eficiente do gene de interesse. Dessa forma, uma das propostas desse trabalho é analisar funcionalmente os genes *EYA3*, *HES6* e *LXN* nos modelos *in vitro* de cultura de células, CD34⁺ e K562 e no modelo *in vivo*, *zebrafish*.

1.8-) Outros genes de interesse na eritropoese: CLPX, TRAK e GFI

Outro gene que parece estar envolvido na produção de células eritroides é o CLPX (*caseinolytic peptidase X*). As pesquisadoras do MIT (*Massachusetts Institute of Technology*) Julia Kardon e Tania Baker mostraram que o gene CLPX apresentava o

mesmo padrão de expressão do gene transportador de glicina da mitocôndria, SLC24A38, em *Microarray* de fungos (dados obtidos em colaboração com o grupo).

O gene CLPX codifica a proteína *caseinolytic peptidase X*, que é altamente conservada e apresenta função de chaperona dependente de ATP. Já o transportador de glicina SLC25A38 pertence à família SLC25 de proteínas transportadoras mitocondriais (Haitina *et al.*, 2006). No modelo *zebrafish*, o silenciamento de dois ortólogos funcionais de SLC25A38, Slc25a38a e Slc25a38b, resultou em embriões com anemia (Guernsey *et al.*, 2009). Em fungos, a deleção do possível gene ortólogo, YDL119c, causou defeito na respiração, dados esses que sugerem defeito na biossíntese de heme. Adicionalmente, as análises bioquímicas sugeriram que SLC25A38 facilitaria a produção de ALA ao transportar a glicina para dentro da mitocôndria ou, ao trocar glicina por ALA através da membrana interna mitocondrial (Guernsey *et al.*, 2009). Dessa forma, com o objetivo de melhor compreender a função do gene CLPX, as pesquisadoras do MIT, através de *knockout* desse gene em fungos, identificaram defeito no heme. As análises bioquímicas realizadas sugeriram que o gene CLPX pode ter sua função complementada à glicina na síntese do heme. Tendo em vista a possível participação do gene CLPX na biossíntese do heme, o silenciamento desse gene no modelo *zebrafish* pode fornecer informações adicionais a respeito da função desse gene num organismo vertebrado.

Outro gene de interesse a respeito de sua função durante a eritropoese é o *TRAK2*. Trata-se da *Trafficking Protein, Kinesin-Binding 2*, envolvida no movimento da mitocôndria ao longo dos microtúbulos. Os resultados obtidos pelo grupo do pesquisador Jeffrey Miller, M.D. (NIH/NIDDK) mostraram envolvimento desse gene na eritropoese (dados obtidos por colaboração com o grupo):

- A expressão de *TRAK2* é altamente regulada durante a eritropoese;

- Em eritroblastos primários, o silenciamento de *TRAK2* causou uma pequena diminuição em eritroblastos imaturos CD36⁺ no 7º dia de cultura;
- O silenciamento de *TRAK2* causou uma diminuição severa na proliferação de eritroblastos;

Esses resultados sugerem que a expressão de *TRAK2* é necessária para a diferenciação eritroide. O interesse, dessa forma, é utilizar um modelo *in vivo* que demonstre a participação desse gene no processo de eritropoese, confirmando assim, sua importância já demonstrada no modelo de cultura primária de células.

Finalmente, os últimos genes considerados nesse trabalho são os fatores de transcrição de *zebrafish gfilaa*, *gfilab* e *gfilb*, ortólogos aos fatores de transcrição da família *Grow Factor Independence (GFI)* em humanos. Os genes humanos *GFI1A* e *GFI1B* são membros da família de fatores de transcrição do tipo *zinc-finger*. Esses genes, em mamíferos, participam do processo da hematopoese através da regulação de HSC e diferenciação das diversas linhagens hematopoéticas (van der Meer *et al.*, 2010).

A perda de *Gfila*, em camundongos, acarreta neutropenia, bloqueio na diferenciação mieloide e deficiência no desenvolvimento de células T (Schmidt *et al.*, 1998; Karsunsky *et al.*, 2002). Adicionalmente, pacientes com mutações dominantes no gene *GFI1A* sofrem de anemia congênita severa (Person *et al.*, 2003). Já a perda de *Gfilb*, em camundongos, implica o bloqueio na maturação de megacariócitos e morte desses animais ainda no útero durante a transição da eritropoese primitiva para a definitiva. Esses dados sugrem que o gene *Gfilb* tem papel importante na diferenciação de progenitores para linhagens megacariocítica e eritroide (Saleque *et al.*, 2002). Alguns estudos em outros modelos têm sido realizados para melhor caracterizar o papel desse gene na hematopoese (Randrianarison-Huetz *et al.*, 2010). Dessa forma, o modelo

zebrafish também foi utilizado neste trabalho para melhor caracterizar a função dos fatores de transcrição GFI na hematopoese.

2-) OBJETIVOS

2.1-) Gerais:

- Analisar funcionalmente os genes *EYA3*, *HES6*, *LXN*, *CLPX*, *TRAK* e *GFI* utilizando modelos *in vivo* e *in vitro* com foco em sua potencial participação na eritropoese.

2.2-) Específicos:

- Avaliar o padrão de expressão dos genes *EYA3* e *LXN* durante a diferenciação eritroide em cultura primária a partir de células CD34⁺ em amostras de indivíduos controle;
- Avaliar o padrão de expressão dos genes *EYA3* e *LXN* em cultura de células da linhagem K562 após diferenciação eritroide induzida por hemina;
- Determinar o perfil de expressão gênica das globinas alfa e gama e proteica da HbF após o silenciamento dos genes *EYA3* e *LXN*, em linhagem K562;
- Analisar a expressão gênica de marcadores eritroides e de fatores de transcrição envolvidos na hematopoese em células K562 silenciadas;
- Identificar genes ortólogos em *zebrafish* para os genes *EYA3*, *HES6* e *LXN* humanos;
- Análisar a expressão dos genes *eya1*, *eya2*, *eya3*, *eya4*, *hes6*, *hes13* e *lcn* por *WISH* (Hibridização *in situ*) em embriões de *zebrafish* com idade de 24 horas (24hpf: 24 hours post fertilization);
- Silenciar o gene *lcn* em *zebrafish* e analisar os *morphants* gerados;
- Analisar o padrão de expressão dos genes *EYA3* e *LXN* em amostras de reticulócitos de pacientes com anemia falciforme (SS), talassemia beta intermediária (TI) e controles;

- Determinar o padrão de expressão dos genes *clpx1* e *clpx2* em embriões de *zebrafish*, promover o silenciamento para esses genes e analisar os *morphants* obtidos nesse modelo;
- Determinar o perfil de expressão dos genes *trak1.1*, *trak1.2*, *trak1.3* e *trak2* em embriões de *zebrafish*, gerar o silenciamento transiente para o gene *trak1.1* e analisar os *morphants* gerados nesse modelo;
- Analisar o papel dos genes *gf1aa* e *gf1b* no funcionamento das HSCs através do silenciamento desses em *zebrafish*.

3-) ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP, CEP nº 715/2008, segundo as determinações do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções 196/96 e 251/97). Todos os pacientes envolvidos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) contendo os procedimentos da pesquisa; os desconfortos e riscos possíveis e benefícios esperados, a garantia do sigilo que assegure a privacidade quanto aos dados confidenciais; a liberdade de abandonar a pesquisa em qualquer tempo sem ter sua assistência médica comprometida, o nome e telefone dos pesquisadores para esclarecer eventuais dúvidas, bem como o telefone do Comitê de Ética em Pesquisa. A carta comprobatória de submissão e aprovação desta pesquisa no CEP encontra-se no material anexo, juntamente com uma cópia do TCLE.

Todos os estudos relacionados à utilização de *zebrafish* foram conduzidos segundo orientação e aprovação do *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) no Children's Hospital Boston.

- Casuística

Para o estudo realizado, foram selecionados 8 pacientes com diagnóstico de anemia falciforme (SS) e 5 pacientes diagnosticados com talassemia beta intermediária (mutação IVS1-6) provenientes do Hemocentro da UNICAMP. Esses pacientes apresentavam idade entre 18 e 50 anos. Os indivíduos controle consistiram de voluntários sadios com idade entre 18 e 50 anos.

4-) MATERIAIS E MÉTODOS

4.1-) Cultura de células CD 34⁺ hematopoéticas de sangue periférico

Separação de células mononucleares:

Amostras de sangue periférico de três indivíduos normais foram coletadas em tubo contendo heparina lítica e processadas imediatamente após a coleta. As amostras foram diluídas 1:2 em solução de PBS+ACD+BSA e em seguida colocadas em gradiente de Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Uppala Sweden) por 30 minutos à 317g em temperatura ambiente. A camada formada na interface (*buffy coat*) foi coletada e as células lavadas em PBS+ACD+BSA. Em seguida, as células foram lisadas em tampão de lise para hemácias por 15 minutos em gelo e centrifugadas por 5 minutos a 361g. Novamente as células foram lavadas em PBS e ressuspensas para contagem em câmara de Neubauer.

Isolamento de células CD34⁺ de sangue periférico:

Após a contagem das células, estas foram incubadas com *FcR Blocking Reagent* e *Hapten-Antibody* por 15 minutos e após lavagem, incubadas com *Anti-Hapten MicroBeads*, segundo as orientações do fabricante (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). Após o tempo de incubação, as células foram lavadas, ressuspensas em PBS e passadas por uma coluna magnética LS (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) fixada em um suporte magnético. As células de interesse para o nosso estudo ficaram presas à coluna enquanto as contaminantes (monócitos e linfócitos) foram coletadas em tubo falcon. Em seguida, a coluna foi retirada do suporte magnético e uma leve pressão foi realizada através de um êmbolo para fazer com que as células CD34⁺ se soltassem da coluna e pudessem ser coletadas em um novo tubo. As células CD34⁺ foram então lavadas com PBS+ACD+BSA por 10

minutos a 203g e ressuspendidas em 1mL de PBS+ACD+BSA para contagem em câmara de Neubauer. As células CD34⁺ de pacientes de indivíduos controle foram marcadas com fluoróforo RPE (*anti-mouse imuoglobulins RPE, Rabbit F (ab') 2*) para citometria de fluxo, para verificar a pureza das células obtidas. Lâminas de *citospin* coradas com Leishman foram preparadas para verificação da morfologia celular. A viabilidade celular foi analisada por meio da técnica de azul de trypan, sendo superior a 90% em todos os pontos coletados neste trabalho.

Cultivo das células CD34⁺

As células CD34⁺ foram cultivadas em metil celulose Methocult TM H-4230 (Stem Cell Technologies Inc, Vancouver, British Columbia, Canadá). Para cada um mL de metil celulose foram cultivadas 3.103 células CD34⁺, acrescidas de 50 ng de *Stem cell factor* (SCF; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN), três unidades de Eritropoetina (Epo; Vetter Pharma Fertigung GmbH, Ravensburg, Alemanha) e 30 UI de interleucina 3 (IL-3; Pepro Tech México, S.A. de C.V.). A metil celulose foi pipetada em placa de 6 poços na concentração de um mL por poço em atmosfera úmida no interior da placa. A placa foi incubada por sete dias em estufa de CO₂ - 5%, a 37°C (Fase I). Após sete dias as colônias formadas por unidades formadoras de colônias eritróides (CFU-E) e proeritroblastos foram coletadas, lavadas, ressuspendidas em meio Minimum Essential Medium Alpha (Alpha MEM; GIBCO™ Grand Island, N.Y., USA) e contadas em câmara de Neubauer. Nesse momento, foram coletadas células para extração de RNA total, citometria de fluxo e citospin. O restante das células foi colocado novamente em cultivo, agora em fase líquida, tendo como base o meio Alpha MEM (Fase II). Na Fase II utilizamos 30% de soro fetal bovino (SFB), 8% de albumina sérica bovina (BSA), 300 mg/mL de holotransferrina humana (Calbiochem, USA), 10⁻⁵M de β –

mercaptoetanol (Sigma Chemical CO, St. Louis, USA) e 2 unidades de Epo. As células foram cultivadas novamente em 5% CO₂ a 37°C (Croisille et al., 1999). Além do dia 7, foram coletadas células no dia 10 e 13 da fase II para extração de RNA total. A diferenciação eritróide foi acompanhada por citometria de fluxo e a morfologia por *citospin* corado com Leishman. A viabilidade celular da fase I e II foi analisada por meio da técnica de azul de trypan.

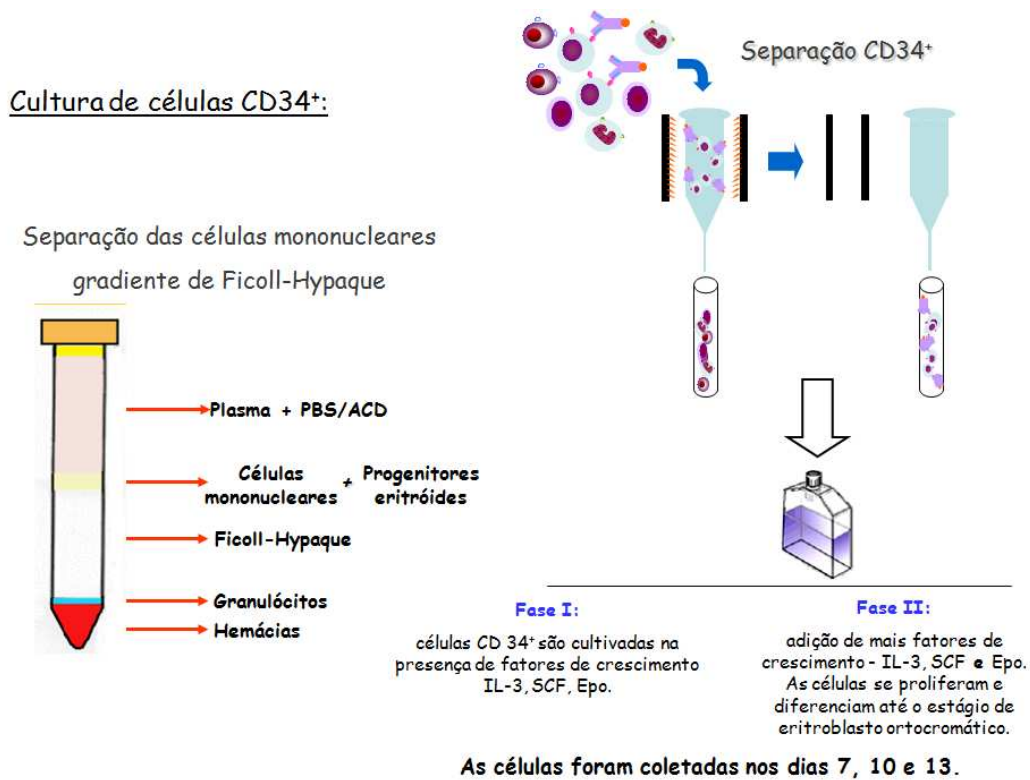


Figura 17. Esquema que representa a cultura de células CD34⁺.

4.2-) Cultura de Linhagem K562

Garrafas de cultura (Nunc, Naperville, IL, USA) contendo 1×10^7 células por 75cm^2 da linhagem celular humana eritroleucêmica K562 obtidas da American Type Culture Collection (ATCC; catálogo número CCL-243) foram mantidas em meio DMEM (GibcoBRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100U/ml penicilina (GibcoBRL) e 100mg/ml streptomomicina (Gibco BRL). As culturas foram mantidas em atmosfera umidificada a 5% CO_2 e temperatura de 37°C . As transduções de DNA foram realizadas através de lentivírus de acordo com as recomendações do fabricante. Após a transfecção pelo lentivírus, as células K562 foram divididas em 3 grupos, cada um avaliado em 3 experimentos independentes. O grupo 1 é representado pelas células não transduzidas (células controle) e os grupos 2 e 3 são respectivamente representados por células transduzidas com plasmídeo sem a sequência de RNA interferente (células controle negativo) e células transfectadas com o plasmídeo que expressa shRNAs ou para *EYA3* ou *LXN* (células EYA3-shRNA ou células LXN-shRNA). Após a transfecção, $2,0\mu\text{g/mL}$ de puromicina foram adicionados ao meio de cultura. Depois da morte total do grupo 1, avaliada por Azul de Trypan (0.4% w/v, Gibco), $30\mu\text{M}$ do substrato Hemina (Sigma) foram adicionados ao meio de cultura para induzir a expressão de genes da linhagem eritroide. Durante a cultura destes grupos celulares, amostras foram coletadas em 6 pontos específicos: uma amostra para confirmar o silenciamento, 0h sem Hemina, 24h, 48h, 72h e 96h após a adição de Hemina. A figura 18 demonstra o esquema da cultura eritroleucêmica K562 e tratamento desta com o composto indutor de HbF Hemina. A morfologia das células foi analisada nestes pontos através de lâminas de cito-spin coradas com Leishman, a viabilidade através da coloração com azul de trypan em câmara de Neubauer e a produção de Hemoglobina fetal por citometria de fluxo.

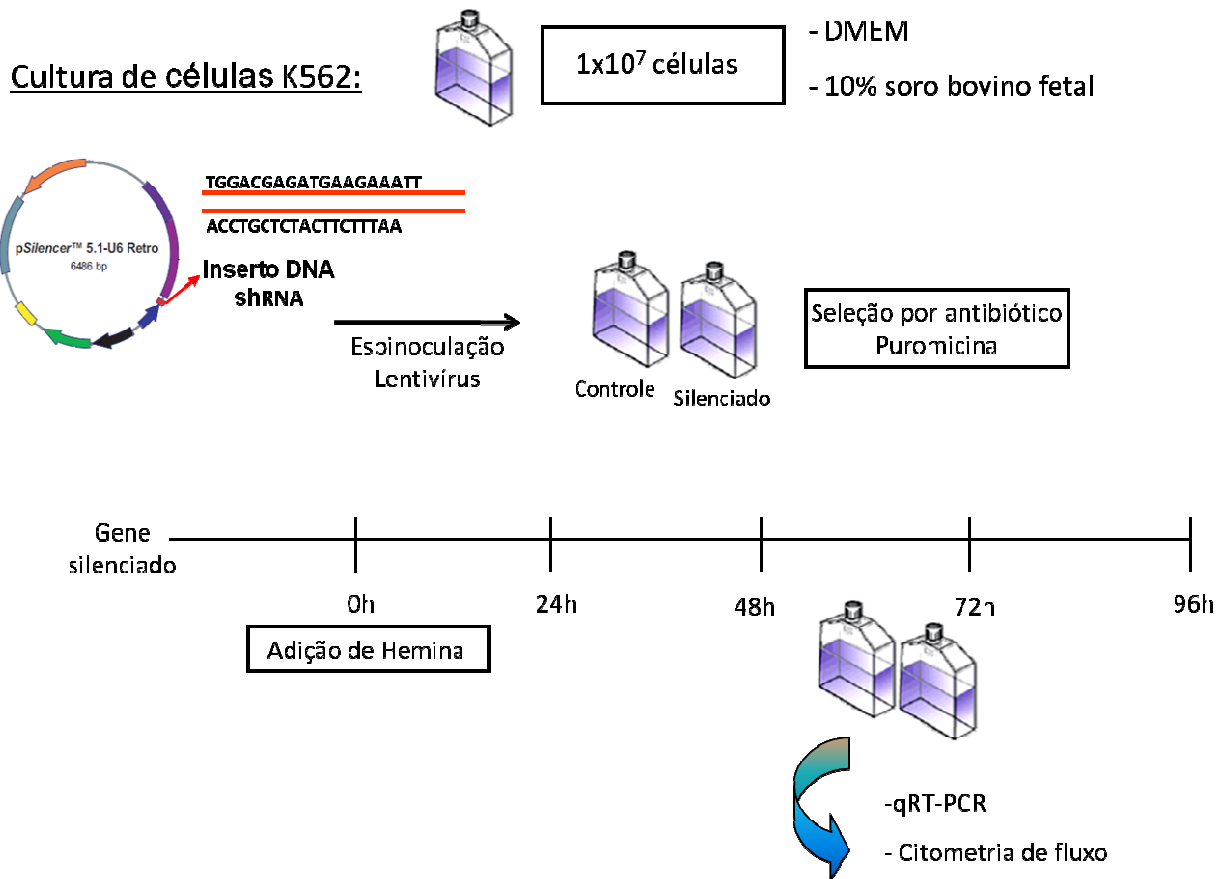


Figura 18. Esquema que representa a cultura de células K562 e tratamento com Hemina.

Após esp inoculação e seleção das células positivas para o plasmídeo com o incerto interferente de interesse, as células foram tratadas com o composto indutor de HbF, Hemina, em um ponto denominado 0h. As coletas das amostras de células foram realizadas nos pontos 0h sem Hemina, 24, 48, 72 e 96h com Hemina.

4.3-) Transsdução por meio de lentivírus

Para a transdução do plasmídeo contendo a molécula interferente para os genes de interesse por meio de lentivírus foi utilizado o Kit shRNA (h) Lentiviral Particles (Santa Cruz). As partículas lentivirais estão prontas para o silenciamento do gene de interesse, pois são providas de 3-5 construções plasmidiais com inserto de sequências-alvo específicas. Tais insertos são formados por 19-25

nucleotídeos para o silenciamento do gene de interesse. Da mesma forma, as partículas controle, apresentam plasmídeos semelhantes, porém sem o inserto interferente. A figura 18 representa o processo de transdução pelas partículas virais e o mecanismo de ação do RNA de interferência. Para o processo de transdução foram utilizados 20 μ l de vírus (estoque de 200 μ l, 1×10^6 unidades virais de infecção) para 2×10^5 células em 2ml de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Para a melhor interação entre a partícula viral e a célula a ser transduzida foi utilizado o reagente Polibreno a 3 μ g/ml. Após esses compostos serem adicionados, foi realizado o processo chamado de espinoculação: O recipiente contendo o meio, as células, as partículas virais e o polibreno foi centrifugado a 800g, 25°C por 1 hora. Após a centrifugação, o material foi incubado por 4h em estufa 37°C/5%CO₂. Prosseguiu-se a uma nova centrifugação a 1500rpm, 25°C por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e as células de interesse foram ressuspensas em 500 μ l de meio de cultura e soro fetal bovino e deixado na estufa 37°C/5%CO₂ por 72h. Posteriormente foi adicionado o antibiótico puromicina para a seleção das células que apresentavam o plasmídeo de interesse. A figura 20 mostra o esquema do processo de espinoculação em células K562.

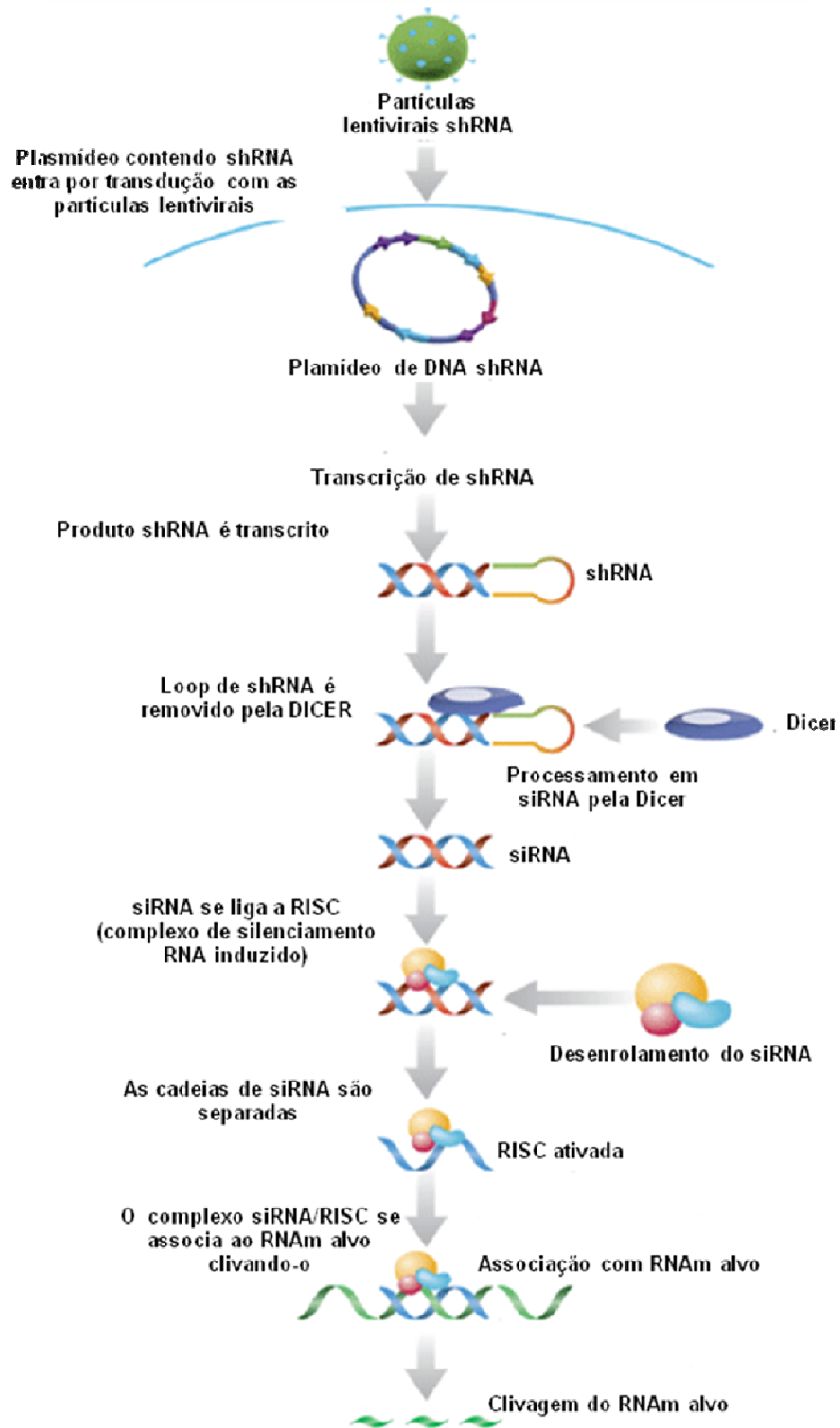


Figura 19. Mecanismo de ação da interferência de RNA a partir de shRNAs.

**Transdução de lentivírus em células em suspensão:
ESPINOCULAÇÃO**

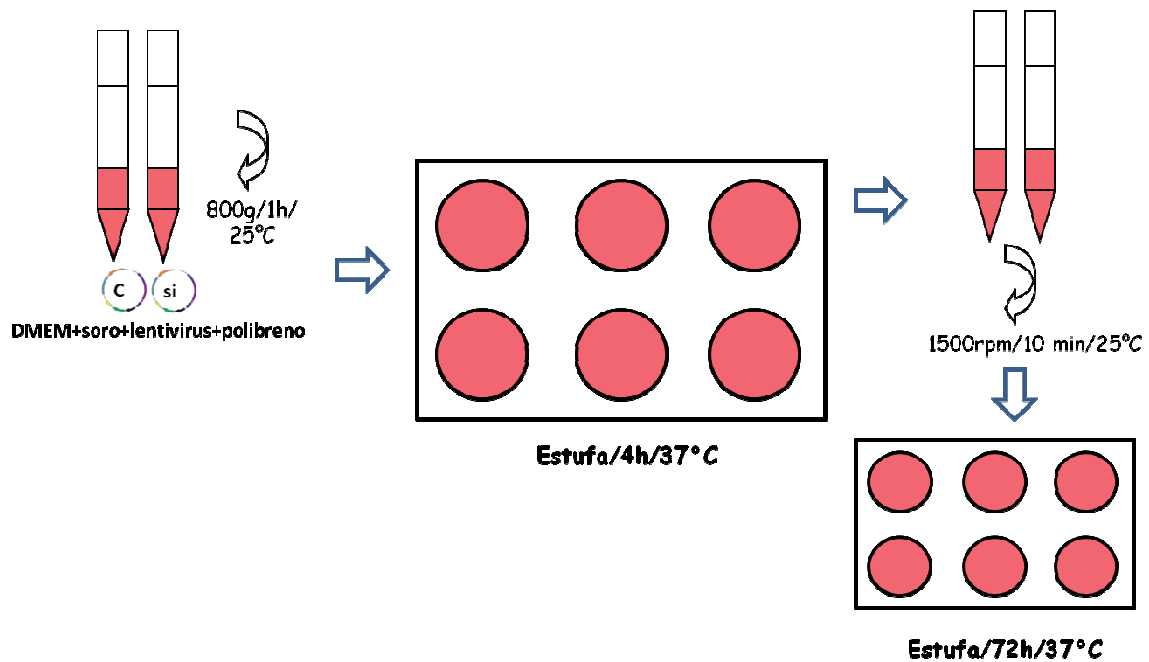


Figura 20. Transdução de lentivírus em células K562, Espinoculação.

As células K562 são primeiramente centrifugadas juntamente com meio, soro, partículas virais e polibreno e incubadas em estufa. Posteriormente, procedeu-se nova centrifugação e incubação por 72h, quando foi adicionado antibiótico puromicina para seleção das células positivas para o plasmídeo de interesse.

4.4-) Citometria de fluxo

A técnica de citometria de fluxo consiste no reconhecimento de proteínas *in situ*, com um anticorpo marcado com um fluorocromo, comumente ficoeritrina (PE) ou fluoresceína isotiocianato (FITC). Estes fluorocromos ao serem estimulados por um feixe de laser emitem um fóton que é captado por sensores no aparelho. O citômetro de fluxo faz análises qualitativas (quantas células expressam este produto) e quantitativas (quanto de certo produto é expresso por célula) da mesma amostra (Owens *et al.*, 1995).

A especificidade eritroide foi acompanhada através da técnica de citometria de fluxo utilizando os seguintes anticorpos (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) de superfície celular: Anti-receptor de Transferrina (conjugado com FITC) (CD 71): marcador de células eritroides jovens; Anti-Glicoforina A (conjugado com PE): marcador de células eritroides maduras. Como controle negativo, foi utilizado um isotipo controle não relacionado (Ig G; Caltag Laboratories, Burlingame, CA).

Para a marcação citoplasmática foi utilizado o anticorpo: Anti – Hemoglobina fetal (conjugado com FITC) para acompanhar a produção de hemoglobina fetal durante o processo de diferenciação celular. Antes da marcação com o anticorpo anti-Hemoglobina fetal foi realizada a permeabilização das membranas citoplasmáticas das células eritroides com o Kit Fix & Perm (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) e em seguida a marcação com o anticorpo.

Para avaliar a apoptose, foi utilizado o anticorpo Anexina V (FITC), cuja marcação é indicativa de morte celular recente por apoptose, em conjunto com o anticorpo Iodeto de Propídio ou PI, que identifica estágios finais de morte celular, resultando em processos necróticos ou apoptóticos.

Para todos os anticorpos de superfície celular citados anteriormente a concentração de células utilizadas variou de 1.10^4 a 1.10^5 células por tubo num volume final de 100 μ l em PBS. As células foram então incubadas com 3-5 μ l dos anticorpos por 30 minutos a 4°C, na ausência de luz. Em seguida, estas foram lavadas com 500 μ l de PBS, centrifugadas a 203g por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 500 μ l de PBS. As células foram conservadas a 4°C, ao abrigo da luz, até a hora da aquisição pelo citômetro. As células marcadas com anticorpo anti-hemoglobina fetal tiveram, primeiramente, suas membranas fixadas por 15 minutos pela Solução A e após lavagem com PBS, foi adicionado a Solução B para

permeabilização das mesmas. Depois disso, o anticorpo foi adicionado num volume de 3 µl, incubado por 30 minutos a 4°C, na ausência de luz. As células foram lavadas com PBS e o *pellet* ressuspensionado em 500 µl. As células foram conservadas a 4°C, ao abrigo da luz, até a hora da aquisição pelo citômetro. Já as células marcadas com Anexina/PI, após lavagem com tampão do fabricante diluído 10X, foram marcadas por 15 minutos com 5 µl de cada anticorpo na ausência de luz e, imediatamente, foi realizada a leitura pelo citômetro.

As células foram analisadas a 488 nm em um FACScalibur Becton-Dickinson. *Dot plots* foram utilizados para análise dos dados obtidos. A intensidade da fluorescência de cada célula foi comparada com as células incubadas com um controle isotipo (Ig G).

4.5-) Extração de RNA

As amostras de RNA foram extraídas com Kit comercial – Rneasy Mini e Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden) segundo as instruções do fabricante. Optamos pelo uso do Kit, uma vez que a quantidade de células disponíveis não era abundante. Além disso, a pureza e a qualidade do RNA eram fundamentais para o sucesso da transcrição destas amostras.

A integridade das amostras foi verificada por eletroforese em gel desnaturante de agarose a 1,2%. As amostras íntegras apresentaram duas subunidades ribossomais: 18S e 28S. As amostras de RNA foram armazenadas em freezer - 80°C.

4.6-) Síntese de cDNA

A concentração do RNA foi determinada com o aparelho NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies, USA) com valor padrão, 1 ABS 260nm = 40 ug/ml de RNA e o grau de pureza pela relação ABS 260/280nm, que deve estar na faixa de 1,8-2,1. As amostras de RNA obtidas foram submetidas à síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Life Sciences). Para transcrição, utilizou-se 3 µg de RNA que foram tratados com a enzima DNase I (Invitrogen, Life Technologies) para remoção de DNA contaminante. O tratamento com DNase consistiu na adição de 1,0 µl de 1u/µl DNaseI, 1,0 µl de 10x DNaseI *Reaction Buffer* (200mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl₂) e água suficiente para um volume final de 10,0 µl de reação. As amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e a reação bloqueada com a adição de 1,0 µl de 25 mM de EDTA com posterior incubação por 10 minutos a 65°C. Após essa etapa, iniciou-se a síntese do cDNA complementar com a adição de 1,0 µl de 50 µM Oligo(dT)₁₈ Primer, incubação por 5 minutos a 65°C. Posteriormente, foram adicionados 4,0µl de 5X Reaction Buffer, 2,0 µl de dNTP Mix, 10 mM, 1,0 µl de RiboLock™ RNase Inhibitor e 1,0 µl de RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase. A reação ocorreu por 60 minutos a 52°C, seguida de 5 minutos a 70°C.

4.7-) PCR quantitativo em tempo Real (qRT-PCR)

A expressão dos genes avaliados neste estudo foi analisada por PCR em tempo real (*Real-Time PCR* / qRT-PCR) em células K562 controle e tratadas com Hemina. Os primers foram desenhados com o uso do software *Primer Express* (Applied Biosystems) e estão dispostos na Tabela I.

Foram feitos testes para padronização da concentração e eficiência de cada conjunto de *primers*. A eficiência de amplificação é obtida da fórmula $10(-1/\text{slope})$, onde *slope* significa o coeficiente de inclinação da curva (Meijerink *et al.*, 2001). Os transcritos testados demonstraram altas taxas de eficiência no PCR em tempo real com mais de 99% para todos os *primers* utilizados (coeficiente de correlação de Pearson $r > 0.95$). A amplificação de β actina foi utilizada como um controle para determinar a quantidade e qualidade do cDNA produzido.

A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento *Step One Plus*® (Applied Biosystems) utilizando o reagente *SYBRGreen PCR Master Mix*® (Applied Biosystems), que além de conter todos os reagentes necessários para a realização de uma reação de PCR (*dNTPs*, *MgCl₂*, *Tampão*, *Taq Ampli-Gold*) contém também o corante *SYBRGreen*, componente intercalante de DNA dupla-fita necessário para a detecção da reação ciclo a ciclo pelo equipamento acima citado.

Todas as amostras foram amplificadas sempre em duplicata em placas de 96 poços (Applied Biosystems) com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. As reações foram realizadas em um volume total de 12 μ l contendo 10 ng de cDNA das amostras, 6 μ l de *SYBRGreen Master Mix PCR* (Applied Biosystems) e *primers* na concentração ótima pré estabelecida (Tabela 1). Em todas as placas foram pipetados controles negativos (NTC), ou seja, para cada *primer* avaliado foram feitos poços contendo água estéril em substituição à amostra. O programa foi iniciado a 95°C/10 minutos, seguido de 40 ciclos: 95°C/15 segundos e 60°C/1 minuto.

Para certificação de que a fluorescência emitida não estava sendo gerada por amplificações inespecíficas, ao final de uma amplificação normal, adiciona-se uma etapa de 20 minutos em que a temperatura aumenta gradualmente de 60°C para 95°C. À medida que os produtos gerados por PCR desnaturam com o aumento de temperatura,

cai o sinal fluorescente do SYBR Green. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação, devido a diferenças de T_m (temperatura de *melting*) entre os produtos de PCR causadas pelo número e composição de bases de cada produto.

A determinação dos valores para quantificação da expressão é feita com a determinação do *threshold*, que representa o momento em que o sistema detecta luz de maneira “inequívoca” nas amostras, diferenciando o sinal real do ruído de fundo. O ponto de encontro entre esta linha e a curva de amplificação é denominado *threshold cycle*, ou *Ct*.

Tabela 1

Sequência dos *primers* utilizados para amplificação por PCR em tempo real dos genes *EYA3*, *LXN*, α -Globina, γ -Globina, *SLC25A37-F* (Mitoferrina), *Band3*, *Alas2*, β actina e *GAPDH* para avaliação da expressão em linhagem K562 controles e silenciadas para os genes *EYA3* ou *LXN*, tratadas com Hemina.

Gene	Sequência primer	Concentração ideal
<i>EYA3</i> F <i>EYA3</i> R	5'-CAAGAGGAAAGCTGATGCCAC-3' 5'-CATCCAAGTCCCACAGAAATACC-3'	150nM
<i>LXN</i> F <i>LXN</i> R	5'-TGGTAAAAATTCAAACGTCAAGCA-3' 5'-AACTTGCATTTGCCAGGGAATA-3'	150nM
α -Globin-F α -Globin-R	5'-TGGTCCCCACAGACTCAGAGA-3' 5'-CGGCCTTGACGTTGGTCTT-3'	150nM
γ -Globin-F γ -Globin-R	5'-CCAGCTGAGTGAAGTCACTGT-3' 5'-CCAGCTGAGTGAAGTCACTGT-3'	150nM
<i>RUNX-1</i> -F <i>RUNX-1</i> -R	5'- GATGGCACTCTGGTCACTGT-3' 5'- CTTTTCCCTCTTCCACTTCG-3'	75nM
<i>SLC25A37</i> -F <i>SLC25A37</i> -R	5'-CTCCACGATGCGGTAATGAA-3' 5'-CGGTGCTGCGAGTTGTACAT-3'	150nM
<i>BAND3</i> -F <i>BAND3</i> -R	5'-AGTCTTCACCAAGGGTACTGTCC-3' 5'-CTGTCTAGCAGTTGGTTGGCC-3'	150nM
<i>ALAS2</i> -F <i>ALAS2</i> -R	GTGTCCGTCTGGTGTAGTAATGATT ACCAGCTCCAGCACCATGAC	150nM
β actina F β actina R	5'- AGGCCAACCGCGAGAAG - 3' 5'-ACAGCCTGGATAGCAACGTACA- 3'	150nM
<i>GAPDH</i> -F <i>GAPDH</i> -R	5'- GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' 5'- CCACTTGATTTTTGGAGGGATCT-3'	150nM

4.8-) Análise dos dados do qRT-PCR

A expressão dos genes de interesse foi determinada de forma relativa, ou seja, os valores de expressão são normalizados em relação a genes chamados de “controles endógenos”. Neste trabalho foi utilizado o gene da Beta actina (β -actina) e *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), que são genes cuja expressão é dita constitutiva, ou seja, apresentam pouca variação entre diversas condições. No entanto, alguns trabalhos vêm demonstrando que a expressão desses genes pode variar consideravelmente (Vandesompele, *et al.*, 2002; Schmittgen, *et al.*, 2000).

Os valores de Ct de cada gene foram obtidos em duplicata, dessa forma, foram calculadas as médias aritméticas destas, para cada amostra que teve um determinado gene estudado. Em seguida foi obtido o valor de delta Ct (Δ Ct), que consistiu na subtração do menor Ct de um gene de uma determinada amostra com os demais Cts desse mesmo gene de outras amostras estudadas. O próximo cálculo foi o de “Q” valor, que corresponde a 2^{Δ Ct. Os valores de Q dos genes Beta actina e GAPDH de cada amostra analisada foram submetidos ao programa geNorm (Vandesompele, *et al.*, 2002), que calculou a média geométrica entre eles, valor este denominado de Fator de Normalização da amostra. A expressão normalizada de um dado gene de interesse em uma determinada amostra foi dada pela razão entre o valor de Q do gene de interesse da amostra pelo fator de normalização da amostra. O valor obtido foi expresso em unidades arbitrárias (UA) ou valor absoluto de expressão.

4.9-) Western Blot

Ao precipitado celular contendo 5×10^6 a 1×10^7 células foi acrescentado tampão de extração de proteínas contendo 100 mM Tris (pH 7.6), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 0,1 mg Aprotinina, 35 mg PMSF/mL, 10 mM Na_3VO_4 , 100 mM NaF, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, e 4 mM EDTA. As amostras foram homogeneizadas até que se tornassem bastante fluidas. Após 30 minutos a 4°C, essas amostras passaram por um processo de centrifugação a 4°C durante 20 minutos para remoção dos restos celulares. Ao produto do extrato total proteico, adicionou-se tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditiotretitol e aqueceu-se em água fervente por 4 minutos. Após isso, as amostras foram submetidas à eletroforese ou armazenadas a -80°C. Para produção de imunoprecitado adicionou-se às alíquotas o anticorpo de interesse e proteína A-Sepharose 6MB. Após o término da incubação e da lavagem, os precipitados foram ressuspensos em tampão

de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditioneitol e aquecidas em água fervente por 4 minutos. Em seguida, as proteínas imunoprecipitadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 8%-SDS-PAGE em aparelho de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 90 minutos a 120 V (constante) em aparelho miniaturizado de transferência da Bio-Rad. A ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 1 hora com tampão de bloqueio (5% leite em pó magro, 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, e 0.02% Tween 20) a 4°C. A71 membrana de nitrocelulose foi então incubada com anticorpos específicos diluídos em tampão de bloqueio (0.3% de leite em pó magro) por 12 horas a 4°C e então lavadas 3 vezes com solução basal (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, and 0.02% Tween 20). Os anticorpos primários utilizados foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).O sistema de revelação usado foi baseado em quimioluminêscencia, e realizado de acordo com orientações do fabricante, ECLTM *Western Blot Analysis System* (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Em suma, as membranas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário, conjugado à HRP (Horseradish peroxidase), lavadas novamente, e então submetidas ao substrato da enzima, resultando em um produto luminescente, detectado por autoradiografias em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY). Análises quantitativas da intensidade das bandas de proteínas foram determinadas utilizando-se o *Scion Image software* (ScionCorp, Frederick, MD, USA). A intensidade de expressão protéica foi normalizada pela expressão da actina e a intensidade da fosforilação protéica foi normalizada pela expressão da proteína correspondente.

4.10-) Linhagens WT e transgênicas de *zebrafish*

Linhagens de *zebrafish* (*Danio rerio*) wild-type (AB* e Tü) foram mantidas de acordo com protocolo padrão (Amigo et al., 2009). As linhagens mutantes *spadetail* (*spt^{b104}*) (Mueller et al., 2010) e *dino* (*din^{tt250}*) (Hammerschmidt et al., 1996b) foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. A linhagem transgênica Tg(globin-LCR:eGFP) (Ganis et al., 2012) foi utilizada neste estudo para quantificação do fenótipo sanguíneo.

4.11-) Análise das sequências e bioinformática

As análises das sequências de DNA e proteína foram realizadas utilizando o *software* Lasergene (DNASTAR, Madison, WI). Os dados de DNA genômico foram produzidos por *Zebrafish Sequencing Group*, do Instituto Sanger e podem ser obtidos da página http://www.ensembl.org/Danio_rerio/.

4.12-) Identificação dos genes homólogos humanos em *zebrafish*

A primeira etapa para se estudar genes de interesse humanos no modelo animal *zebrafish* é encontrar os genes homólogos neste animal. Para isso, utilizou-se a ferramenta *Blast* a partir das sequências de *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Danio rerio* depositadas no banco de dados NCBI. Foram utilizadas as ferramentas específicas do Blast: *nucleotide blast* (*blastn*), *protein blast* (*blastp*) e *tblastx*. Com a sequência de nucleotídeos transcritos e de proteínas em mãos realizou-se uma busca *Blast* com todas as ferramentas citadas anteriormente a partir de *Homo sapiens*, deste contra *Mus musculus* e finalmente deste, contra *Danio rerio* (*Homo sapiens*→*Mus musculus*→*Danio rerio*). O caminho inverso também foi realizado (*Danio rerio*→*Mus*

musculus→*Homo sapiens*) para a confirmação dos respectivos genes e proteínas correspondentes em cada espécie.

4.13-) Hibridização *in situ* (WISH) e marcação por o-dianisidina

A análise por *WISH* (*Whole mount In Situ Hybridization*) foi utilizada para melhor identificar a expressão do gene candidato de interesse em embriões de *zebrafish* com 20 somitos e com 24 horas de idade (*24hpf*). Deu-se prioridade ao gene candidato que apresentou expressão na ICM (*Intermediate Cell Mass*). Sondas de RNA Antisense digoxigenin (DIG)-marcadas foram geradas por transcrição *in vitro* de acordo com protocolo de fabricação (Roche), subclonando os candidatos ortólogos em *zebrafish* para os genes humanos *EYA3*, *HES6* e *LXN*. A técnica de *WISH* foi realizada de acordo com protocolo padrão (Amigo *et al*, 2009). A marcação por o-dianisidina (Sigma), para coloração de células eritroides, foi realizada de acordo com protocolo descrito previamente (Amigo *et al*, 2009).

4.14-) Injeção de *morpholino*

Oligômeros de *morpholinos* antisense (MO) customizados contra *zebrafish-LXN* foram obtidos pela ferramenta GeneTools (Philomath, OR). Dois MO-alvo com sequências distintas (*splice site blocking*, splice MO) foram utilizados para silenciar o gene avaliados. As sequências dos *morpholinos* (MOa e MOb) encontram-se na tabela 2. Quantidades previamente padronizadas dos MOs a e b foram injetadas em embriões no estágio de 1 ou 2 células.

Tabela 2- Sequência dos *morpholinos* utilizados nas microinjeção dos genes *clpx1*, *clpx2*, *trak1.1*, *lxn*, *gfi1aa* e *gfi1ab*

Gene	Sequência <i>morpholino</i>
<i>Clpx1 splice</i> MOa	AGCTCATAAAGGTAAGAAGAGAT
<i>Clpx1 splice</i> MOb	GAGATGG TGGGAAGGTGAGATTAG
<i>Clpx2 splice</i> MOa	GGAGACGG CGGGAAGGTGCGTTTG
<i>Clpx2 splice</i> MOb	CGAGACCT TTGTGTGTAAGTGTTG
<i>Trak1.1</i> MOa	ATACGAGAAGAGGTACAGTAAGAGG
<i>Trak1.1</i> MOb	TTTTTGCAGTATTCACAGAAATGATA
<i>Lxn</i> MOa	AAGGCCACAGCGGAGGTCAGGTTTC
<i>Lxn</i> MOb	CGA CATAACCAGGTGAGACAAATCA
<i>gfi1aa</i> ATG MO	GTAAACATGCCGAGGTCATTTTTGG
<i>gfi1aa splice</i> MO	CAGAAACGACCGTGGCATGATTCCG
<i>gfi1b</i> ATG MO	AGCTGTGTTCACTATCTGACCTTGT
<i>gfi1b splice</i> MO	CTGCAAGTGTAGTATTGAAGATGTC

4.15-) Isolamento de RNA, síntese de cDNA e qRT-PCR

Pools de 30 embriões *zebrafish wild-type* não injetados e *morpholinos* injetados foram coletados 48 e 24 *hpf*. O RNA foi isolado utilizando-se o RNAeasy plus mini kit e colunas que eliminam DNA genômico (Quiagen). A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 2% e o RNA foi quantificado em espectrofotômetro (Beckman). A síntese de cDNA foi realizada utilizando o First Strand cDNA Kit (Roche) a partir de 1µg de RNA total, como descrito previamente (Nilsson *et al.*, 2009). A expressão dos genes de interesse foi analisada por meio de PCR em tempo real (qRT-PCR) em iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). O ensaio de expressão dos genes *lxn* e *hprt* foi realizado por Taqman (Applied Biosystems). A análise de expressão foi normalizada e calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen and Livak, 2008; Nilsson *et al.*, 2009).

5-) RESULTADOS

5.1-) Expressão dos genes *EYA3* e *LXN* em cultura de células $CD34^+$

Com o objetivo de avaliar o padrão de expressão dos genes *EYA3* e *LXN* durante a diferenciação eritroide, foram utilizadas células da cultura primária $CD34^+$ de indivíduos controle nos 7º, 10º e 13º dias, os quais representam as fases inicial, intermediária e final da eritropoese *in vitro*. O gene *EYA3* apresentou maior expressão no 13º dia, quando comparado aos 7º e 10º dias (figura 21A). Por outro lado, o gene *LXN*, mostrou estar mais expresso no 10º dia em relação aos demais (figura 21B).

Embora os dados não sejam estatisticamente significativos, os genes *EYA3* e *LXN*, seguiram um mesmo perfil de expressão nas diferentes culturas, ou seja, se mostraram mais expressos nas fases intermediária e final da diferenciação eritroide.

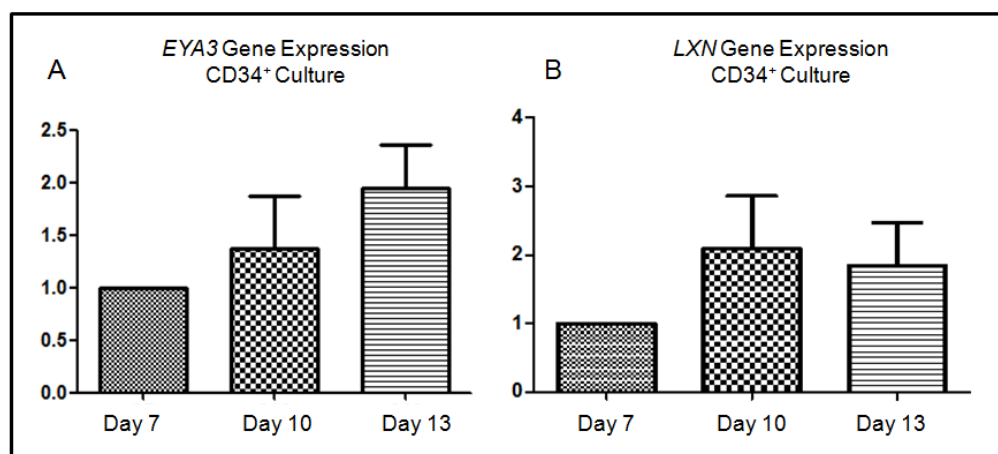


Figura 21. Padrão de expressão dos genes *EYA3* e *LXN* nos dias 7, 10 e 13 da cultura de células $CD34^+$ de 3 indivíduos controles diferentes.

As expressões dos genes *EYA3* e *LXN* foram quantificadas por qRT-PCR. O eixo das ordenadas representa a diferença de expressão (*fold change*). O eixo das abscissas representa os dias de coleta das células.

5.2-) Expressão dos genes *EYA3* e *LXN* em linhagem de células K562 induzida com Hemina

Outro objetivo deste trabalho foi a avaliação do padrão de expressão dos genes *EYA3* e *LXN* na linhagem celular eritroleucêmica K562 induzida para a diferenciação eritroide com hemina.

Tanto o gene *EYA3* quanto o gene *LXN* apresentaram aumento de expressão ao longo dos pontos 24, 48 e 72h após adição do composto indutor. Outra observação possível, é que o gene *LXN* está expresso em maior número de vezes (*fold change*) em relação ao *EYA3*. A figura 22 mostra o perfil de expressão para ambos os genes em K562 induzida com hemina.

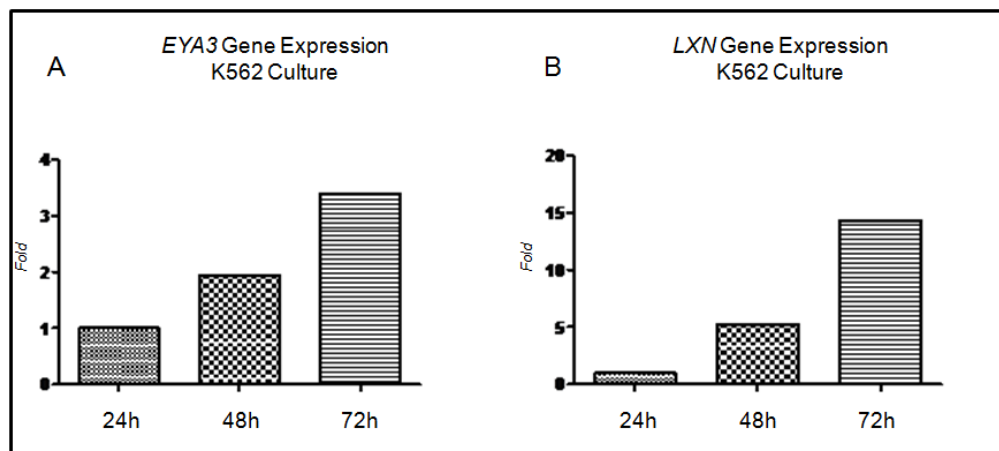


Figura 22. Padrão de expressão dos genes *EYA3* e *LXN* em linhagem de células K562 induzidas com Hemina.

As expressões dos genes *EYA3* e *LXN* foram quantificadas por qRT-PCR. O eixo das ordenadas representa a diferença de expressão (*fold change*). No eixo das abscissas, temos os dias de coleta do experimento. Os pontos 24, 48 e 72h indicam as coletas realizadas após adição de Hemina.

5.3-) Avaliação do silenciamento de *EYA3* e *LXN* em células K562

Após a transdução e seleção pelo antibiótico puromicina por período de 15 dias, foram coletadas células para verificação da diminuição da expressão dos genes *EYA3* e *LXN* confirmando assim, um silenciamento eficiente. A figura 23 representa a amostra coletada para verificação da expressão gênica de *EYA3* (gráfico A) e *LXN* (gráfico B) em células da linhagem K562 controle (barras branca) e silenciadas (barras cinza) para os genes estudados. A figura 24 representa uma amostra da expressão das proteínas por *Western Blot* em células controle (barras em branco) e células silenciadas (barras em cinza) para *EYA3* (gráfico C) e para *LXN* (gráfico D). Foi observada redução significativa da expressão gênica e protéica de *EYA3* e *LXN* nas culturas silenciadas para estes em relação às respectivas culturas controle.

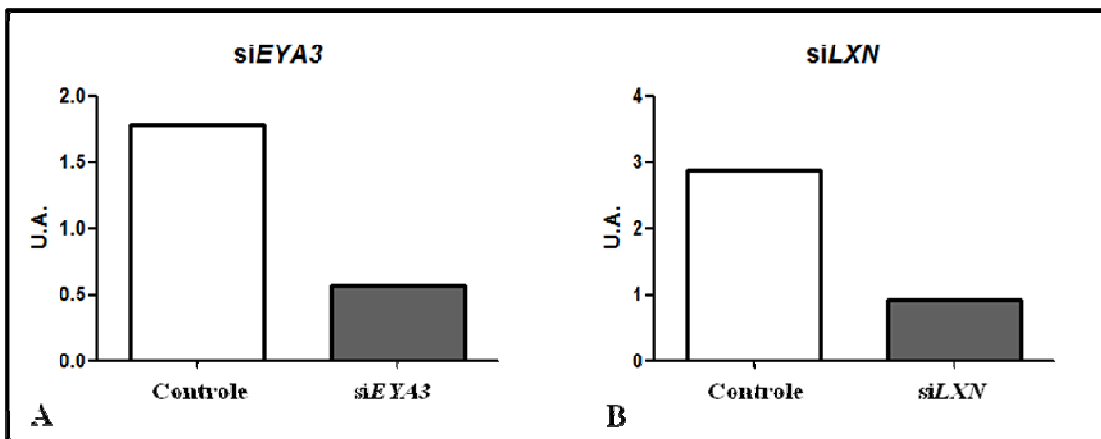


Figura 23. Padrão de expressão dos genes *EYA3* e *LXN* por qRT-PCR em linhagem de células K562 controle, silenciadas para o gene *EYA3* ou *LXN*.

O gráfico A representa a expressão gênica de *EYA3* em culturas de células K562 controle e silenciada para este gene. O gráfico B representa a expressão gênica de *LXN* em culturas de células K562 controle e silenciada para este gene. No eixo das abscissas temos as amostras de células controle (barras em branco) e silenciadas (barras em cinza). No eixo das ordenadas estão representadas as Unidades Arbitrárias (U.A.).

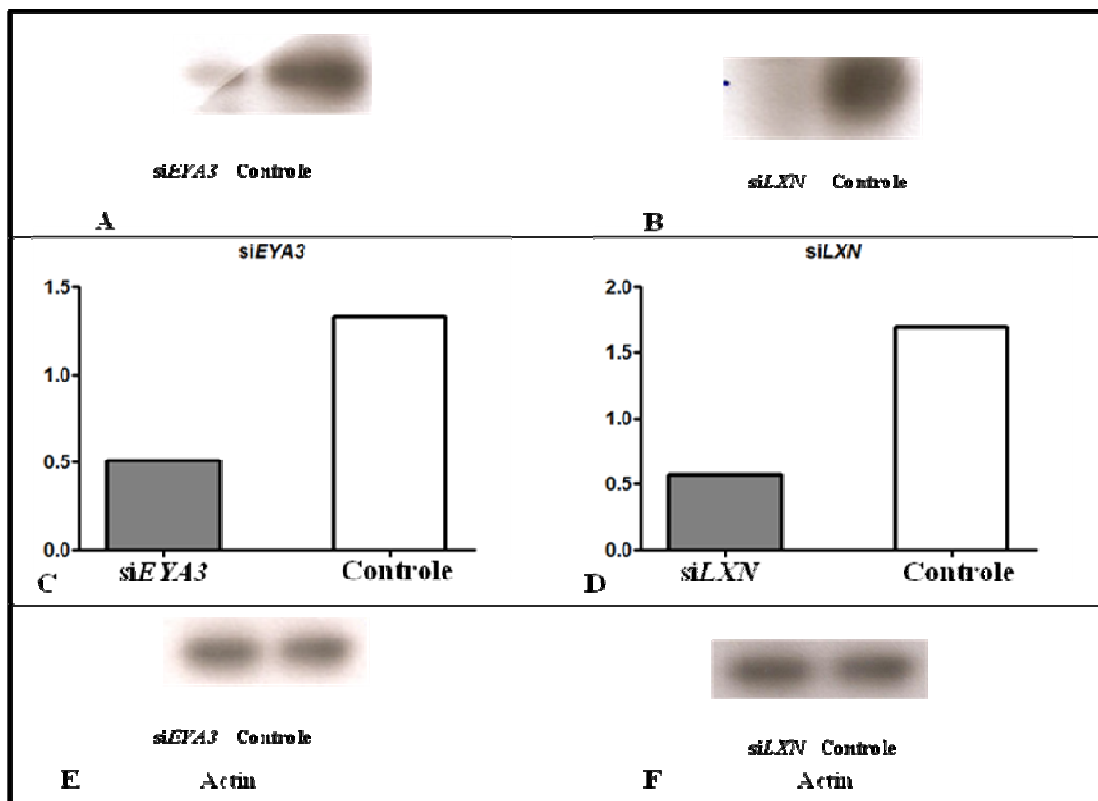


Figura 24. ShRNAs específicos para *EYA3* e *LXN* mediados por lentivírus resultaram no silenciamento efetivo de *EYA3* e *LXN* em células K562.

Análise por *Western Blot* de extratos protéicos de células silenciadas para *EYA3* ou *LXN* e células controle. A membrana foi incubada com anticorpos anti-*EYA3* (63 kDa) ou anti-*LXN* (29 kDa) ou anti-Actina (42 kDa) como controle da quantidade de proteína aplicada no gel. A membrana de nitrocelulose foi revelada com ECL *Western Blot Analysis System*. Os gráficos de barras representam a intensidade de banda. A expressão protéica de *EYA3* ou *LXN* foram corrigidas pela expressão de actina correspondente (*Scion Imagine Software*).

Confirmado o silenciamento para ambos os genes, separadamente, partiu-se para o experimento em que o composto Hemina é adicionado às células K562 controle e silenciadas.

A figura 25 representa as expressões dos genes *EYA3* (gráficos A) e *LXN* (gráfico B) em células controle (barras em branco) e células silenciadas para cada um dos genes (barras em cinza) nos pontos 0h, sem tratamento e nos pontos 24, 48, 72 e 96h após adição do composto. Pode-se observar que para ambos os genes, nos

diferentes pontos de coleta, a expressão destes está diminuída nas células das culturas silenciadas em relação às células das culturas controles, confirmando um silenciamento efetivo.

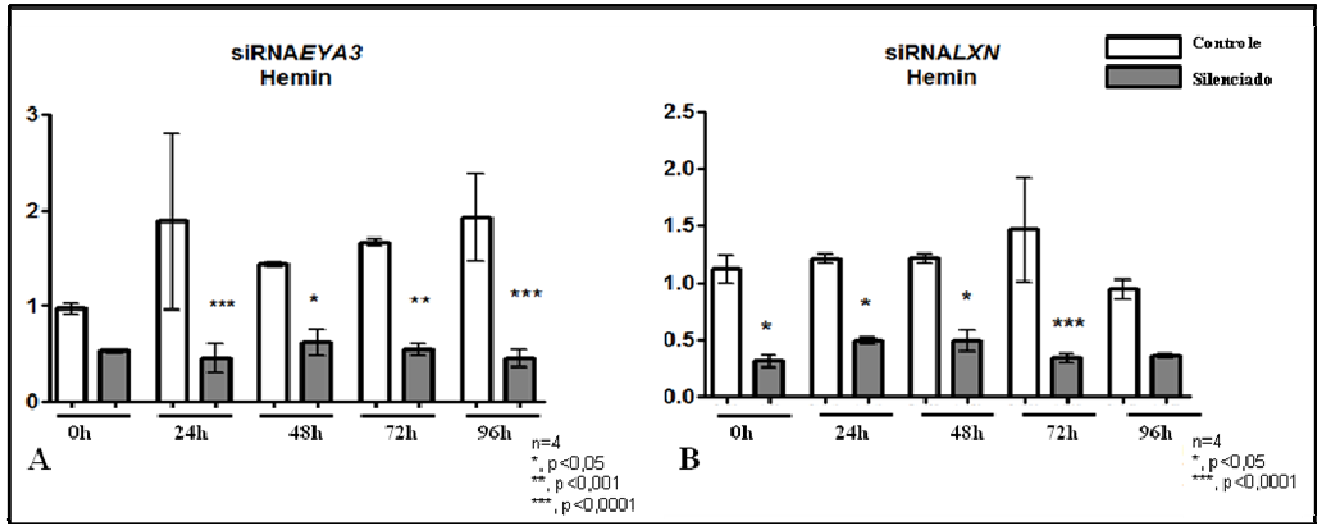


Figura 25. Padrão de expressão dos genes *EYA3* e *LXN* por qRT-PCR em linhagem de células K562 controle, silenciadas para o gene *EYA3* ou *LXN* e tratadas com Hemina.

O gráfico A representa a expressão gênica de *EYA3* em culturas de células K562 controle e silenciada para este gene. O gráfico B representa a expressão gênica de *LXN* em culturas de células K562 controle e silenciada para este gene. No eixo das abscissas temos as amostras de células controle (barras em branco) e silenciadas (barras em cinza) relativas aos pontos de coleta 0h, sem Hemina, 24, 48, 72 e 96h após adição de Hemina. No eixo das ordenadas estão representadas as Unidades Arbitrárias (U.A.). Teste estatístico: 1 way ANOVA, *, p<0.05; **, p<0.001; ***p<0.0001, n=4.

5.4-) Análise do padrão de expressão do gene da globina alfa após silenciamento dos genes *EYA3* e *LXN* em linhagem de células K562.

Também foi alvo de estudo deste trabalho o padrão de expressão do gene da globina alfa em células K562 controle e silenciadas para os genes *EYA3* ou *LXN*. A figura 26 representa a expressão do gene desta globina em células K562 nos pontos 0h, sem tratamento e nos pontos 24, 48, 72 e 96h após adição de Hemina. Os gráficos A e B constituem as células da linhagem K562 controle (barras em branco) e silenciadas (barras em cinza) para os genes *EYA3* e *LXN*, respectivamente. O silenciamento do gene *EYA3* na linhagem celular K562 promoveu diminuição significativa da expressão gênica de globina alfa em relação às culturas controle no ponto 72h após adição de Hemina (1.791 ± 0.1735 ; 0.7404 ± 0.1709 , controle e silenciado, respectivamente, $n=4$, $**p < 0.001$; figura 25A). Embora não estatisticamente significativa, foi observada uma tendência de diminuição da expressão do gene da globina alfa nos demais pontos analisados. O silenciamento do gene *LXN*, promoveu diminuição estatisticamente significativa da expressão do gene da globina alfa após 72h da adição de Hemina em relação às culturas controle (1.960 ± 0.03043 ; 1.079 ± 0.07503 , controle e silenciado, respectivamente, $n=4$, $*** p < 0.0001$; figura 25B).

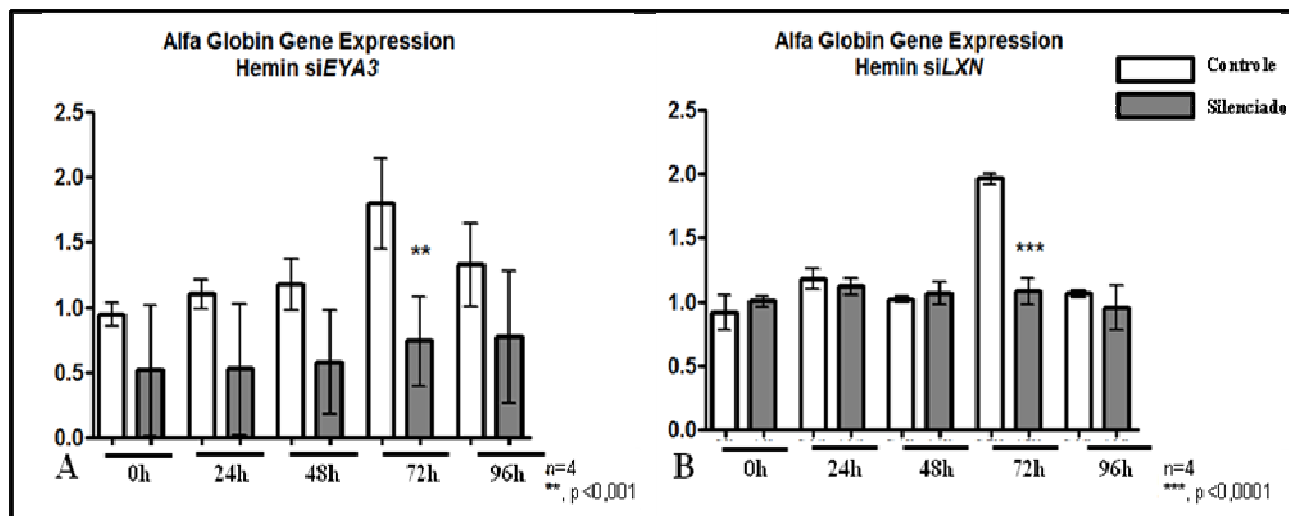


Figura 26. Padrão de expressão do gene da alfa globina por qRT-PCR em linhagem de células K562 controle, silenciadas para o genes *EYA3* ou *LXN* e tratadas com Hemina.

O gráfico A representa a expressão gênica de alfa globina em culturas de células K562 controle e silenciada para o gene *EYA3*. O gráfico B representa a expressão gênica de alfa globina em culturas de células K562 controle e silenciada para o gene *LXN*. No eixo das abscissas temos as amostras de células controle (barras em branco) e silenciadas (barras em cinza) relativas aos pontos de coleta 0h, sem Hemina, 24, 48, 72 e 96h após adição de Hemina. No eixo das ordenadas estão representadas as Unidades Arbitrárias (U.A.). Teste estatístico: 1 way ANOVA, **, $p < 0,001$; ***, $p < 0,0001$, $n=4$.

5.5-) Análise do padrão de expressão do gene da globina gama após silenciamento dos genes *EYA3* e *LXN* em linhagem de células K562.

Outra proposta deste trabalho foi a análise do perfil de expressão do gene da globina gama. A figura 27 representa a expressão do gene desta globina em K562 nos pontos 0h, sem tratamento e nos pontos 24, 48, 72 e 96h após adição de Hemina. Os gráficos A e B constituem as células da linhagem K562 controle (barras em branco) e silenciadas (barras em cinza) para os genes *EYA3* e *LXN*, respectivamente. Com relação às alterações resultantes do silenciamento do gene *EYA3*, foi observada diminuição estatisticamente significativa da expressão do gene da globina gama nas células da cultura K562 silenciadas para este gene nos pontos 24h (1.350 ± 0.1296 ; 0.5285 ± 0.1736 , controle e silenciado, respectivamente, $n=4$, * $p < 0.05$) e 72h (1.554 ± 0.1042 ; 0.6889 ± 0.1535 , controle e silenciado, respectivamente, $n=4$, * $p < 0.05$) após adição do composto (figura 27A). Embora não estatisticamente significativa, pode-se observar

tendência de diminuição da expressão gênica de gama globina nos demais pontos analisados. O silenciamento do gene *LXN* promoveu diminuição estatisticamente significativa da expressão do gene da globina gama nos pontos 24h (1.265 ± 0.03094 ; 0.9291 ± 0.05655 , controle e silenciado, respectivamente, $n=4$, $**p < 0.001$) e 72h (1.375 ± 0.02838 ; 0.9798 ± 0.01951 , controle e silenciado, respectivamente, $n=4$, $**p < 0.001$) após adição de Hemina (figura 27B).

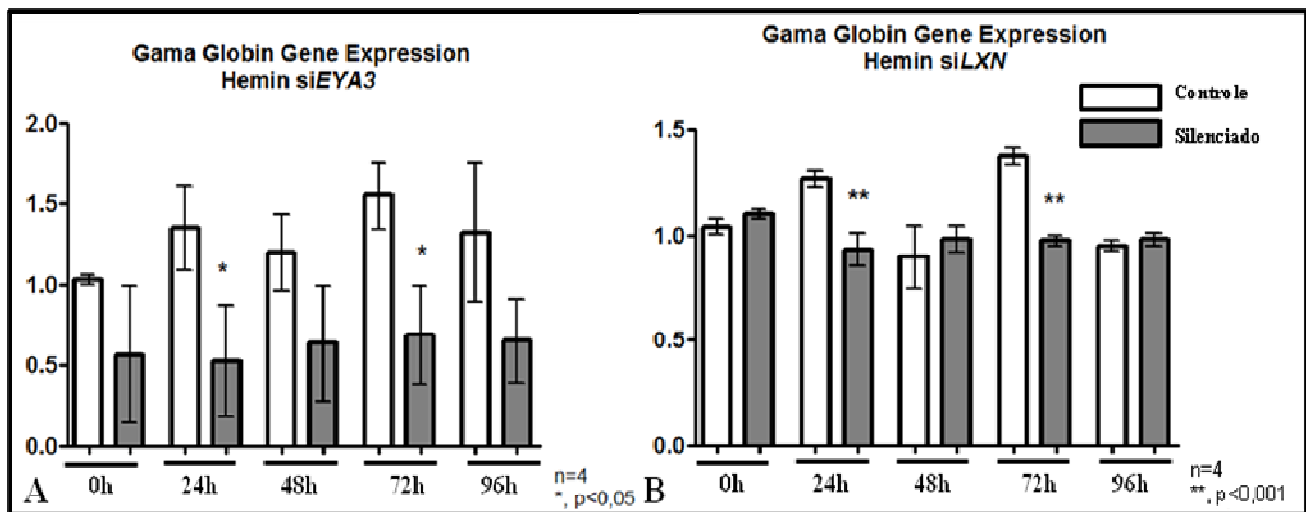


Figura 27. Padrão de expressão do gene da gama globina por qRT-PCR em linhagem de células K562 controle, silenciadas para o genes *EYA3* ou *LXN* e tratadas com Hemina.

O gráfico A representa a expressão gênica de gama globina em culturas de células K562 controle e silenciada para o gene *EYA3*. O gráfico B representa a expressão gênica de gama globina em culturas de células K562 controle e silenciada para o gene *LXN*. No eixo das abscissas temos as amostras de células controle (barras em branco) e silenciadas (barras em cinza) relativas aos pontos de coleta 0h, sem Hemina, 24, 48, 72 e 96h após adição de Hemina. No eixo das ordenadas estão representadas as Unidades Arbitrárias (U.A.). Teste estatístico: 1 way ANOVA, * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; $n=4$.

5.6-) Análise da expressão de Hemoglobina Fetal após silenciamento dos genes *EYA3* e *LXN* em linhagem de células K562.

Também foi objetivo deste trabalho a análise da expressão de Hemoglobina Fetal em células controle e silenciada para os genes *EYA3* ou *LXN*. Para isso, utilizando-

se a técnica de citometria de fluxo, foram medidas e avaliadas as expressões de HbF nas células controle e silenciadas para o gene *EYA3* ou *LXN* na linhagem celular K562 diferenciada com Hemina. A figura 28 representa a expressão de HbF em células K562 nos pontos 0h, sem tratamento e nos pontos 24, 48, 72 e 96h após adição deste composto. Analisando-se a expressão de HbF quando o gene *EYA3* está silenciado, observou-se sua diminuição significativa em relação à cultura controle no ponto 72h após adição de Hemina (3568 ± 41.00 ; 1947 ± 206.50 , controle e silenciado, respectivamente, $n=4$, * $p < 0.05$, figura 28A). Com relação ao silenciamento do gene *LXN*, foi observada diminuição significativa da expressão de HbF nas células silenciadas para este gene no ponto 72h após adição de Hemina (3547 ± 37 ; 2141 ± 235.5 , controle e silenciado, respectivamente, $n=4$, * $p < 0.05$, figura 28B).

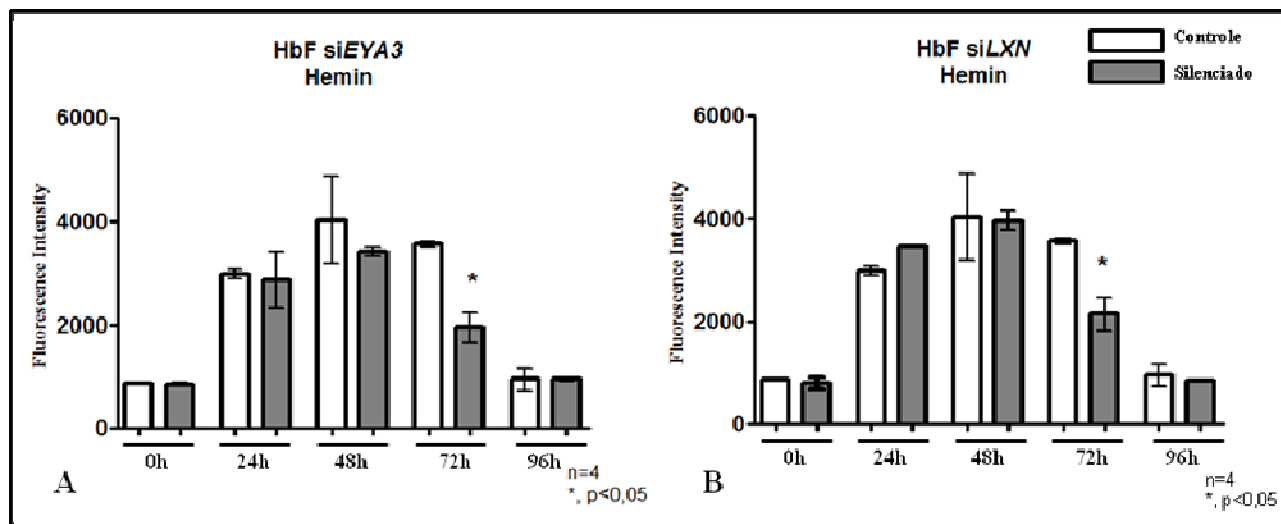


Figura 28. Padrão de expressão de HbF por citometria de fluxo em linhagem de células K562 controle, silenciadas para o genes *EYA3* ou *LXN* e tratadas com Hemina.

O gráfico A representa a expressão de HbF em culturas de células K562 controle e silenciada para o gene *EYA3*. O gráfico B representa a expressão de HbF em culturas de células K562 controle e silenciada para o gene *LXN*. No eixo das abscissas temos as amostras de células controle (barras em branco) e silenciadas (barras em cinza) relativas aos pontos de coleta 0h, sem Hemina, 24, 48, 72 e 96h após adição de Hemina. No eixo das ordenadas está representada a Intensidade de Fluorescência. Teste estatístico: 1 way ANOVA, *, $p < 0.05$; $n=4$.

5.7-) Identificação dos genes homólogos em *zebrafish* dos genes humanos *EYA3*, *HES6* e *LXN*

Os resultados da busca *Blast* para os três candidatos humanos de interesse estão representados, a seguir, nas figuras 29, 30 e 31. A escolha dos possíveis candidatos homólogos em *zebrafish* para o gene humano de interesse é baseada: 1-) *total score*; 2-) *e-value*; 3-) dados adicionais da literatura e 4-) no próprio resultado da hibridização *in situ*. A figura 29 mostra os candidatos homólogos de *zebrafish* para o gene humano *EYA3*. Foram encontrados quatro possíveis candidatos que podem ser os ortólogos de *EYA3* em *zebrafish*: *eya3* (NP_001073521.1), *eya1* (NP_571268.1), *eya2* (NP_0010045558.1) e *eya4* (NP001014387.1). A figura 30 mostra os candidatos homólogos de *zebrafish* para o gene humano *HES6*. Foram encontrados dois possíveis candidatos que podem ser os ortólogos de *HES6* em *zebrafish*: *hes6* (NP_919381.2) e *hes13* (NP_001017901.1). A figura 31 mostra os candidatos homólogos de *zebrafish* para o gene humano *LXN*. Foi encontrado um possível candidato ortólogo de *LXN* em *zebrafish*: *lxn* (NP_001008596.1).

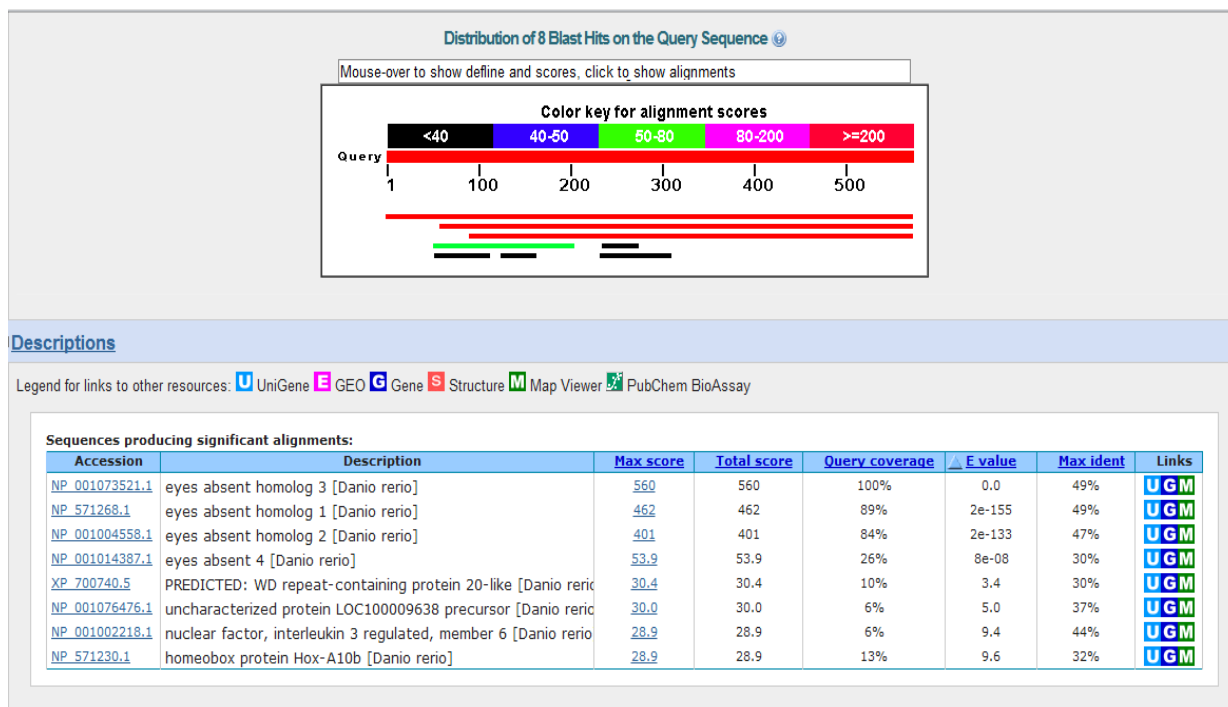


Figura 29. Candidatos homólogos em *zebrafish* para gene humano *EYA3*.

Na figura estão representados os candidatos homólogos em *zebrafish* para o gene *EYA3* humano através da ferramenta de busca *Blast p*. Foram encontrados quatro possíveis candidatos que podem ser os ortólogos de *EYA3* em *zebrafish*: *eya3* (NP_001073521.1), *eya1* (NP_571268.1), *eya2* (NP_001004558.1) e *eya4* (NP001014387.1).

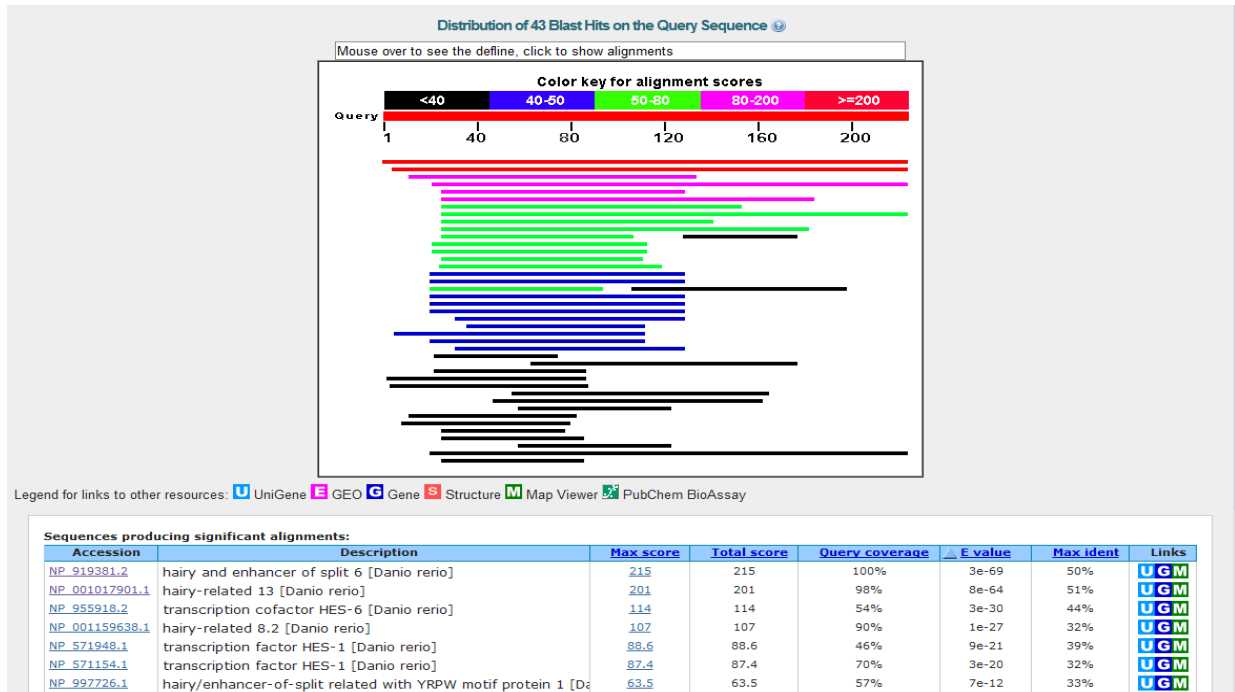


Figura 30. Candidatos homólogos em *zebrafish* para gene humano *HES6*.

Na figura estão representados os candidatos homólogos em *zebrafish* para o gene *HES6* humano através da ferramenta de busca *Blast p*. Foram encontrados 2 possíveis candidatos que podem ser os ortólogos de *HES6* em *zebrafish*: *hes6* (NP_919381.2) e *hes13* (NP_001017901.1).

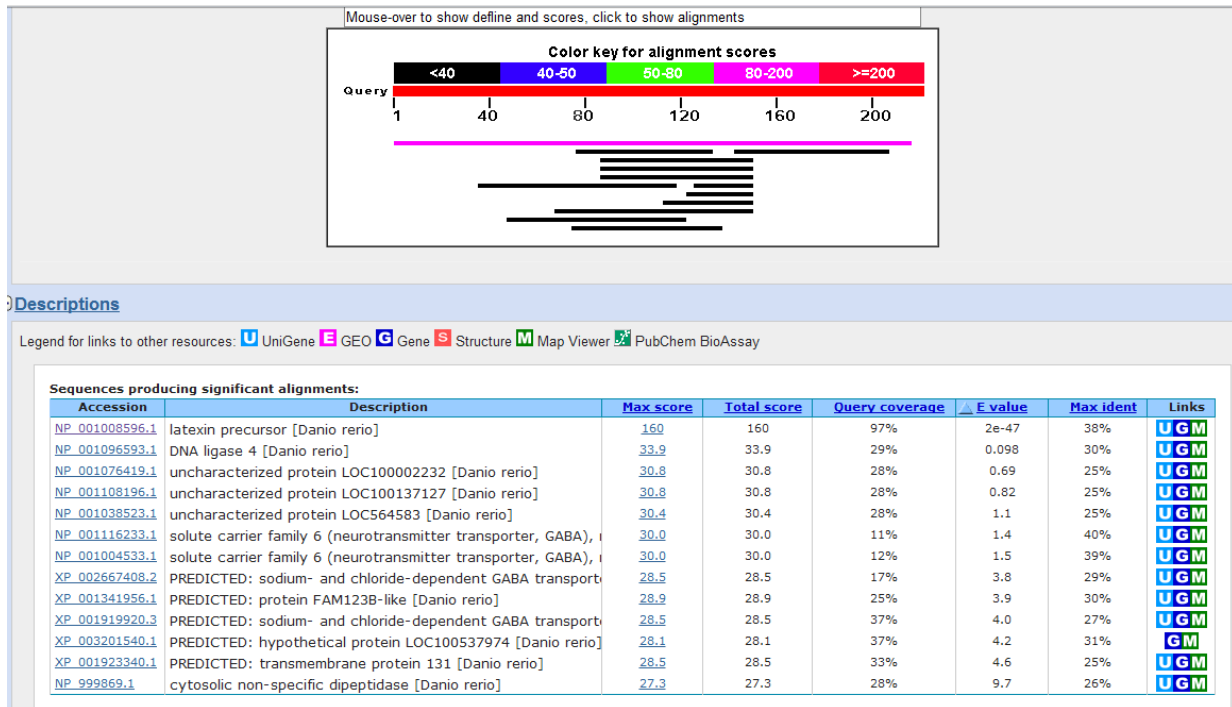


Figura 31. Candidato homólogo em *zebrafish* para gene humano *LXN*.

Na figura, estão representados os candidatos homólogos em *zebrafish* para o gene *LXN* humano através da ferramenta de busca *Blast p*. Foi encontrado um possível candidato ortólogo de *LXN* em *zebrafish*: *lxn* (NP_001008596.1).

Como dito anteriormente, associada à busca *Blast* para identificar possíveis ortólogos dos genes candidatos humanos em *zebrafish*, uma busca à literatura faz-se necessária para fornecer um maior suporte aos candidatos escolhidos. Isto é, buscaram-se maiores evidências que confirmem a escolha de um bom candidato, como por exemplo, padrão de expressão destes genes em diferentes tipos celulares de cultura de células humana ou tecidos de camundongo e padrão de expressão destes genes em *Danio rerio* em dados pré-existentes na literatura. Estes dados adicionais colaboram para uma maior segurança na escolha de um bom candidato no momento da realização da hibridização *in situ*. As informações adicionais para a escolha de cada um dos candidatos estão representadas na figura 32. As figuras 32 A, B e C correspondem, respectivamente, ao padrão de expressão dos genes *EYA3*, *HES6* e *LXN* em diferentes

tipos celulares de *Homo sapiens*. Como podemos observar, nas figuras A e B, o padrão de expressão dos genes *EYA3* (<http://www.biogps.org/#goto=genereport&id=2140>) e *HES6* (<http://www.biogps.org/#goto=genereport&id=55502>), ambos os fatores de transcrição, é ubíquo, isto é, a expressão não se altera nos diferentes tipos de células. Já o gene *LXN* (<http://www.biogps.org/#goto=genereport&id=56925>) apresenta um padrão de expressão mais diferenciado em relação aos outros dois genes. Foi observada expressão específica, como por exemplo, em células cardíacas, células musculares, células endoteliais e em células eritroides, como CD71⁺ (células eritroides primitivas) e CD34⁺ (células tronco-hematopoéticas). Tal análise preliminar nos permite sugerir que o candidato *LXN* é o mais apropriado para uma investigação mais pormenorizada de uma possível função na produção de células eritroides.

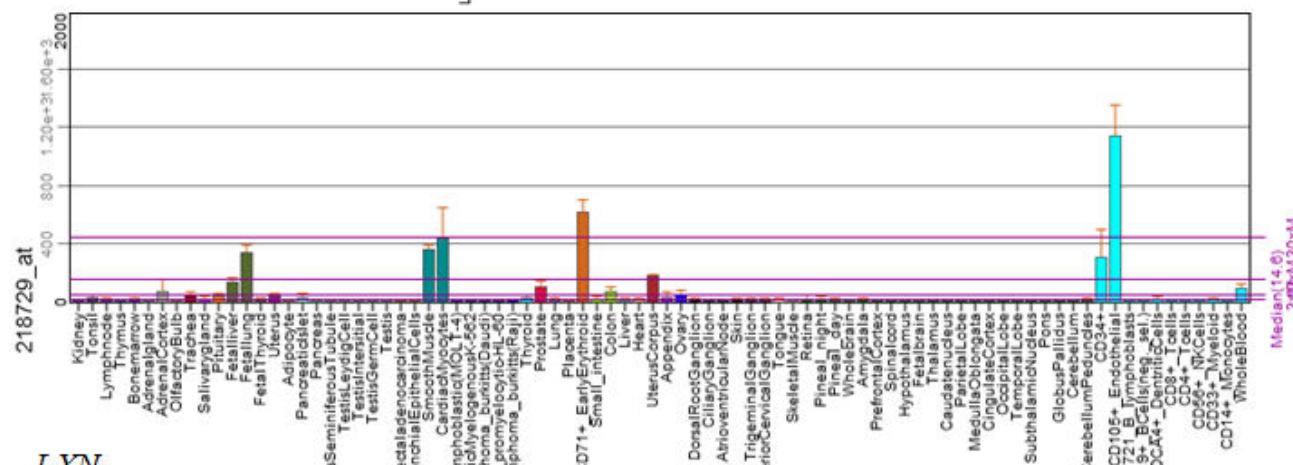
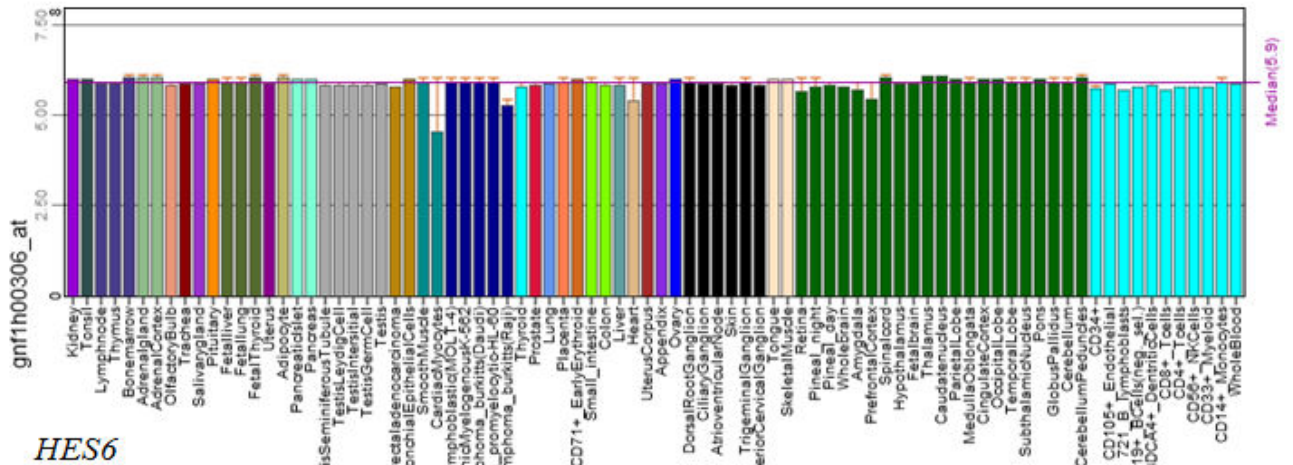
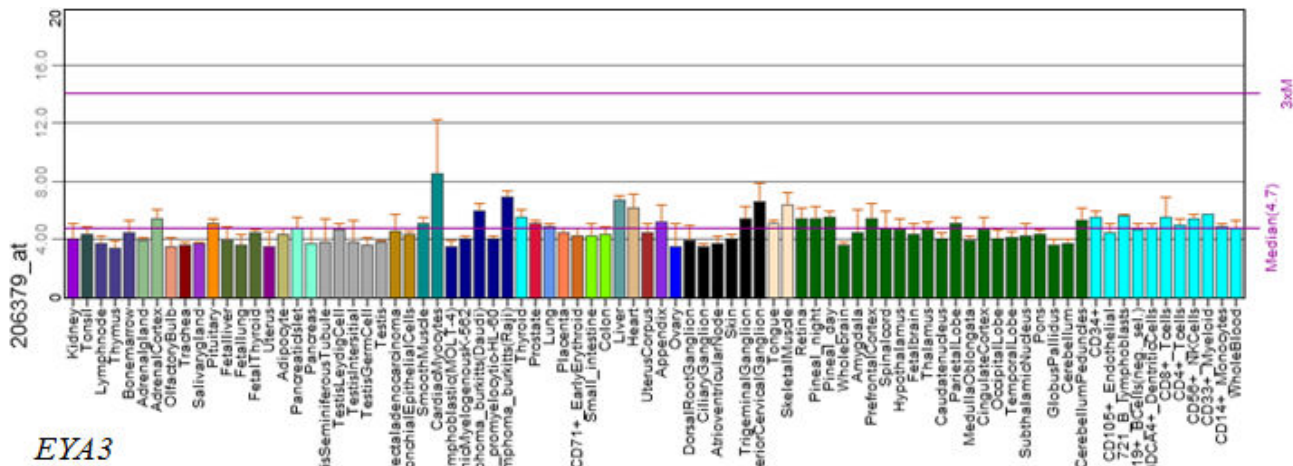


Figura 32. Padrão de expressão dos genes *EYA3*, *HES6* e *LXN* em diferentes tipos celulares de *Homo sapiens*.

Na figura A, B e C estão representados, respectivamente, o padrão de expressão dos genes *EYA3*, *HES6* e *LXN* em diferentes tipos celulares de humanos. Podemos observar que os genes *EYA3* e *HES6* apresentam padrão constante de expressão, isto é, não são expressos em locais específicos. Já o gene *LXN* apresenta expressão em tipos celulares mais específicos, como células cardíacas, células musculares, células endoteliais e em células eritroides, como $Cd71^+$ (células eritroides primitivas) e $Cd34^+$ (células tronco-hematopoéticas).

Buscas adicionais à literatura nos permitiu encontrar informações a respeito da expressão do gene *LXN* no organismo *Danio rerio* utilizando-se a ferramenta de hibridização *in situ*. A figura 33 mostra uma população de embriões de *zebrafish* 24hpf (ZFIN: Thisse *et al.*, 2004) em que a expressão do gene *lxn* foi avaliada por hibridização *in situ*, onde é possível se observar a expressão deste gene na ICM (*Intermediate Cell Mass*), local de produção de células sanguíneas na chamada onda primitiva de hematopoese em *zebrafish*. Este dado reforça a informação anterior de que o gene *lxn* pode estar envolvido na diferenciação eritroide.

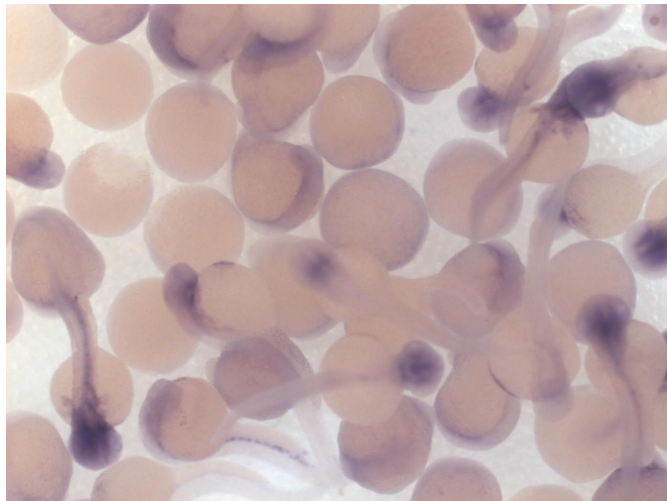


Figura 33. Análise da expressão do gene *lxn* em população de embriões de *Danio rerio* 24hpf. A expressão do gene *lxn* foi avaliada por hibridização *in situ* em embriões com 24 horas de idade. Pode-se observar expressão do gene candidato na ICM (*Intermediate Cell Mass*), local de produção de células sanguíneas na fase primitiva de hematopoese em *zebrafish*.

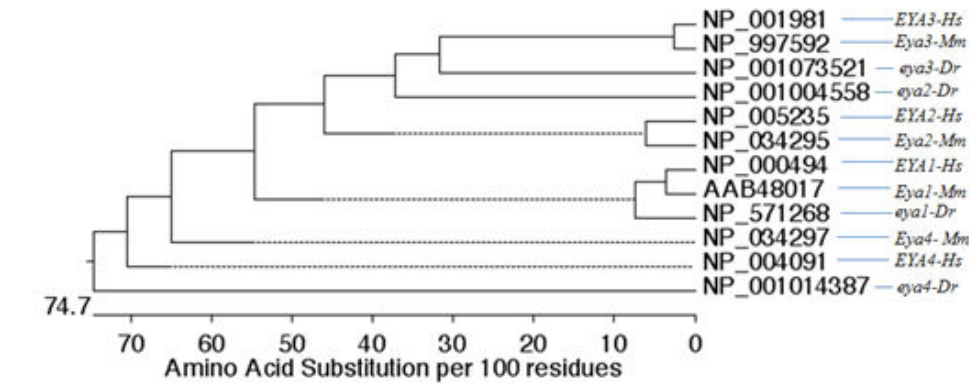
5.9-) Análise da relação filogenética entre os membros de *zebrafish* e mamíferos dos fatores de transcrição *EYA3*, *HES6* e do inibidor de carboxipeptidase *LXN*.

Para melhor se compreender a relação de parentesco dos genes candidatos homólogos *EYA3*, *HES6* e *LXN* entre os membros de *Danio rerio*, *Mus musculus* e *Homo sapiens*, procedeu-se a uma análise filogenética utilizando-se a aplicação *MegAlign* do software DNASTAR. A figura 34 mostra a relação filogenética entre os candidatos homólogos de *Danio rerio* (Dr) e mamíferos *Mus musculus* (Mm) e *Homo sapiens* (Hs) para os candidatos *EYA3*, *HES6* e *LXN*. Quanto maior a substituição de resíduos de aminoácidos (na árvore filogenética, representada pela escala de substituição/ 100 resíduos), maior é a distância de parentesco entre os membros das diferentes espécies.

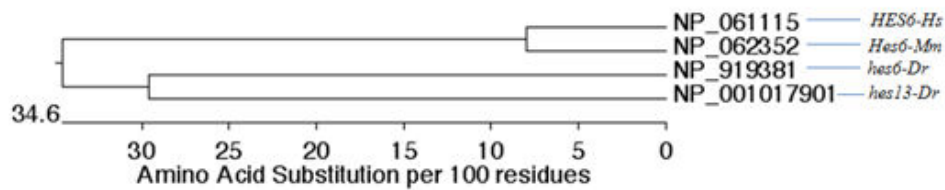
Analisando-se o fator de transcrição *EYA3*, foi realizada a análise filogenética para todos os membros da família EYA e sua relação com *Mus musculus* e *Danio rerio* (figura 34A). Observamos que cada fator de transcrição *EYA1-4* tem seu representante em *zebrafish* (*eya1-4*), e podemos inferir que, segundo a anotação nos bancos de dados gênicos, não houve duplicação para esta família de fatores de transcrição.

Quando analisamos fator de transcrição *HES6*, este possui um representante homólogo em *Mus musculus* (*Hes6*) e dois representantes em *Danio rerio* (*hes6* e *hes13*) (figura 34B). Estes dados nos mostram que para o gene *HES6* humano, houve evento de duplicação em *zebrafish*.

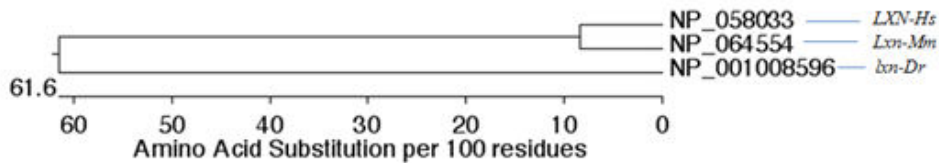
Já o gene *LXN*, apresenta apenas um candidato em *Danio rerio* anotado, o *lxn* (figura 34C).



A-) *EYA3*



B-) *HES6*



C-) *LXN*

Figura 34. Relação filogenética entre os genes homólogos de *Danio rerio*, *Mus musculus* e *Homo sapiens* dos genes *EYA3*, *HES6* e *LXN*.

A árvore filogenética foi construída baseada no método de J. Hein. A aplicação MegAlign do software DNASTAR foi utilizada para a realização de alinhamento múltiplos e construção do dendrograma filogenético.

Finalizada a etapa de análise de bioinformática e tendo em mãos os possíveis candidatos ortólogos em *zebrafish*, o próximo passo foi verificar a expressão desses genes em embriões com 20 somitos e *24hpf* e, no nosso caso, atentar-se para a expressão específica na ICM, onde há a produção de células hematopoéticas na fase primitiva.

5.10-) Expressão dos genes *eya1*, *eya2*, *eya3* e *eya4* em *Danio rerio* por Hibridização *in situ*

Foi avaliado o padrão de expressão dos candidatos ortólogos do gene humano *EYA3*, *eya1*, *eya2*, *eya3* e *eya4* em embriões de *zebrafish*. A figura 35 mostra o padrão de expressão dos candidatos em *zebrafish* para o gene humano *EYA3*.

Pode-se observar que os candidatos de *Danio rerio* para o gene *EYA3* humano, *eya1*, *eya2*, *eya3* e *eya4* apresentam, principalmente, expressão neuronal e em células musculares em embriões WT 24hpf, não apresentando expressão específica na ICM.

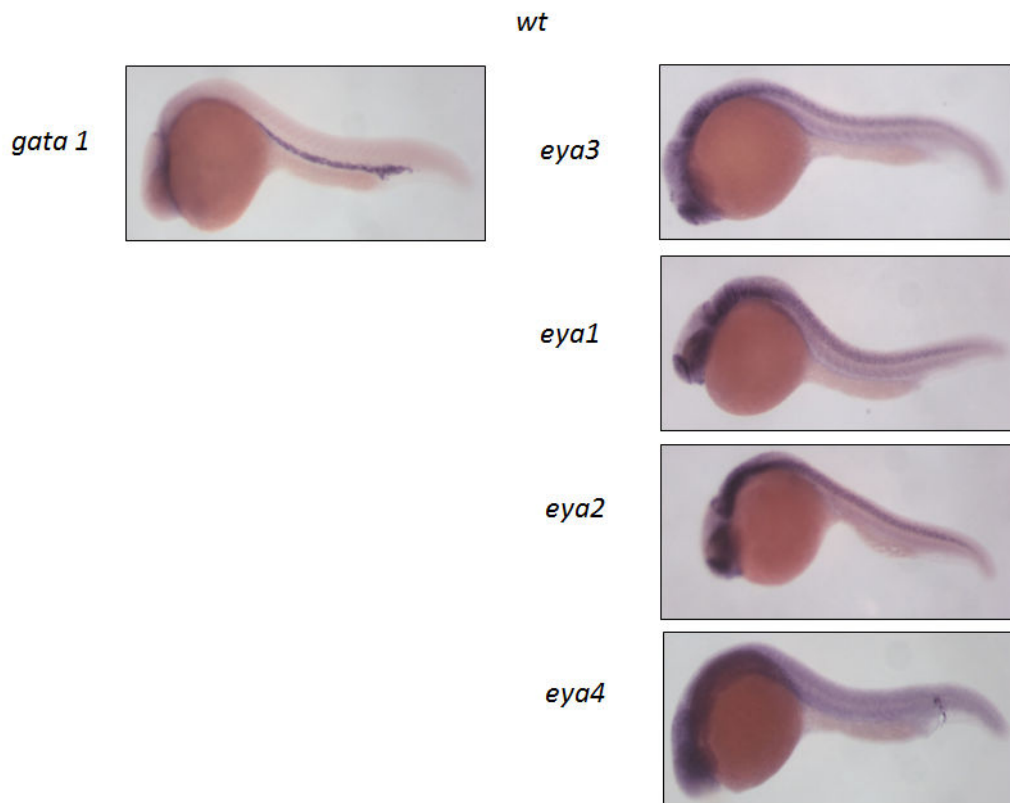


Figura 35. Análise do padrão de expressão dos genes *eya1*, *eya3*, *eya4* em embriões de *Danio rerio* 24hpf.

A expressão dos genes *eya1*, *eya3*, *eya4* foi avaliada por hibridização *in situ* em embriões WT com 24 horas de idade. Probe *anti-sense* para *gata1* foi utilizada como controle positivo da *WISH*. Pode-se observar expressão neuronal e de células musculares para os três candidatos avaliados; não foi observada expressão na ICM (*Intermediate Cell Mass*) destes candidatos.

5.11-) Expressão dos genes *hes6* e *hes13* em *Danio rerio* por Hibridização *in situ*

Da mesma forma, foi avaliado o padrão de expressão dos candidatos ortólogos do gene humano *HES6* (*hes6* e *hes13*) em embriões de *zebrafish*.

A figura 36 mostra o padrão de expressão dos candidatos em *zebrafish* para o gene humano *HES6*. Os candidatos *hes6* e *hes13* em *zebrafish* para o gene humano *HES6* não mostraram ser expressos especificamente na ICM de embriões WT e dino 24hpf e apresentaram expressão considerável em células neuronais e musculares.

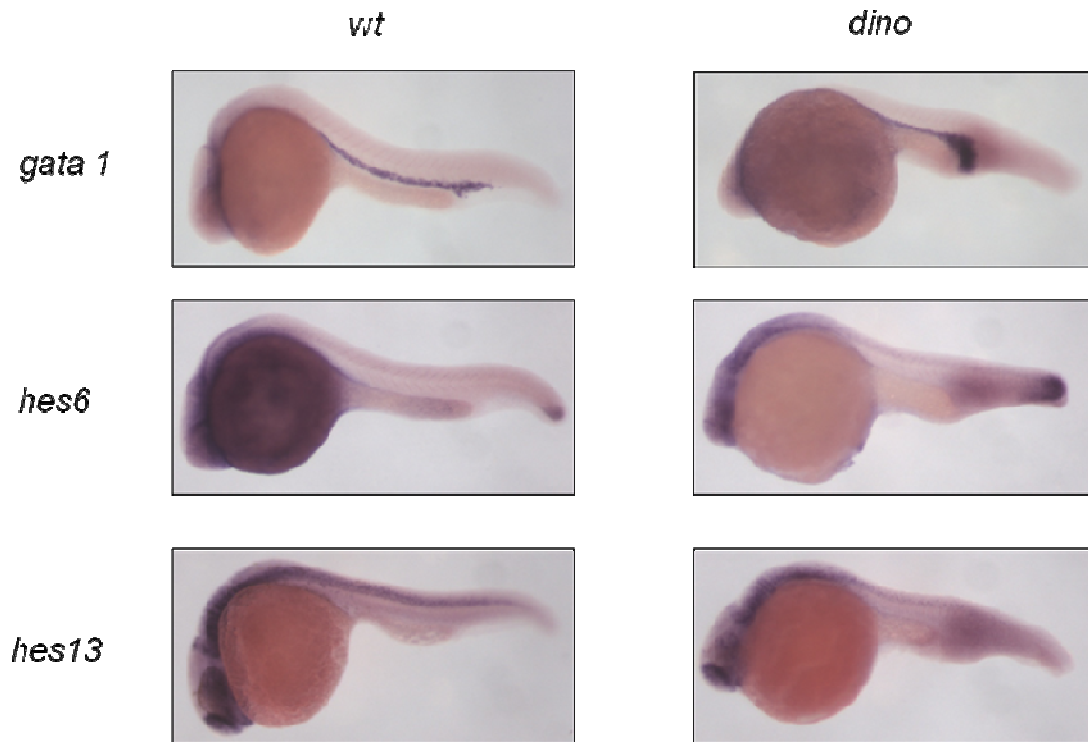


Figura 36. Análise do padrão de expressão dos genes *hes6* e *hes13* em embriões de *Danio rerio* 24hpf.

A expressão dos genes *hes6* e *hes13* foi avaliada por hibridização *in situ* em embriões WT e mutantes dino com 24 horas de idade. Probe *anti-sense* para *gata1* foi utilizada como controle positivo da *WISH*. Pode-se observar, principalmente, expressão neuronal e de células musculares para ambos os candidatos avaliados; não foi observada expressão na ICM (*Intermediate Cell Mass*) destes candidatos.

5.12-) Expressão do gene *lxn* em *Danio rerio* por Hibrização *in situ*

O gene humano *LXN* foi o único cujo correspondente homólogo em *zebrafish*, *lxn*, apresentou expressão na ICM, em embriões WT com 20 somitos e *24hpf* (figura 37). Como os resultados da expressão foram positivos para este gene na ICM, também foi avaliado a sua expressão em embriões mutantes de *zebrafish 24hpf dino* e *spadetail*, que, como descritos previamente, funcionam como controles positivo e negativo, respectivamente. Como esperado, o mutante *dino* apresentou um enriquecimento de coloração, significando expressão positiva, na porção ventralizada da ICM; já o mutante *spadetail* não apresentou nenhuma expressão na região da ICM, estando também de acordo com o esperado (figura 37).

Dessa forma, pode-se sugerir que dos três candidatos em *Homo sapiens*, a-) *EYA3*, b-) *HES6* e c-) *LXN*, cujos homólogos em *zebrafish* são a-) *eya1*, *eya2*, *eya3*, *eya4*; b-) *hes6* e *hes13* e c-) *lxn*, apenas este último apresenta potencial para avaliação de sua funcionalidade neste modelo animal.

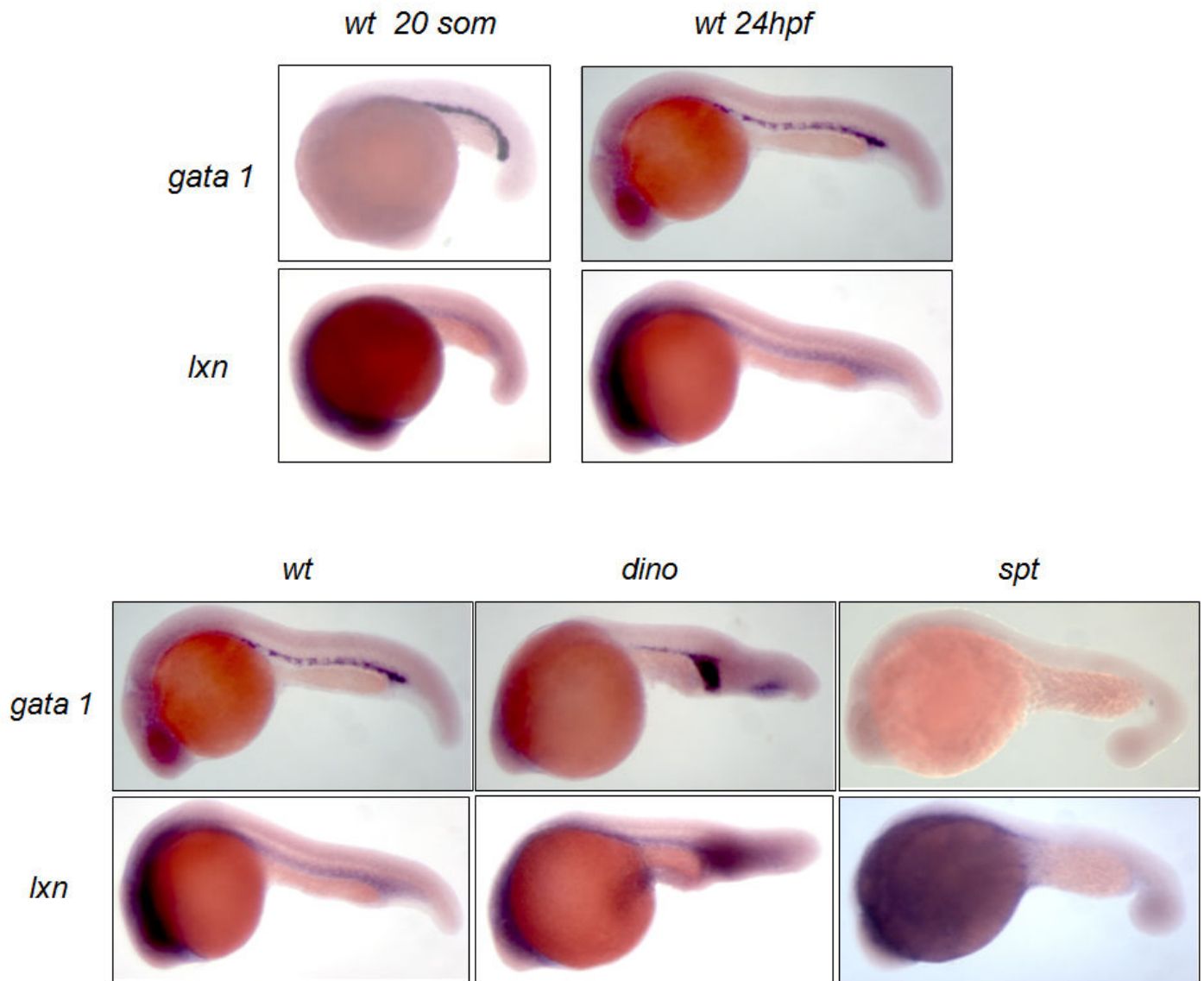


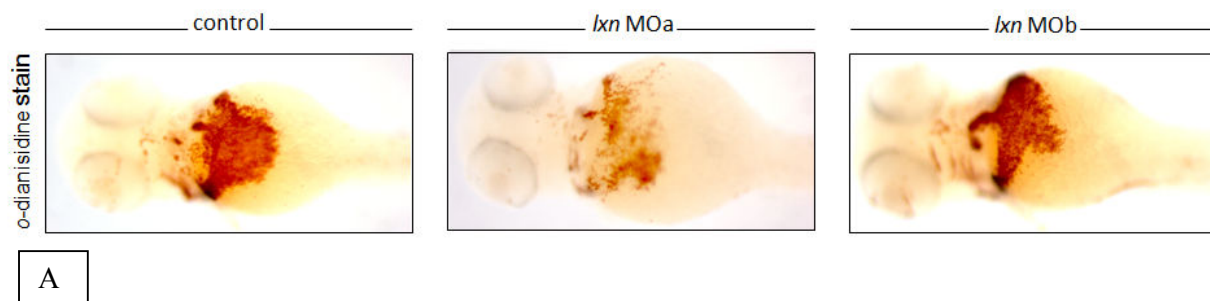
Figura 37. Análise do padrão de expressão do gene *lxn* em embriões de *Danio rerio* 24hpf.

A expressão dos genes *lxn* foi avaliada por hibridização *in situ* em embriões WT (20 somitos e 24hpf), mutantes *spadetail* e *dino* com 24 horas de idade. Probe *anti-sense* para *gata1* foi utilizada como controle positivo da *WISH*. Pode-se observar, além de expressão neuronal, expressão na ICM (*Intermediate Cell Mass*) do candidato avaliado.

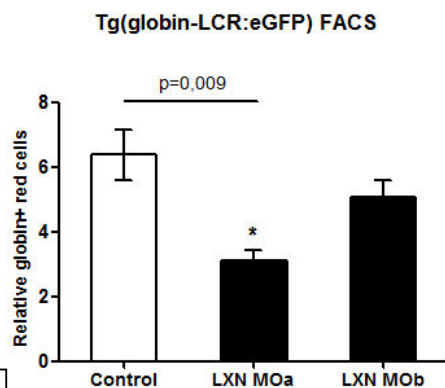
5.13-) Avaliação do padrão de hemoglobinação e quantificação de eritrócitos em *zebrafish* 72hpf injetados e não injetados com o *lxn-morpholino*

O gene *lxn* em *zebrafish* mostrou-se o melhor candidato para ser silenciado e ter os *morphants* fenotipicamente avaliados. A literatura exige que sejam utilizados pelo menos dois *morpholinos* distintos (MOa e MOb) em injeções diferentes para a confirmação dos fenótipos obtidos. Desta forma, foram padronizados e injetados dois diferentes *morpholinos* em embriões de *zebrafish* no estágio de uma célula para a avaliação de hemoglobinação e quantificação de eritócitos em embriões 72hpf. A figura 38 mostra o padrão de hemoglobinação através de marcação por benzidina de embriões 72hpf controle e injetados para ambos os *morpholinos* (MOa e MOb) (figura 38A), bem como a quantificação de eritrócitos obtida por FACS sorting (figura 38B) e a verificação da expressão do mRNA após o nocaute, por qRT-PCR (figura 38C).

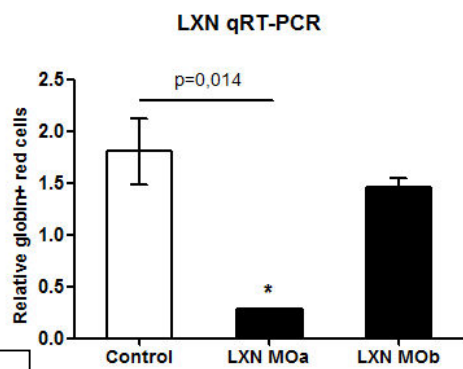
A figura 38A mostra a redução da hemoglobinação no morfante A (*lxn* MOa) em relação ao controle (control), no entanto, não foi observada redução da hemoglobinação no embrião morfante (*lxn* MOb). Estes resultados podem ser confirmados a partir da quantificação de células eritroides resultante da avaliação por FACS na figura 38B. Foi observada uma redução de aproximadamente 50% de células eritoides no embrião injetado com o *morpholino lxn* MOa ($p=0.009$) em relação ao respectivo controle não injetado. No entanto, não foi observada alteração significativa na quantidade de células eritroides decorrente da injeção do *morpholino lxn* MOb. A figura 38C mostra a quantificação do mRNA de *lxn* para os *morphants* a e b. Foi verificada a redução da expressão do mRNA de *lxn* em torno de 80% no embrião morfante em relação ao embrião controle não injetado, indicando um nocaute eficiente para o gene de interesse. O mesmo não foi observado para o morfante b, em que não houve redução na expressão do mRNA de *lxn*.



A



B



C

Figura 38. Análise da expressão do padrão de hemoglobinação e quantificação de eritrócitos em zebrafish *72hpf* injetados e não injetados com o *lxn-morpholino*.

(A) O padrão de hemoglobinação foi avaliado através da marcação por benzidina de embriões *72hpf* controle e injetados com o *morpholino*-alvo de interesse. (B) A técnica de FACS sorting foi utilizada para quantificação das células eritróides em embriões *72hpf* controle e injetados. (C) Quantificação de mRNA do gene *lxn* foi avaliada por qRT-PCR em embriões *72hpf* controle-não injetados e injetados (n=100).

5.14-) Quantificação de eritrócitos em embriões de *zebrafish* 48hpf injetados e não injetados com o *lcn-morpholino*

A análise dos embriões 72hpf injetados mostrou anemia quando o gene *lcn* encontra-se nocauteado. Este resultado nos faz pensar em que fase da hematopoese este gene pode estar envolvido. Com o objetivo de melhor compreender em que fase (inicial ou final da onda de hematopoese) o *lcn* pode estar atuando, também foi analisada a quantificação de eritrócitos em embriões 48hpf controle e injetados com o *lcn-morpholino*. A figura 39 nos mostra a quantificação de eritrócidos em embriões de *zebrafish* 48hpf, bem como a quantificação dos respectivos mRNAs. A figura 39A mostra que não há diferença no número de eritrócitos nos embriões não injetados e injetados com o *lcn-morpholino* (MOa), já a figura 39B exibe a redução de mRNA para o gene *lcn* em embriões injetados com o MOa. Ou seja, verificamos que mesmo com a eficiência de *knockdown* do gene de interesse, não houve anemia nos *morphants* analisados 48hpf.

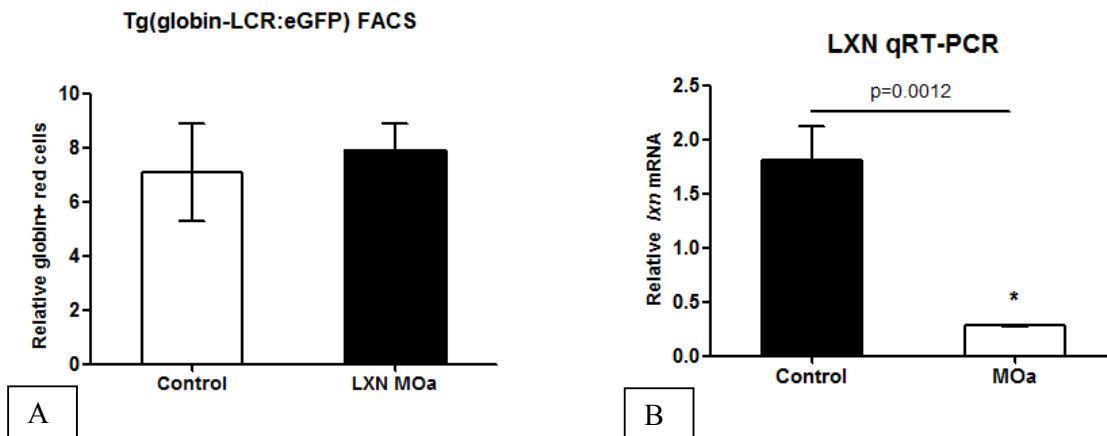


Figura 39. Quantificação de eritrócitos em embriões de *zebrafish* 48hpf injetados e não injetados com o *lcn-morpholino*.

(A) A quantificação das células eritóides em embriões 48hpf foi feita utilizando-se a técnica de FACS sorting. (B) A quantificação de mRNA do gene *lcn* foi avaliada por qRT-PCR em embriões 48hpf controle-não injetados e injetados.

5.15-) Análise do padrão de expressão de marcadores eritroides e *RUNX-1* após silenciamento do gene *LXN* em linhagem de células K562 induzida com Hemina e AraC.

Com o objetivo de melhor compreender o fenótipo anêmico nos *morphants* silenciados para o gene *lxn* em *zebrafish* partiu-se novamente para o estudo em linhagem K562 induzida para a diferenciação eritroide com o composto hemina. Foi analisada a expressão dos marcadores eritroides *Band3*, *ALAS2* e *Mitoferrina*. Além disso, também foi avaliado o padrão de expressão dos fatores de transcrição *RUNX-1*, *SCL/TAL1*, *GATA1*, *GATA2*, *NEF1*, *FOG1* e *EKLF*, todos envolvidos na hematopoese como previamente descrito (figura 2).

Com relação aos marcadores eritroides *Band3*, *ALAS2* e *Mitoferrina*, não houve diferença significativa entre as culturas controle e silenciada para o gene *LXN* nos intervalos de tempo analisados (figura 40).

Já as análises do padrão de expressão dos fatores de transcrição acima mencionados, apenas *RUNX-1* mostrou diferença estatisticamente significativa entre culturas controle e silenciada para o gene *LXN* (figura 41).

Em culturas induzidas por hemina (figura 41A) houve diminuição da expressão do gene *RUNXI* na cultura silenciada para *LXN* em relação à cultura controle 48h após adição do composto (2.3411 ± 0.1634 ; 0.6921 ± 0.1603 , controle e silenciado, respectivamente, $n=4$, $**p < 0.001$). Adicionalmente, foi observada diminuição do padrão de expressão de *RUNXI* entre as culturas silenciadas ao longo da indução por hemina (3.0493 ± 0.4185 , silenciado 0h; 1.7665 ± 0.0901 , silenciado 24h; 0.6921 ± 0.1603 , silenciado 48h, $n=4$, $**p < 0.001$, $***p < 0.0001$).

Nas culturas tratadas com AraC (figura 41B) houve diminuição da expressão de *RUNXI* em células silenciadas para o gene *LXN* em relação às células controle nos dias

3 (2.4633 ± 0.3397 ; 1.0682 ± 0.0947 , controle e silenciado, respectivamente) e 7 (2.8097 ± 0.2695 ; 1.4154 ± 0.3603 , controle e silenciado, respectivamente) após adição do composto indutor da diferenciação.

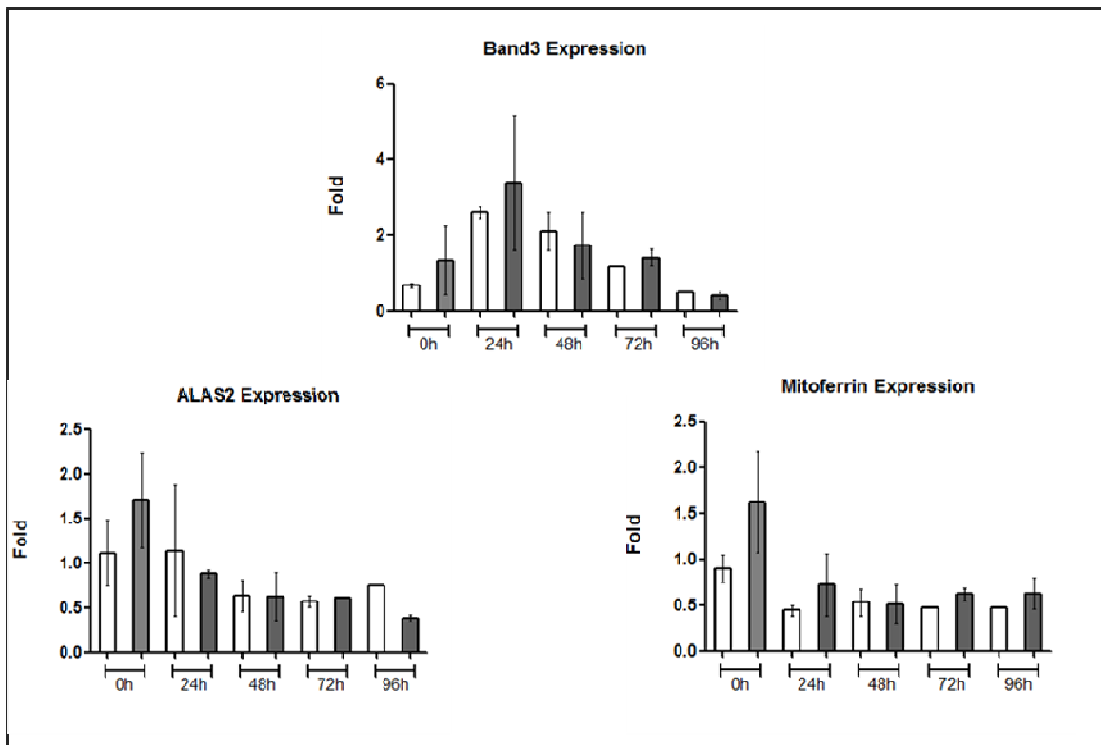


Figura 40. Padrão de expressão dos genes marcadores eritroides Band3, ALAS2 e Mitoferrina por qRT-PCR em linhagem de células K562 controle, silenciadas para o gene *LXN* e tratadas com Hemina.

No eixo das abscissas temos as amostras de células controle (barras em branco) e silenciadas (barras em cinza) relativas aos pontos de coleta 0h, sem Hemina, 24, 48, 72 e 96h após adição de Hemina. O eixo das ordenadas representa a diferença de expressão (*fold change*).

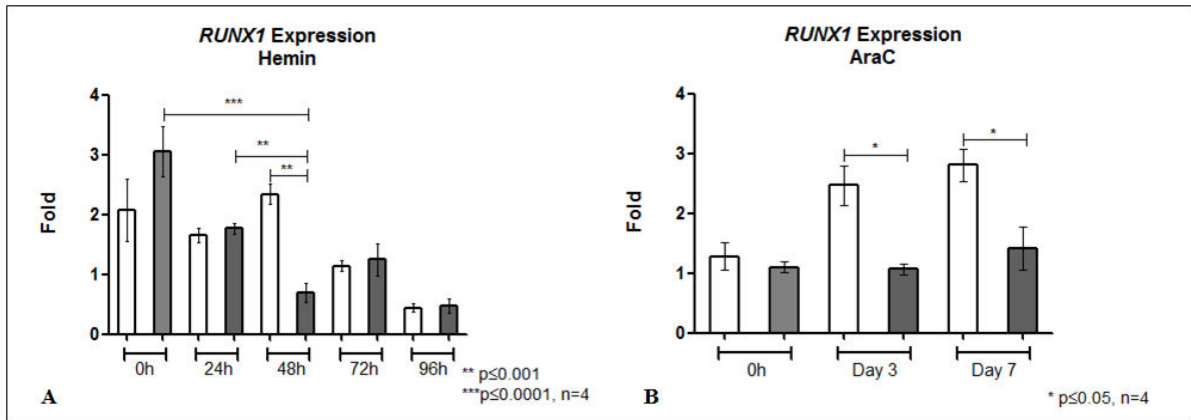


Figura 41. Padrão de expressão do gene *RUNX-1* por qRT-PCR em linhagem de células K562 controle, silenciadas para o gene *LXN* e tratadas com Hemina ou AraC.

O gráfico A representa a expressão gênica de *RUNX-1* em culturas de células K562 controle e silenciada para o gene *LXN* induzidas com hemina. O gráfico B representa a expressão gênica de *RUNX-1* em culturas de células K562 controle e silenciada para o gene *LXN* induzidas com AraC. No eixo das abscissas temos as amostras de células controle (barras em branco) e silenciadas (barras em cinza) relativas aos pontos de coleta 0h, sem Hemina, 24, 48, 72 e 96h após adição de Hemina e 0h, dia 3 e dia 7 após adição de AraC. O eixo das ordenadas representa a diferença de expressão (*fold change*). Teste estatístico: 1 way ANOVA, * p<0.05; ** p<0.001, *** p<0.0001; n=4.

5.16-) Expressão dos genes *EYA3* e *LXN* em reticulócitos de pacientes com anemia falciforme (SS) e Talassemia beta intermediária (TI)

A expressão dos genes *EYA3* e *LXN* em reticulócitos obtidos a partir de pacientes SS, TI e indivíduos controles normais também foi avaliada.

Os pacientes SS foram separados em dois grupos: um grupo submetido ao tratamento com a droga Hidroxiuréia (HU) e outro grupo sem tratamento com HU. A figura 42 apresenta a análise quantitativa da expressão dos genes *EYA3* e *LXN* em pacientes SS. Os resultados indicaram diminuição estatisticamente significativa da expressão dos genes *EYA3* e *LXN* nos pacientes SS em relação ao grupo de indivíduos controle. Outro dado obtido é que não existe diferença significativa da expressão de ambos os genes quando relacionamos os dois grupos de pacientes SS considerados, os tratados com HU e os não tratados com essa droga.

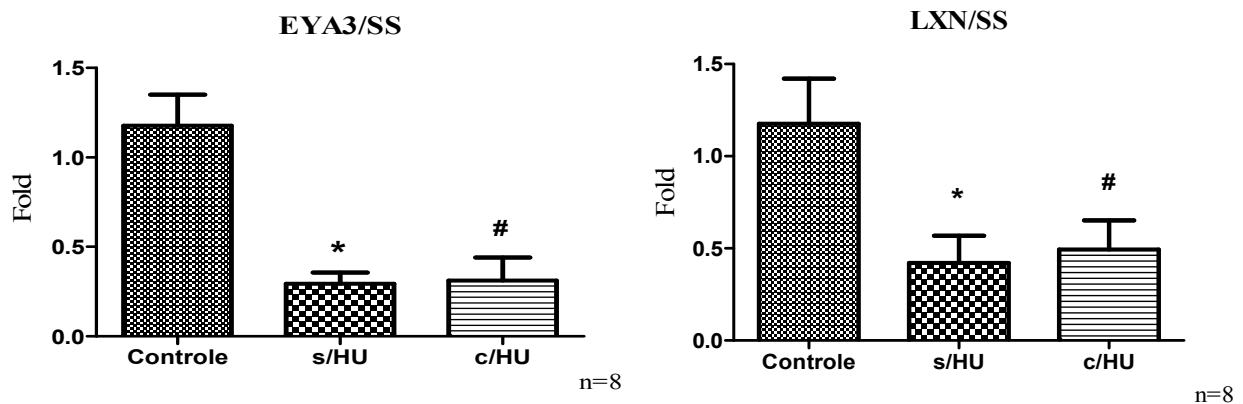


Figura 42. Análise quantitativa da expressão dos genes *EYA3* e *LXN* em reticulócitos de indivíduos controles normais e pacientes SS.

As expressões dos genes *EYA3* e *LXN* foram quantificadas por qRT-PCR. O eixo das ordenadas representa a diferença de expressão (*fold change*). No eixo das abscissas, temos a nomeação de cada grupo estudado: grupo controle, grupo de pacientes SS sem tratamento com HU e grupo de pacientes tratados com HU. Os símbolos * e # representam diferença estatística significativa da expressão dos genes *EYA3* e *LXN* entre controle e pacientes não tratados e tratados com HU, respectivamente ($p < 0,05$), $n=8$ controles; $n=8$ c/HU; $n=8$ s/HU.

A avaliação da expressão dos genes *EYA3* e *LXN* a partir de reticulócitos de pacientes com beta talassemia intermediária IVS-I-6 (TI) mostrou que o gene *LXN* está significativamente menos expresso neste grupo em relação aos reticulócitos do grupo controle (figura 43). Com relação ao gene *EYA3*, não houve diferença estatística na expressão desse gene em ambos os grupos avaliados.

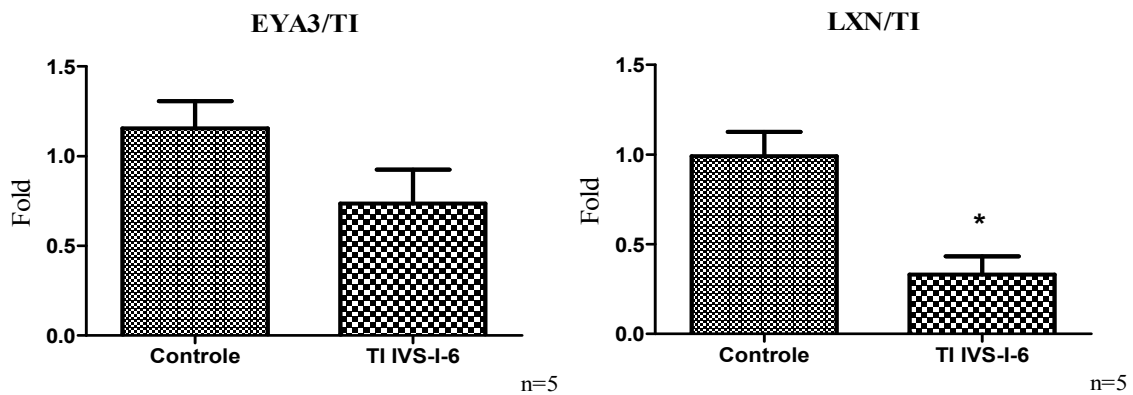


Figura 43. Padrão de expressão dos genes *EYA3* e *LXN* em reticulócitos de indivíduos controles normais e pacientes TI.

As expressões dos genes *EYA3* e *LXN* foram quantificadas por qRT-PCR. O eixo das ordenadas representa a diferença de expressão (*fold change*). No eixo das abscissas, temos a nomeação de cada grupo estudado: grupo controle e grupo representado por pacientes TI (IVS-I-6), n=5controles; n=5 TI.

5.17-) Expressão dos genes candidatos *clpx1* e *clpx2* em *Danio rerio* por Hibridização *in situ*

O gene CLPX apresenta dois possíveis ortólogos em *zebrafish*, *clpx1* e *clpx2*, outro exemplo de duplicação nesse modelo animal. A hibridização *in situ* para estes genes não mostrou padrão de expressão específico na ICM em embriões WT e embriões mutantes *dino* (figura 44).

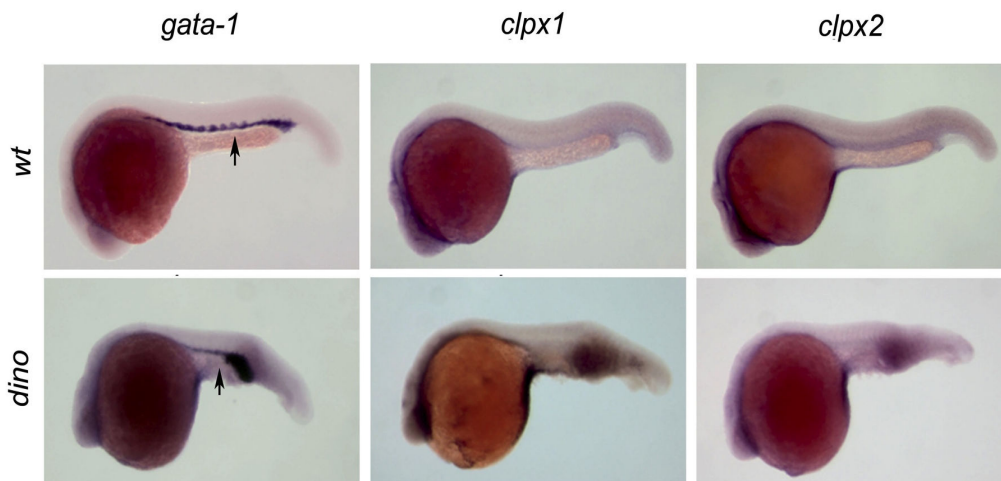


Figura 44. Análise do padrão de expressão dos genes *clpx1* e *clpx2* em embriões de *Danio rerio* 24hpf.

A expressão dos genes *clpx1* e *clpx2* foi avaliada por hibridização *in situ* em embriões WT e mutantes *dino* 24hpf. Probe *anti-sense* para *gata1* foi utilizada como controle positivo da *WISH*. Pode-se observar expressão ubíqua desses genes nos embriões avaliados.

5.18-) Avaliação do padrão de hemoglobinação e quantificação de eritrócitos em *zebrafish* 72hpf injetados e não injetados com o *clpx1* e *clpx2-morpholino*

O silenciamento do gene *clpx1* gerou fenótipo anêmico em embriões de *zebrafish* 72hpf para os dois *morpholinos* testados (*clpx1MOa* e *clpx1MOb*) (figura 45). O silenciamento efetivo foi confirmado por qRT-PCR (figura 45). Com relação ao gene *clpx2*, as microinjeções geraram *morphants* anêmicos, no entanto não houve silenciamento efetivo do gene alvo (figura 46).

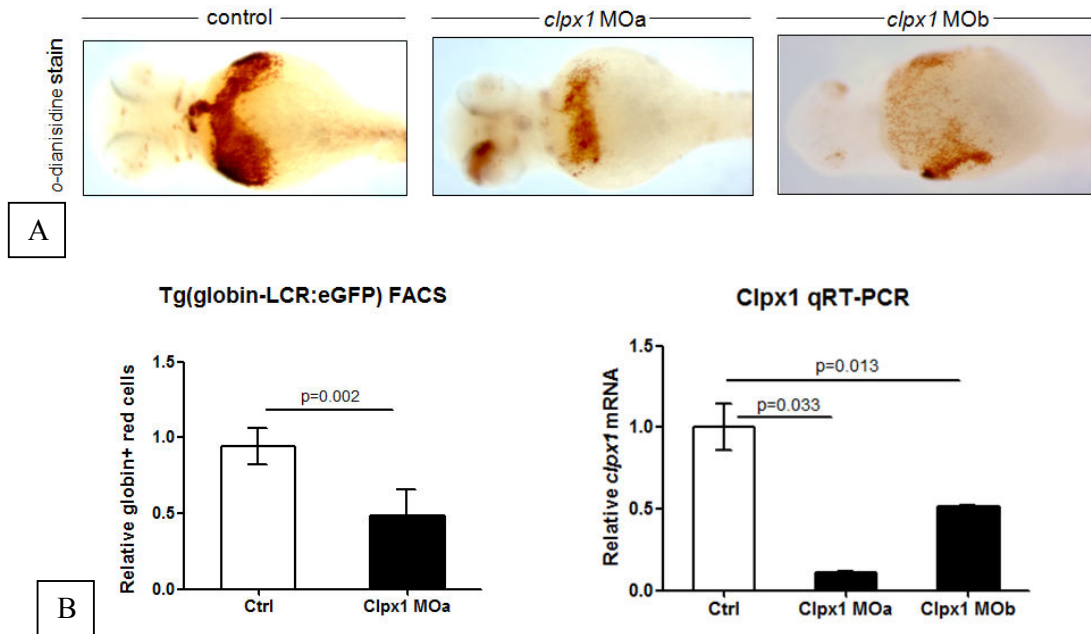


Figura 45. Análise da expressão do padrão de hemoglobinação e quantificação de eritrócitos em zebrafish *72hpf* injetados e não injetados com o *clpx1-morpholino*.

(A) O padrão de hemoglobinação foi avaliado através da marcação por benzidina de embriões *72hpf* controle e injetados com o *morpholino*-alvo de interesse. (B) A técnica de FACS sorting foi utilizada para quantificação das células eritroides em embriões *72hpf* controle e injetados. (C) Quantificação de mRNA do gene *clpx* foi avaliada por qRT-PCR em embriões *72hpf* controle-não injetados e injetados.

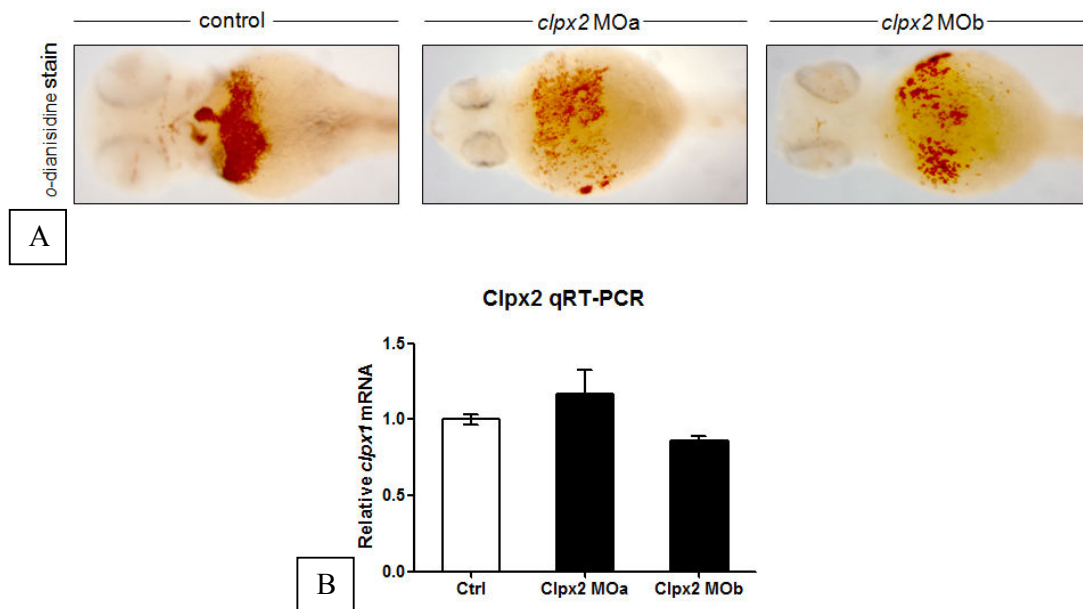


Figura 46. Análise da expressão do padrão de hemoglobinação em *zebrafish 72hpf* injetados e não injetados com o *clpx2-morpholino*.

(A) O padrão de hemoglobinação foi avaliado através da marcação por benzidina de embriões *72hpf* controle e injetados com o *morpholino*-alvo de interesse. (B) Quantificação de mRNA do gene *clpx2* foi avaliada por qRT-PCR em embriões *72hpf* controle-não injetados e injetados.

5.19-) Identificação dos candidatos ortólogos em *zebrafish* dos genes humanos

TRAK

Segundo as análises Blast, foram encontrados quatro possíveis ortólogos em *zebrafish* para o gene humano *TRAK2*: *trak2* (XP_689302.5); *trak1.1* (XP_001921312.1); *trak1.2* (XP_001922729.2) e *trak1.3* (XP_003200700.1) (tabela 3 e figura 47).

Tabela 3. Candidatos homólogos em *zebrafish* para gene humano *EYA3*.

Accession	Description	Query coverage	E value	Max ident
XP_689302.5 (Trak 2)	PREDICTED: trafficking kinesin-binding protein 2 (Danio rerio)	91%	0.0	51%
XP_001921312.1 (Trak 1.1)	PREDICTED: trafficking kinesin-binding protein 1 (Danio rerio)	95%	0.0	44%
XP_001922729.2 (Trak1.2)	PREDICTED: trafficking kinesin-binding protein 1-like (Danio rerio)	56%	3e-110	44%
XP_003200700.1 (Trak 1.3)	PREDICTED: trafficking kinesin-binding protein 1-like (Danio rerio)	83%	6e-58	41%

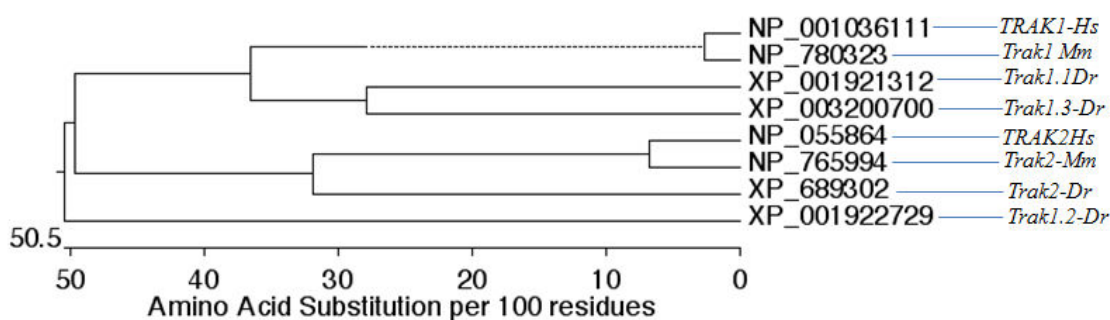


Figura 47. Relação filogenética entre os genes homólogos de *Danio rerio*, *Mus musculus* e *Homo sapiens* do gene *Trak2*.

A árvore filogenética foi construída baseada no método de J. Hein. A aplicação MegAlign do software DNASTAR foi utilizada para a realização de alinhamento múltiplos e construção do dendrograma filogenético.

5.20-) Expressão dos genes *trak2*, *trak1.1*, *trak1.2* e *trak1.3* em *Danio rerio* por Hibridização *in situ*.

As análises por Hibridização *in situ* mostraram que o gene *trak1.1* (XP_001921312.1) foi o único que apresentou expressão na ICM. A figura 48 mostra o padrão de expressão em embriões de *zebrafish* para os genes *trak2*, *trak1.1*, *trak1.2* e *trak1.3*. A figura 49 mostra a expressão do gene *trak1.1* nos mutantes *dino* e *spadetail*.

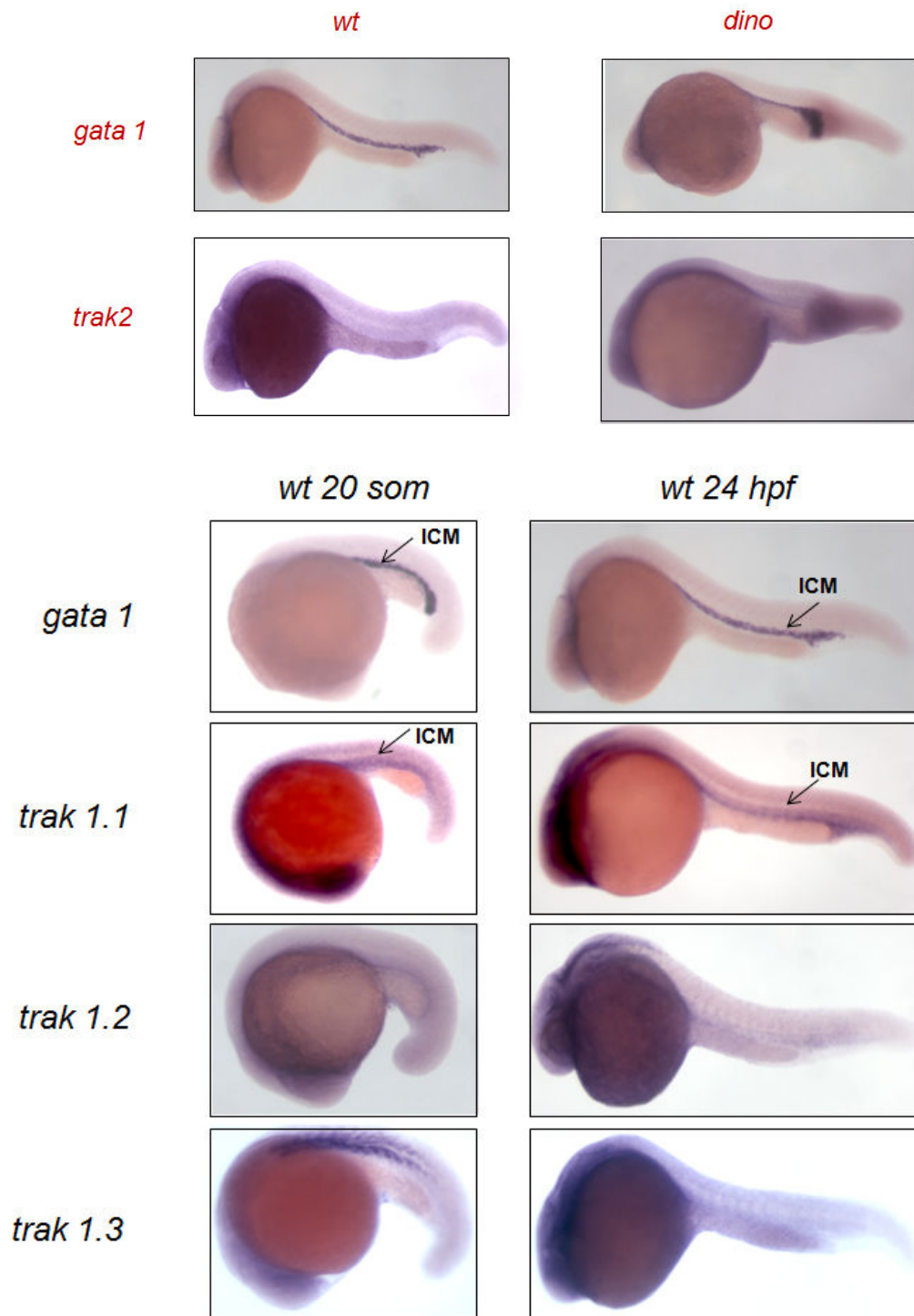


Figura 48. Análise do padrão de expressão dos genes candidatos *trak2*, *trak1.1*, *trak1.2* e *trak1.3* em embriões de *Danio rerio* com 20 somitos e 24hpf.

A expressão dos genes *trak2*, *trak1.1*, *trak1.2* e *trak1.3* foi avaliada por hibridização *in situ* em embriões com 20 somitos e 24hpf WT e, no caso do candidato *trak2*, em embriões mutantes *dino*. Probe *anti-sense* para *gata1* foi utilizada como controle positivo da *WISH*. Pode-se observar expressão na ICM (*Intermediate Cell Mass*) no candidato *trak1.1*.

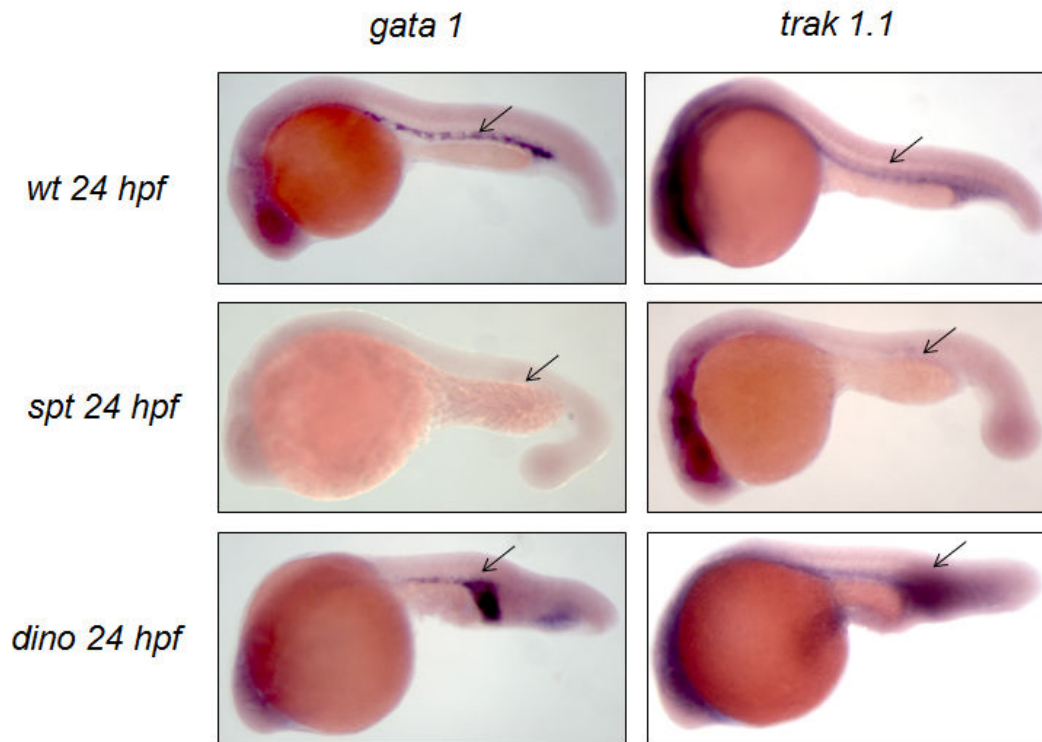


Figura 49. Análise do padrão de expressão do gene candidato *trak1.1* em embriões de *Danio rerio* 24hpf.

A expressão do gene *trak1.1* foi avaliada por hibridização in situ em embriões WT e em embriões mutantes spadetail e dino. Probe anti-sense para *gata1* foi utilizada como controle positivo da *WISH*. Pode-se observar expressão na ICM (*Intermediate Cell Mass*) no candidato *trak1.1*.

5.21-) Avaliação do padrão de hemoglobinizacão e quantificacão de eritrócitos em *zebrafish 72hpf* injetados e não injetados com o *trak1.1-morpholino*

O *knockdown* para o gene *trak1.1*, em ambos os *morpholinos*, mostrou fenótipo anêmico em embriões avaliados *72hpf* por coloraçã de benzidina e quantificacão de eritrócitos por FACs sorting (figura 50).

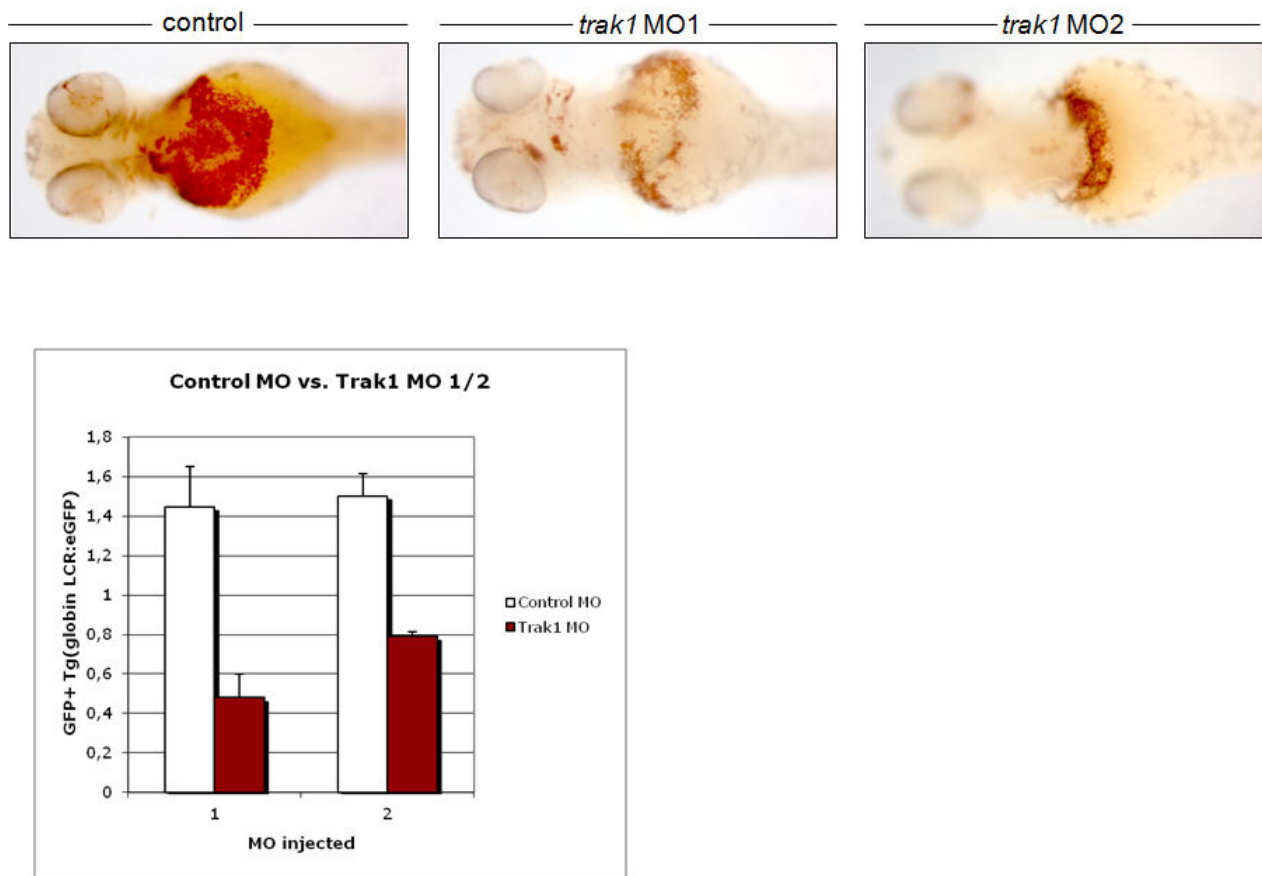


Figura 50. Análise da expressã do padrã de hemoglobinizacão em *zebrafish 72hpf* injetados e não injetados com o *trak1.1-morpholino*.

O padrã de hemoglobinizacão foi avaliado atravẽs da marcaçã por benzidina e a quantificacão de eritrócitos foi realizada por FACs sorting em embriões *72hpf* controle e injetados com o *morpholino*-alvo de interesse.

5.22-) Participação dos fatores de transcrição da família Gfi, em teleóteos, nas sucessivas ondas de hematopoese

O artigo (material anexo) mostra a participação dos fatores de transcrição de *zebrafish gfi1a* e *gfi1b*, ortólogos aos fatores de transcrição *Grow Factor Independence* (Gfi) em humanos, na regulação distinta durante os processos inicial e definitivo da hematopoese.

A figura 51 mostra a relação filogenética entre os membros da família de fatores de transcrição Gfi em *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Danio rerio*. Os clusteres de *gfi1aa* e *gfiab* encontram-se mais próximos de Gfi1a em mamíferos. Esses dados sugerem que em *zebrafish*, a função correspondente ao Gfi1a de mamíferos, está dividida entre esses dois genes.

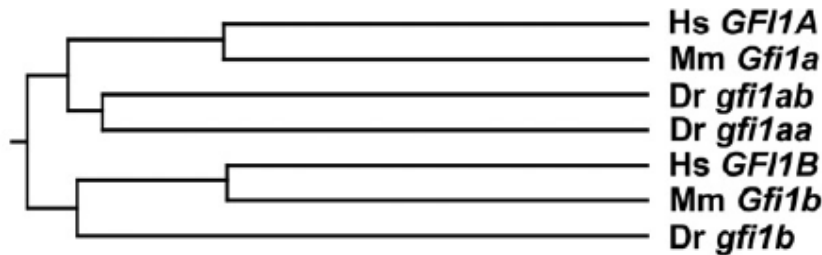


Figura 51. Relação filogenética entre os genes da família dos fatores de transcrição Gfi em *Danio rerio*, *Mus musculus* e *Homo sapiens*.

A árvore filogenética foi construída baseada no método de J. Hein. A aplicação MegAlign do software DNASTAR foi utilizada para a realização de alinhamento múltiplos e construção do dendrograma filogenético (Conney et al., 2012).

Com objetivo de avaliar o padrão de expressão dos genes *gf1aa* e *gf1b* durante a hematopoese, foi realizada *WISH* para ambos os genes em diferentes estágios embrionários de *zebrafish*. Os fatores de transcrição FOG-1 e runx-1 e c-myb foram utilizados como controles da hematopoese primitiva e definitiva, respectivamente. A figura 52 mostra o padrão de expressão dos genes *gf1aa* e *gf1b* durante as hematopoeses primitiva e definitiva. Nos estágios de 5 e 10 somitos, o *gf1aa* está expresso na LPM (*Lateral Plate Mesoderm*), sugerindo sua participação nas fases iniciais da hematopoese (figura 52, h-k). O *gf1b*, por sua vez, está expresso na ectoderme (figura 52, i-l). A LPM converge para ICM no estágio de 15 somitos. A partir dessa fase, o *gf1b* passa a ser expresso na ICM (figura 52 o,r). No estágio de 20 somitos, tanto *gf1aa* quanto *gf1b* apresentam expressão na ICM (figura 52, s-u), mas o primeiro passa a ser menos expresso a partir de 24hpf (figura 52, w). Em contrapartida, o gene *gf1b* encontra-se fortemente expresso nessa fase (figura 52,v,x). Em estágios posteriores, ambos os genes, *gf1aa* e *gf1b*, apresentam expressão na AGM (figura 52B, a-f).

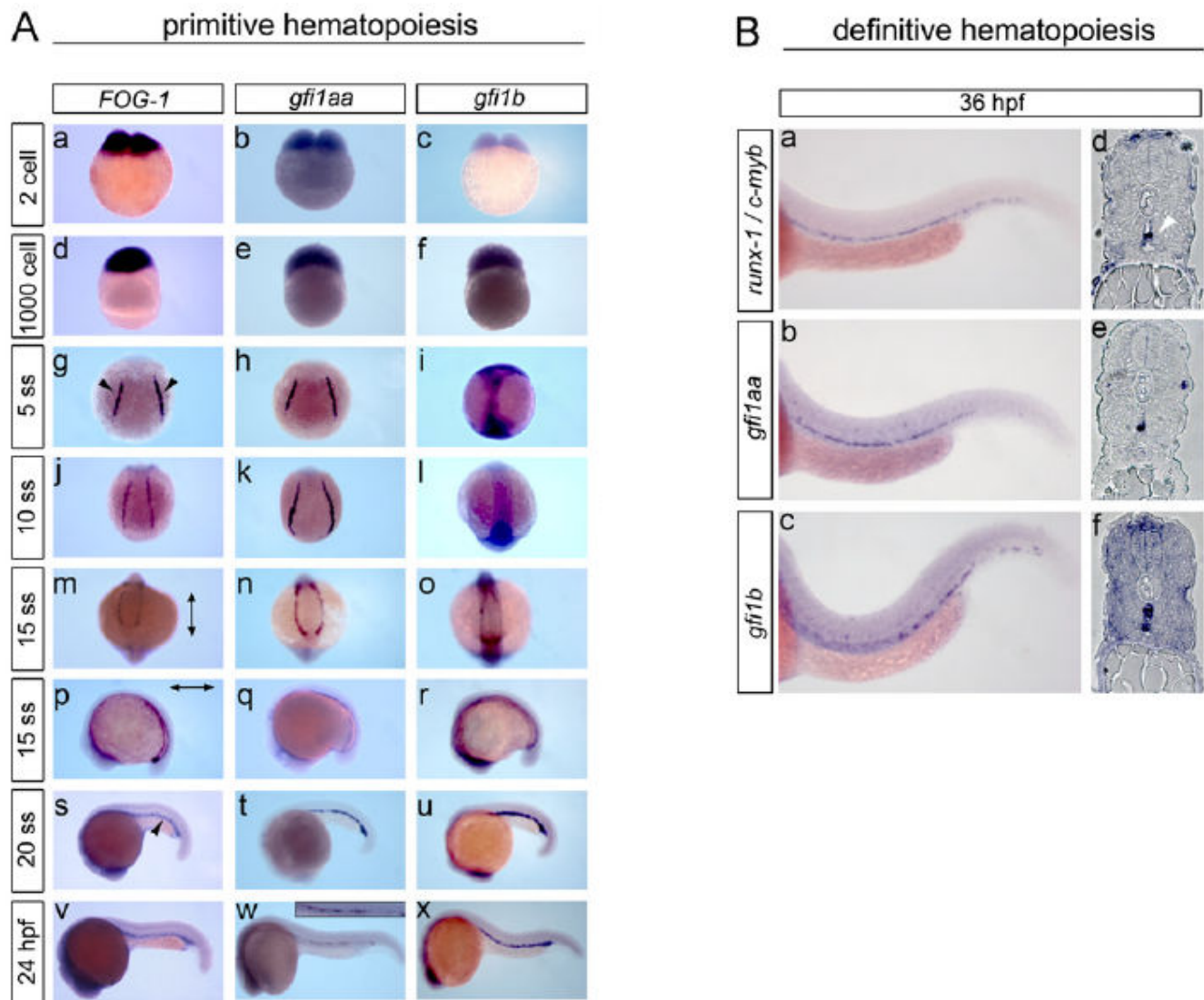


Figura 52. Análise do padrão de expressão dos genes *gfi1aa* e *gfi1b* durante as hematopoeses primitiva e definitiva em embriões de *Danio rerio*.

(A) O fator de transcrição FOG1 é utilizado como controle da hematopoese primitiva. Nos estágios de 5 e 10 somitos, a expressão de *gfi1aa* e FOG1 está localizada na LPM (*Lateral Plate Mesoderm*) (g-h, j-k), diferentemente de *gfi1b*, cuja expressão está na ectoderme (i,l). No estágio de 15 somitos, a LPM converge para ICM (*Intern Cell Mass*). Tanto *gfi1aa* quanto *gfi1b* estão fortemente expressos no estágio de 20 somitos, da mesma forma que FOG-1 (s-u). No estágio de 24hpf, as expressões de *gfi1b* e FOG1 permanecem fortes na ICM, enquanto que ocorre diminuição da expressão de *gfi1a* nesse local (v-x). (B) Os fatores de transcrição *c-myb* e *runx-1* são utilizados como controles da fase definitiva da hematopoese. (Conney *et al.*, 2012).

Para avaliar o papel dos genes *gf1aa* e *gf1b* na eritropoese, foram contruídos dois *morpholinos* para cada um dos genes e, realizado o silenciamento para eles. Os *morphants* 48hpf para o gene *gf1aa* apresentaram diminuição da hemoglobinizacão em relação aos embriões controle. Em contrapartida, os *morphants* para o gene *gf1b* mostraram níveis normais de hemoglobinizacão. Já em embriões 72hpf, os *morphants* para ambos os genes apresentaram redução parcial da hemoglobinizacão (figura 53). De forma bastante interessante, quando ambos os genes são silenciados em conjunto, os embriões no estágio de 72hpf resultantes mostraram redução total de células hemoglobinizadas.

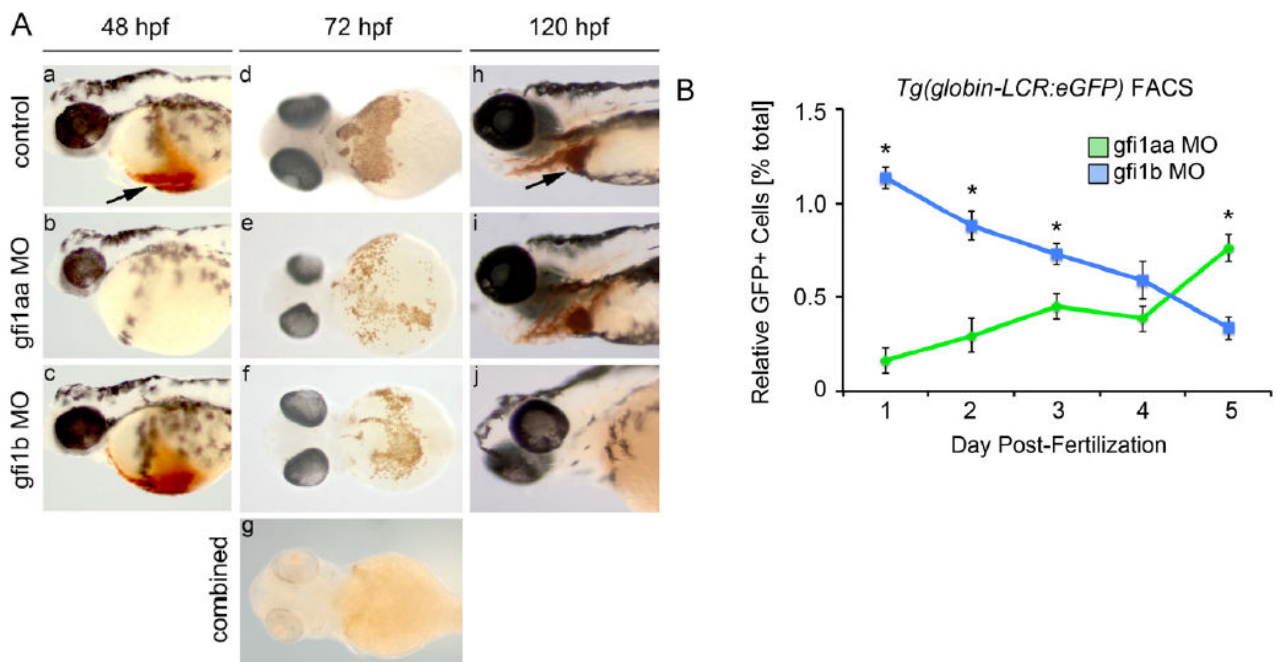


Figura 53. Análise do padrão de hemoglobinizacão em embriões de zebrafish nos estágios 48, 72 e 120hpf injetados e não injetados com o *gf1aa* e/ou *gf1ab*-morpholino.

(A) O padrão de hemoglobinizacão foi avaliado através da marcação por benzidina. O silenciamento do gene *gf1aa* promove anemia severa em embriões no estágio de 48hpf (a-b), já o silenciamento de *gf1b* não promove alteracão nessa fase (a-c). O silenciamento de ambos os genes, separadamente, promove reduçao parcial da hemoglobinizacão em embriões 72hpf, enquanto que o silenciamento em conjunto promove uma reduçao mais profunda na hemoglobinizacão (d-g). No estágio de 120hpf, os *morphants* para *gf1aa* não apresentaram mais anemia profunda, enquanto que os *morphants* para *gf1b* continuam anêmicos (h-j). (B) Quantificacão de eritrócitos foi realizada por FACS sorting em embriões controle e injetados com o *morpholino*-alvo de interesse (Conney *et al.*, 2012).

Para avaliar o papel dos genes *gf1aa* e *gf1b* nas diferentes fases da hematopoese, os *morphants* para esses genes foram submetidos à *WISH* para avaliação da expressão de genes envolvidos na fase primitiva da hematopoese. Os embriões injetados tanto para *gf1aa*-MO quanto para *gf1b*-MO apresentaram padrão normal de expressão de *lmo2* e *gata2* no estágio de 20 somitos (figura 54A, a-f). Contudo, os *morphants* para *gf1aa* mostraram redução da expressão de *scl* e *gata1* (figura 54, h,k), os quais são marcadores da hematopoese primitiva, expressão essa que não foi alterada em *morphants* para *gf1b* (figura 54A, i,l).

Para quantificar os dados obtidos anteriormente, os genes *gf1aa* e *gf1b* foram silenciados em embriões de peixes transgênicos Tg (*gata1:eGFP*) e Tg (*pu.1:eGFP*), marcadores primitivos da hematopoese. Os embriões transgênicos Tg (*gata1:eGFP*) no estágio de 20 somitos mostraram diminuição da população de progenitores eitroides quando o gene *gf1aa* foi silenciado. No entanto, não houve alteração em embriões *morphants* para *gf1b* (figura 54Ba). Embriões transgênicos Tg (*pu.1: eGFP*) no estágio de 20 somitos apresentaram aumento da população de progenitores mieloides em quando o gene *gf1aa* foi silenciado, no entanto, não houve alteração em *morphants* para o gene *gf1b* (figura 54Bb).

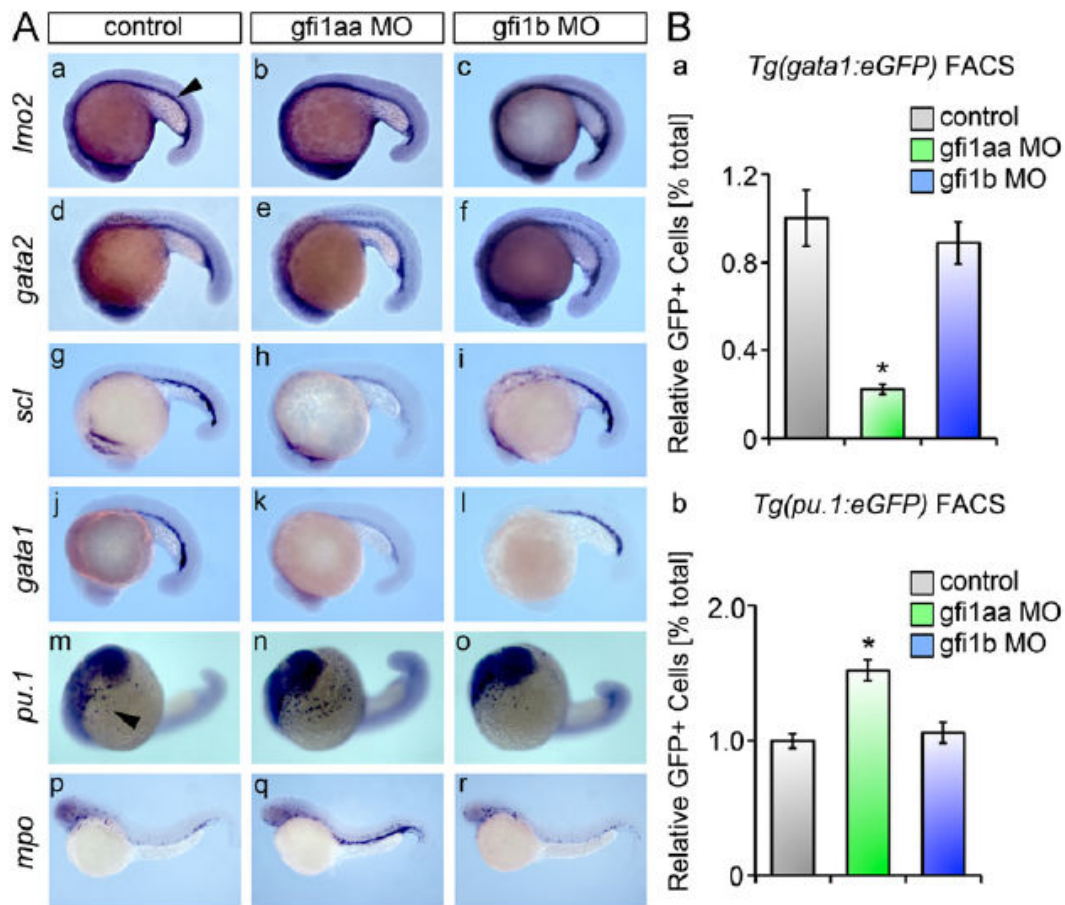


Figura 54. O gene *gfi1a* regula a fase primitiva da hematopoese.

(A) A expressão de genes marcadores da hematopoese primitiva foi avaliada em embriões morphants para *gfi1a* e controles no estágio de 20 somitos. (a-f) A expressão de *lmo2* e *gata2* na ICM foi preservada em embriões controle e injetados. (g-l) Os morphants para *gfi1aa* mostraram expressão dos marcadores hematopoéticos primitivos *scl* e *gata1* reduzida. No entanto, o silenciamento de *gfi1b* não afeta *gata1* ou *scl* (c, f, i, l). (m-o) O silenciamento de *gfi1aa* foi capaz de aumentar a população de progenitores mielóides *pu.1*, enquanto que os morphants para *gfi1b* não mostraram alteração nesse marcador. (p-r) A população mielóide *mpo* estava aumentada em morphants *gfi1aa*. (B) Foi realizada quantificação de eritrócitos por FACS sorting em peixes transgênicos reporters para a onda primitiva da hematopoese, após o silenciamento do gene-alvo. (a) Os embriões transgênicos *Tg(gata1:eGFP)* no estágio de 20 somitos mostraram diminuição da população de progenitores eritroides quando o gene *gfi1aa* foi silenciado. No entanto, não houve alteração em embriões morphants para *gfi1b*. (b) Embriões transgênicos *Tg(pu.1:eGFP)* no estágio de 20 somitos apresentaram aumento da população de progenitores mielóides em quando o gene *gfi1aa* foi silenciado, no entanto, não houve alteração em morphants para o gene *gfi1b*. (Conney *et al.*, 2012).

Para avaliar o papel dos genes *gf1aa* e *gf1ab* na hematopoese definitiva, esses genes foram silenciados e seus embriões foram avaliados por *WISH* para os marcadores da hematopoese definitiva *runx-1*, *c-myb* e *ikaros*. O silenciamento de *gf1b* reduz a expressão desses marcadores, mas os morphants para *gf1aa* não alteram o padrão de expressão em embriões na AGM, no estágio de 96hpf (figura 55, a-f). Adicionalmente, para quantificar a redução de HSC definitiva, foi utilizada a linhagem transgênica Tg (*cd41:eGFP*). O silenciamento de *gf1b* reduziu a população de HSC definitiva, mas não houve redução em morphants para *gf1aa* (figura 55, g-i).

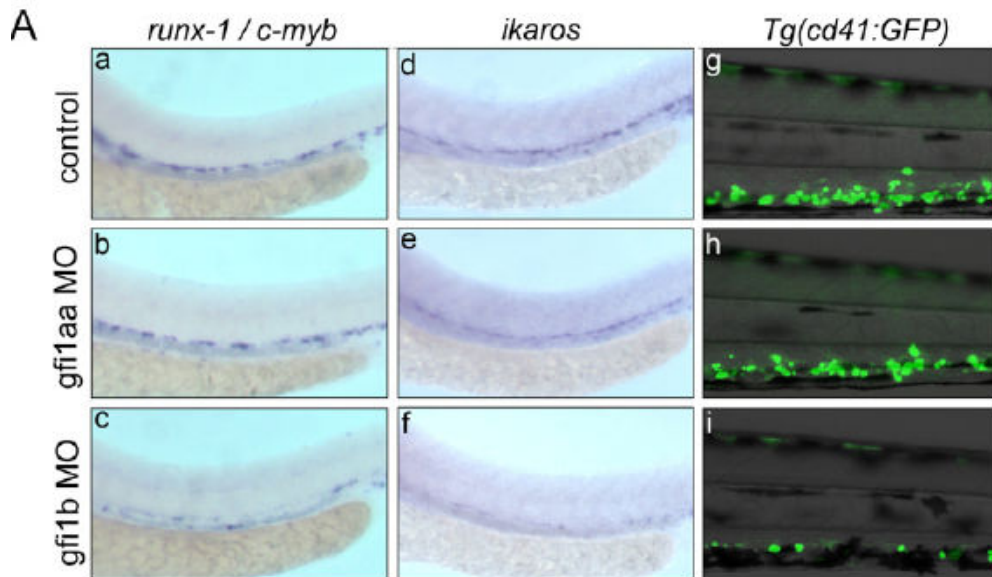


Figura 55. O silenciamento de *gf1b* reduz a população de HSC definitiva.

(A) O silenciamento de *gf1b* reduz a expressão dos marcadores da hematopoese definitiva *runx-1*, *c-myb* e *ikaros* em HSC da AGM, no estágio de 36hpf (a-f). Adicionalmente, o silenciamento desse gene causou redução de células *cd41+* em embriões de peixes transgênicos Tg (*cd41:eGFP*) no estágio de 96hpf (g-i). (Conney et al., 2012).

6-) DISCUSSÃO

A elucidação de novos mecanismos envolvidos no perfil de expressão durante a diferenciação eritroide tem sido objeto de numerosas investigações. Um estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa identificou três genes, *EYA3*, *HES6* e *LXN* que poderiam participar do processo de diferenciação eritroide (Cunha *et al.*, 2010).

Através do método *in vitro* de cultura de células primárias CD34⁺ utilizando amostras de indivíduos controle, foi observado um aumento da expressão do gene *EYA3* durante a eritropoese, com expressão significativa no estágio final da diferenciação eritroide. O outro gene avaliado, *LXN*, apresentou maior expressão nos estágios intermediário e final da diferenciação eritroide. Resultados adicionais, a partir da utilização da linhagem celular K562 induzida com hemina, mostraram aumento da expressão destes genes.

Não existem dados na literatura que mostrem a participação dos genes *EYA3* e *LXN* no processo de eritropoese. Os genes *EYA1* e *EYA2* foram identificados em famílias hematopoéticas primordiais (Terskikh, 2003) enquanto que camundongos *knockout* para o gene *EYA3* apresentaram anemia leve (dados obtidos por comunicação pessoal com Söker *et al.*). Dessa forma, o conjunto de dados disponíveis sugere que a participação do gene *EYA3* na eritropoese deveria ser investigada. A latexina está envolvida no controle populacional de células pluripotentes hematopoéticas de camundongos e sua expressão parece ser inversamente proporcional ao número de HSC (Liang *et al.*, 2007). Os resultados encontrados em cultura de células sugerem que os genes *EYA3* e *LXN* podem estar envolvidos durante a eritropoese *in vitro*.

Para tentar compreender o papel desses genes lançou-se mão da ferramenta de silenciamento gênico por RNA de interferência em modelo de células K562 diferenciadas com hemina. Após 72h do tratamento com hemina foi observada

diminuição significativa da expressão gênica das globinas alfa e gama e da produção de HbF nas culturas silenciadas tanto para o gene *EYA3* quanto para o gene *LXN*.

A K562 é um modelo bem estabelecido na literatura para o estudo da diferenciação eritroide, porém é uma célula que apresenta níveis não significativos de globina beta, e, conseqüentemente, não produz hemoglobina adulta (Baliga *et al*, 1993). Embora o sistema de cultura de células tenha apresentado dados que possivelmente indicariam o envolvimento dos genes *EYA3* e *LXN* na diferenciação eritroide, a utilização de um modelo *in vivo*, como o *zebrafish*, poderia fornecer dados mais robustos referentes à função destes genes durante a eritropoese.

Inicialmente foram identificados os genes ortólogos candidatos em *zebrafish* dos genes humanos: *EYA3* (*eya1*, *eya2*, *eya3* e *eya4*), *HES6* (*hes6* e *hes13*) e *LXN* (*lxn*) e determinada a relação filogenética para esses genes nos vertebrados: *zebrafish*, camundongos e humanos.

A análise da expressão dos genes *eya1*, *eya2*, *eya3*, *eya4*, *hes6* e *hes13* mostrou baixa especificidade de participação em processos de produção de células eritroides (sem expressão específica na ICM), com expressão ubíqua, sobretudo em células neuronais e musculares. O padrão de expressão encontrado em *zebrafish* não foi favorável para um gene candidato à participação na eritropoese. Como previamente mencionado, a ICM está situada funcionalmente entre as hematopoeses primitiva e definitiva, onde grande parte dos genes envolvidos na eritropoese encontra-se expressa.

A análise do gene *lxn* apresentou padrão de expressão específico na ICM em embriões no estágio de 20 somitos e 24*hpf* avaliados por *WISH*. Este padrão encontrado foi confirmado em linhagens mutantes de *zebrafish* *spadetail* (*spt*^{*b104*}) e *dino* (*din*^{*tt250*}), que funcionam como controles negativo e positivo, respectivamente, da expressão da

ICM em decorrência de suas mutações (Mueller *et al.*, 2010; Hammerschmidt *et al.*, 1996b).

A partir de informações prévias na literatura, recursos adicionais foram utilizados para ajudar a corroborar os dados de expressão *in situ*. A busca do padrão de expressão destes genes em bancos de dados foi um deles. Os genes humanos *EYA3* e *HES6* mostraram baixa especificidade na participação de processos de produção de células eritroides, apresentando expressão ubíqua. Os genes *mitoferrin* (Slc25a37) (<http://www.biogps.org/#goto=genereport&id=56925>), *band3* (SLC4A1) (<http://www.biogps.org/#goto=genereport&id=6521>) e *alas2* (<http://www.biogps.org/#goto=genereport&id=212>), são marcadores característicos de células eritroides e dessa forma, não apresentam padrão ubíquo como o *EYA3* e *HES6*.

O gene *LXN* foi o único a apresentar padrão de expressão não ubíquo; isto é, mostrou-se especialmente expresso em células e tecidos específicos comprometidos com a produção de células eritroides, como células CD34⁺, células eritroides primitivas CD71⁺ e fígado fetal.

O fato dos genes *EYA3* e *HES6* não apresentarem expressão na ICM não é indicativo de que não estejam envolvidos na eritropoese. Exemplo disso, é o gene *ATPase inhibitory factor 1 (atpif1)*, que apresentava padrão ubíquo de expressão em embriões de *zebrafish* e, no entanto, mostrou-se envolvido em processos como homeostase do heme e, conseqüentemente, no desenvolvimento de eritroblastos. (Shah *et al.*, 2012). Em contrapartida, proceder ao estudo de um gene que não apresenta indícios de participação na produção de eritrócitos representa pequenas chances de obtenção de resultados favoráveis. Importa ressaltar que a tarefa de silenciamento em *zebrafish* implica logo tempo de análise e, dessa forma, o gene *lxn* foi eleito o candidato mais promissor para a realização do silenciamento por microinjeção.

A injeção de *lxn-morpholinos* (*lxn-MOa*) em embriões de *zebrafish* gerou fenótipo anêmico em *morphants 72hpf*, avaliado através de coloração por benzidina e quantificação de eritrócitos por FACS *sorting*. No entanto, quando os embriões *72hpf* silenciados foram avaliados para *lxn-MOb*, não foi verificado o fenótipo esperado. A ausência de fenótipo anêmico pode ser explicada pelo fato do *MOb* não ter promovido um silenciamento eficiente nos embriões injetados, diferentemente do *MOa*, cuja redução de *lxn* mRNA atingiu níveis de 80% .

Com o objetivo de verificar em que etapa da produção de células eritroides o *knockdown* do gene *lxn* ocasionou anemia nos embriões de *zebrafish*, foi avaliado o fenótipo de *morphants* no estágio *48hpf*. No entanto, a microinjeção resultou em fenótipos não anêmicos nesse ponto. Esse tipo de achado ocorre com certa frequência nessa metodologia e pode sugerir resultado que o silenciamento do gene *lxn* comprometeu etapas finais da diferenciação eritroide. Defeitos nas etapas primordiais da produção de eritócitos foram capazes de afetar fenotipicamente embriões no estágio de *48hpf*, como observado após o *knockdown* de *gf1aa* (Conney, Hildick-Smith *et al.*, 2012). Os dados de *knockdown* para *lxn* obtidos em *zebrafish* corroboram os resultados encontrados no modelo *in vitro*, no qual o gene *LXN* esta significativamente mais expresso nas fases intermediária e final da diferenciação eritroide.

Quando a expressão dos fatores de transcrição envolvidos na hematopoese foi analisada, a expressão de *RUNX-1* estava significativamente diminuída nas amostras de cultura de células K562 silenciadas para o gene *LXN* e tratadas com hemina e AraC. O gene *RUNX1* codifica para *Runt-related transcription factor*, que faz parte da família gênica *RUNX* (*RUNX2* e *RUNX3*). Este fator de transcrição regula inúmeros aspectos da hematopoese. Estudos em que o gene *Runx1* foi nocauteado em camundongo mostraram que este fator é necessário para a hematopoese definitiva (Okuda *et al.*,

1996; Wang *et al.*, 1996). Já o *knockout* deste gene em *zebrafish* não altera significativamente a eritropoese primitiva, sugerindo a sua participação na onda da hematopoese definitiva, com consequentes prejuízos na formação de HSC e na diferenciação das demais linhagens hematopoéticas (Burns *et al.*, 2002; Kalev-Zylinska *et al.*, 2002).

A expressão dos genes *EYA3* e *LXN* também foi avaliada em reticulócitos isolados de pacientes com anemia falciforme e talassemia beta intermediária. Para o primeiro grupo, ambos os genes tiveram sua expressão significativamente menor em comparação ao grupo controle. Com relação aos reticulócitos de pacientes com talassemia beta intermediária, a expressão do gene *EYA3* não apresentou diferença estatística em comparação com o grupo controle, enquanto que o gene *LXN* teve sua expressão reduzida significativamente.

A latexina, única inibidora de carboxipeptidase (CPI) em mamíferos, é uma inibidora potente da carboxipeptidase A (CPA) (Uratani *et al.*, 2000; Aagaard *et al.*, 2005). A CPA é uma enzima pancreática, da família das exopeptidases, as quais quebram a porção C-terminal de um resíduo de aminoácido (Barrett *et al.*, 2004). Além disso, fazem parte do subgrupo das metalocarboxipeptidases dependentes de zinco, que promovem catálise através de uma ou duas ligações a íons de zinco (Hooper, 1994; Auld, 2004a). Estas enzimas são biossintetizadas com um peptídeo sinal e secretadas como enzimas inativas e têm sido descritas, em mamíferos, em locais como cérebro, coração, estômago, testículo e pulmão (Normant *et al.*, 1995a), participando da homeostase de hormônios, crescimento e da diferenciação de tecidos.

Que seja do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avaliou a possível participação do gene *LXN* na eritropoese, através do método de cultura de células eritróides *in vitro* e em modelo *in vivo* de *zebrafish*. Os dados obtidos neste trabalho são

novos e podem contribuir para a identificação de novas vias envolvidas na hematopoese.

Estudos adicionais estão em andamento, incluindo silenciamento do gene LXN em cultura de células KU812 e CD34⁺ e em outro modelo animal, *knockout* em camundongo, afim de melhor compreender a atuação desse gene, principalmente, na produção de células vermelhas.

O gene CLPX teve, inicialmente, sua possível função na síntese de heme avaliada em fungos. Existem dois possíveis ortólogos desse gene em *zebrafish*, *clpx1* e *clpx2*. O silenciamento do *clpx1* gerou embriões com hemoglobnização reduzida em relação aos embriões controle. No entanto, os *morpholinos* para o *clpx2* não promoveram um silenciamento efetivo. Estudos futuros terão por objetivo construir dois *morpholinos* adicionais para obtenção de um silenciamento eficiente do gene *clpx2*. A partir daí, duas hipóteses seriam possíveis: o silenciamento causar fenótipo anêmico ou os *morphants* não apresentarem alteração. Para a primeira hipótese, poderíamos sugerir que os ortólogos *clpx1* e *clpx2* apresentariam sua função dividida em *zebrafish*. Para a segunda hipótese, apenas o gene *clpx1* conservaria sua função inicial.

Com relação aos genes *TRAK*, foram encontrados quatro possíveis ortólogos em *zebrafish*, no entanto, apenas o gene *trak1.1* apresentou expressão específica na ICM. Os embriões silenciados para o gene *trak1.1* apresentaram fenótipo anêmico, corroborando assim, os dados prévios de cultura de células primárias. O estudo do TRAK mostrou a importância da avaliação prévia dos genes homólogos em *zebrafish* para um gene de interesse em outro organismo vertebrado. Nesse caso, apenas um dos quatro possíveis genes ortólogos sugeriu a conservação da função em humanos e teleósteos.

Finalmente, os fatores de transcrição da família Gfi de mamíferos apresentaram três ortólogos em *zebrafish*, *gf1aa*, *gf1ab* e *gf1b*. O gene *gf1ab* não apresentou padrão de expressão em tecidos hemetopoéticos e, portanto, apenas *gf1aa* e *gf1b* tiveram sua função avaliada na hematopoese. As análises do padrão de expressão desses genes em diferentes estágios embrionários de *zebrafish* mostraram que o *gf1aa* está mais expresso na fase primitiva e o *gf1b* na fase definitiva da hematopoese. Adicionalmente, foi avaliada a expressão de marcadores eritroides para ambas as fases hematopoéticas em *morphants* para esses genes. Os marcadores da fase primitiva como *scl* e *gata1* apresentaram expressão reduzida nos embriões silenciados para *gf1a*. Padrões esses confirmados quando a linhagem transgênica Tg (*gata1:eGFP*) foi utilizada. Já os marcadores da fase definitiva *runx-1*, *c-myb* e *ikaros* tiveram seu padrão de expressão reduzido em *morphants* para *gf1b*. Padrão esse confirmado quando a linhagem transgênica Tg (*cd41:eGFP*) foi utilizada. Esses dados sugerem que o gene *gf1aa* é regulador da hematopoese primitiva e que o gene *gf1b* regula a produção de HSC definitiva.

7-) CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo que avaliou o possível envolvimento dos genes *LXN*, *EYA3* e *HES6* durante a eritropoese. Os silenciamentos dos genes *EYA3* e *LXN* em cultura de células K562 mostraram redução do perfil de expressão dos genes das globinas e da produção de HbF. No entanto, quando esses genes foram analisados em *zebrafish*, apenas *lxn* apresentou expressão na ICM desses embriões. Adicionalmente, seu silenciamento nesse modelo *in vivo* gerou fenótipo anêmico nos embriões *morphants* e o silenciamento de *LXN* em células K562 reduziu significativamente os níveis de expressão do fator de transcrição *RUNX-1*, o qual está envolvido na hematopoese definitiva. Os dados obtidos nesse estudo sugerem que dentre os três genes avaliados, o *LXN* é o que maior apresenta potencial para possível participação na eritropoese. Embora os resultados para o gene *LXN* sejam promissores, experimentos adicionais são necessários para o maior esclarecimento do envolvimento desse gene na eritropoese.

O silenciamento do gene *clpx1* reduziu significativamente os níveis de hemoglobinação e produção de eritrócitos em *zebrafish*. Contudo, estudos adicionais para o gene *clpx2* precisam ser realizados para melhor compreender a possível função desses genes na produção de Heme.

Dentre os possíveis ortólogos para o gene TRAK2 humano, o *trak1.1* parece ser o único que conservou a mesma função nos teleósteos. O silenciamento desse gene gerou fenótipo anêmico nos embriões avaliados, corroborando os dados obtidos originalmente em cultura de células primária.

O silenciamento de *gflaa* reduziu a expressão de *scl* e *gata1*, marcadores de células progenitoras da fase inicial de hematopoese. Já a perda de *gflb* diminuiu a expressão de *runx-1*, *c-myb*, *ikaros* e *cd41*, sugerindo que este gene tem papel na

hematopoese definitiva. Também foi determinada a relação epistática entre os fatores *gfi* e os fatores de transcrição chave hematopoéticos, mostrando que *gfilaa* e *gfilb*, juntamente com *lmo2*, *scl*, *runx-1* e *c-myb* atuam como reguladores de HSPC em teleósteos.

8-) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aagaard A, Listwan P, Cowieson N, Huber T, Ravasi T, Wells CA, Flanagan JU, Kellie S, Hume DA, Kobe B, Martin JL. 2005. An inflammatory role for the mammalian carboxypeptidase inhibitor latexin: relationship to cystatins and the tumor suppressor TIG1. *Structure* 13:309-17.
- Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D, Vincent C, Weil D, Cruaud C, Sahly I, Leibovici M, Bitner-Glindzicz M, Francis M, Lacombe D, Vigneron J, Charachon R, Boven K, Bedbeder P, Van Regemorter N, Weissenbach J, Petit C. 1997. A human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nat. Genet.* 15:157-64.
- Al-Adhami MA, Kunz YW. 1977. Ontogenesis of haematopoietic sites in *Brachydaniorerio*. *Dev. Growth Differ.* 19:171-79.
- Alvarez-Buylla ER, Liljegren SJ, Pelaz S, Gold SE, Burgeff C, Ditta GS, Vergara-Silva F, Yanofsky MF. 2000. MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant. J.* 24:457-66.
- Amatruda JF, Zon LI. 1999. Dissecting hematopoiesis and disease using the zebrafish. *Dev. Biol.* 216:1-15.
- Amigo JD, Ackermann GE, Cope JJ, Yu M, Cooney JD, Ma D, Langer NB, Shafizadeh E, Shaw GC, Horsely W, Trede NS, Davidson AJ, Barut BA, Zhou Y, Wojiski SA, Traver D, Moran TB, Kourkoulis G, Hsu K, Kanki JP, Shah DI, Lin HF, Handin RI, Cantor AB, Paw BH. 2009. The role and regulation of friend of GATA-1 (FOG-1) during blood development in the zebrafish. *Blood* 114:4654-4663.
- Arimatsu Y. 1994. Latexin: a molecular marker for regional specification in the cerebral cortex. *Neurosci. Res.* 20:131-135.
- Baliga BS, Mankad M, Shah AK, Mankad VN. 1993. Mechanism of differentiation of human erythroleukaemic cell line K562 by hemin. *Cell. Prolif.* 26:519-29.
- Bank A. 1978. The thalassemia syndrome. *Blood* 51:369-84.
- Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. 2001. *Williams Hematology*. New York: McGraw-Hill.
- Bradley TB, Ranney HM. 1973. Acquired disorders of hemoglobin. *Prog. Hematol.* 8:77-98.
- Brownlie A, Zon L. 1999. The zebrafish as a model system for the study of hematopoiesis. *BioScience* 49:382-92.
- Bunn HF, Forget BG, Ranney HM. 1977. *Human Hemoglobins*. London: Saunders.
- Cantor AB, Orkin SH. 2002. Transcriptional regulation of erythropoiesis: An affair involving multiple partners. *Oncogene* 21:3368-76.

- Chen, AT, Zon LI. 2009. Zebrafish blood stem cells. *J. Cell. Biochem.* 108:35-42.
- Cicidalli G, Kerem H, Rachmilewits EA. 1980. Globin synthesis in severe and intermediate homozygous b-thalassemia in Israel. *Annu. New York Acad. Sci.* 344:132-40.
- Cooney JD, Hildick-Smith GJ, Shafizadeh E, McBride PF, Carroll KJ, Anderson H, Shaw GC, Tamplin OJ, Branco DS, Dalton AJ, Shah DI, Wong C, Gallagher PG, Zon LI, North TE, Paw BH. 2013. Teleost growth factor independence (gfi) genes differentially regulate successive waves of hematopoiesis. *Dev. Biol.* 373:431-41.
- Costa FF. 2001. Anemia Falciforme. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. *Hematologia: fundamentos e práticas.* São Paulo: Atheneu.
- Cumano A, Godin I. 2007. Ontogeny of the hematopoietic system. *Ann. Rev. Immunol.* 25:745-85.
- da Cunha AF, Brugnerotto AF, Duarte AS, Lanaro C, Costa GG, Saad ST, Costa FF. 2010. Global gene expression reveals a set of new genes involved in the modification of cells during erythroid differentiation. *Cell Prolif.* 43:297-309.
- Davidson AJ, Zon LI. 2004. The ‘definitive’ (and ‘primitive’) guide to zebrafish hematopoiesis. *Oncogene* 23:7233-46.
- Dean J, Schechter AN. 1978. Sickle cell anemia: Molecular and cellular bases of therapeutic approaches. *J. Med.* 299:752-63.
- de Jong JL, Zon LI. 2005. Use of the zebrafish system to study primitive and definitive hematopoiesis. *Annu. Rev. Genet.* 39:481-501.
- Dooley K, Zon LI. 2000. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10:252–56.
- Drexler HG. 2000. *The Leukemia-Lymphoma Cell Line Factsbook.* San Diego: Academic Press.
- Driever W, Fishman MC. 1996. The zebrafish: heritable disorders in transparent embryos. *J. Clin. Invest.* 97:1788–94.
- Dzierzak E. 2001. A developmental approach to hematopoiesis. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DH, Nagel RL. *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management.* Cambridge: University Press.
- Emerson S G. 1991. The stem cell model of hematopoiesis. In: Hoffman R, Benz EJ, Furie B, Shattil SJ. *Hematology: basic principles and practice.* New York: Churchill Livingstone.
- Elliott S, Pham E, Macdougall IC. 2008. Erythropoietins: a common mechanism of action. *Exp. Hematol.* 36:1573-84.

- Eun B, Lee Y, Hong S, Kim J, Lee HW, Kim K, Sun W, Kim H. 2008. Hes6 controls cell proliferation via interaction with cAMP-response element-binding protein-binding protein in the promyelocytic leukemia nuclear body. *J. Biol. Chem.* 283:5939-49.
- Fawcett DW. 1997. Hematopoiesis. In: Fawcett DW, Jensch R, Bloom & Fawcett: Concise Histology. New York: Oxford University Press.
- Felsenstein J. 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Syst. Zool.* 27:401-410.
- Finch CA. 1972. Pathophysiologic aspects of sickle cell anemia. *Am. J. Med.* 3:1-6.
- Gallo E, Massaro P, Miniero R, David D, Trella C. 1979. The importance of the genetic picture and globin synthesis in determining the clinical and haematological features of thalassemia intermedia. *Br. J. Haematol.* 41: 211-21.
- Galloway JL, Zon LI. 2003. Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Curr. Top. Dev. Biol.* 53:139-58.
- Gao X, Chandra T, Gratton M.-O, Quelo I, Prud'homme J, Stifani S, St-Arnaud R. 2001. HES6 acts as a transcriptional repressor in myoblasts and can induce the myogenic differentiation program. *J. Cell Biol.* 154: 1161-71.
- Ganis JJ, Hsia N, Trompouki E, de Jong JL, DiBiase A, Lambert JS, Jia Z, Sabo PJ, Weaver M, Sandstrom R, Stamatoyannopoulos JA, Zhou Y, Zon LI. 2012. Zebrafish globin switching occurs in two developmental stages and is controlled by the LCR. *Dev. Biol.* 366:185-94.
- Gering M, Rodaway AR, Gottgens B, Patient RK, Green AR. 1998. The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm. *EMBO J.* 17:4029-45.
- Gering M, Yamada Y, Rabbitts TH, Patient RK. 2003. Lmo2 and Scl/Tal1 convert non-axial mesoderm into haemangioblasts which differentiate into endothelial cells in the absence of Gata1. *Development* 130:6187-99.
- Gladwin MT, Rodgers GP. 2000. Pathogenesis and treatment of acute chest syndrome of sickle-cell anaemia. *Lancet* 355:1476-8.
- Goessling W, North TE. 2011. Hematopoietic stem cell development: using the zebrafish to identify the signaling networks and physical forces regulating hematopoiesis. *Methods Cell. Biol.* 105:117-36.
- Gratton MO, Torban E, Jasmin SB, Theriault FM, German MS, Stifani S. 2003. Hes6 promotes cortical neurogenesis and inhibits Hes1 transcription repression activity by multiple mechanisms. *Molec. Cell. Biol.* 23: 6922-35.
- Guernsey DL, Jiang H, Campagna DR, Evans SC, Ferguson M, Kellogg MD, Lachance M, Matsuoka M, Nightingale M, Rideout A, Saint-Amant L, Schmidt PJ, Orr A, Bottomley SS, Fleming MD, Ludman M, Dyaack S, Fernandez CV, Samuels ME. 2009.

Mutations in mitochondrial carrier family gene SLC25A38 cause nonsyndromic autosomal recessive congenital sideroblastic anemia. *Nat. Genet.* 41:651-3.

Haitina T, Lindblom J, Renström T, Fredriksson R. 2006. Fourteen novel human members of mitochondrial solute carrier family 25 (SLC25) widely expressed in the central nervous system. *Genomics* 88:779-90.

Hammerschmidt M, Pelegri F, Mullins MC, Kane DA, van Eeden FJ, Granato M, Brand M, Furutani-Seiki M, Haffter P, Heisenberg CP, Jiang YJ, Kelsh RN, Odenthal J, Warga RM, Nüsslein-Volhard C. 1996. *Dino* and *mercedes*, two genes regulating dorsal development in the zebrafish embryo. *Development* 123:95-102.

Hart DO, Raha T, Lawson ND, Green MR. 2007. Initiation of zebrafish haematopoiesis by the TATAbox-binding protein-related factor Trf3. *Nature* 450:1082-5.

Hsia N, Zon LI. 2005. Transcriptional regulation of hematopoietic stem cell development in zebrafish. *Exp. Hematol.* 33:1007-14.

Heasman, J. 2002. Morpholino oligos: making sense of antisense? *Dev. Biol.* 243:209-14.

Huang HT, Zon LI. 2008. Regulation of stem cells in the zebra fish hematopoietic system. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 73:111-8.

Iwasaki H, Akashi K. 2007. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity* 26:726-40.

de Jong JL, Zon LI. 2005. Use of the zebrafish system to study primitive and definitive hematopoiesis. *Annu. Rev. Genet.* 39:481-501.

Jemc J, Rebay I. 2007. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 513-53.

Jing L, Zon LI. 2011. Zebrafish as a model for normal and malignant hematopoiesis. *Dis. Model. Mech.* 4:433-8.

Kalev-Zylinska ML, Horsfield JA, Flores MV, Postlethwait JH, Vitas MR, Baas AM, Crosier PS, Crosier KE. 2002. *Runx1* is required for zebrafish blood and vessel development and expression of a human RUNX1-CBF2T1 transgene advances a model for studies of leukemogenesis. *Development* 129:2015-30.

Kaplan G, Levy A, Racaniello VR. 1989. Isolation and characterization of HeLa cell lines blocked at different steps in the poliovirus life cycle. *J. Virol.* 63:43-51.

Kerenyi MA, Orkin SH. 2010. Networking erythropoiesis. *J. Exp. Med.* 207: 2537-41.

Kim SI, Bresnick EH. 2007. Transcriptional control of erythropoiesis: emerging mechanisms and principles. *Oncogene* 26:6777-94.

- Krishnan N, Jeong DG, Jung SK, Ryu SE, Xiao A, Allis CD, Kim SJ, Tonks NK. 2009. Dephosphorylation of the C-terminal tyrosyl residue of the DNA damage-related histone H2A.X is mediated by the protein phosphatase eyes absent. *J. Biol. Chem.* 24:16066-70.
- Li X, Oghi KA, Zhang J, Kronen A, Bush KT, Glass CK, Nigam SK, Aggarwal AK, Maas R, Rose DW, Rosenfeld MG. 2003. Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature* 426:247-54.
- Liang Y, Jansen M, Aronow B, Geiger H, Van Zant G. 2007. The quantitative trait gene latexin influences the size of the hematopoietic stem cell population in mice. *Nat. Genet.* 39:178-88.
- Liao W, Ho CY, Yan YL, Postlethwait J, Stainier DY. 2000. Hhex and scl function in parallel to regulate early endothelial and blood differentiation in zebrafish. *Development* 127:4303-13.
- Liao EC, Paw BH, Oates AC, Pratt SJ, Postlethwait JH, Zon LI. 1998. SCL/Tal-1 transcription factor acts downstream of cloche to specify hematopoietic and vascular progenitors in zebrafish. *Genes Dev.* 12:621-26.
- Lieschke GJ, Oates AC, Crowhurst MO, Ward AC, Layton JE. 2001. Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood* 98:3087-96.
- Lieschke GJ, Currie PD. 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* 8:353-67.
- Liu Q, Yu L, Gao J, Fu Q, Zhang J, Zhang P, Chen J, Zhao S. 2001. Cloning, tissue expression pattern and genomic organization of latexin, a human homologue of rat carboxypeptidase A inhibitor. *Mol. Biol. Rep.* 27:241-6.
- Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. 1987. Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development. *Blood* 69:255-63.
- Lozzio CB, Lozzio BB. 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45:321-34.
- Mayani H, Lansdorp PM. 1995. Proliferation of individual hematopoietic progenitors purified from umbilical cord blood. *Exp. Hematol.* 23:1453-62.
- Meijerink J, Mandigers C, van de Locht L, Tönnissen E, Goodsaid F, Raemaekers J. 2001. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *J. Mol. Diag.* 3:55-61.
- Mitsunaga K, Kikuchi J, Wada T, Furukawa Y. 2012. Latexin regulates the abundance of multiple cellular proteins in hematopoietic stem cells. *J. Cell. Physiol.* 227:1138-47
- Molineux G, Foote M, Elliott S. 2009. *Erythropoiesis and Erythropoietins*. Basel, Switzerland: Birkhauser.

- Mueller RL, Huang C, Ho RK. 2010. Spatio-temporal regulation of Wnt and retinoic acid signaling by *tbx16*/*spadetail* during zebrafish mesoderm differentiation. *BMC Genomics* 11:492.
- Nasevicius A, Ekker SC. 2000. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat. Genet.* 26:216–20.
- Nutt SL, Kee BL. 2007. The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity* 26:715–25.
- Nilsson R, Schultz IJ, Pierce EL, Soltis KA, Naranuntarat A, Ward DM, Baughman JM, Paradkar PN, Kingsley PD, Culotta VC, Kaplan J, Palis J, Paw BH, Mootha VK. 2009. Discovery of genes essential for heme biosynthesis through large-scale gene expression analysis. *Cell Metab.* 10:119–30.
- Orkin SH. 2000. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat. Rev. Genet.* 1:57–64.
- Orkin SH, Zon LI. 2008. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132:631-44.
- Paik EJ, Zon LI. 2010. Hematopoietic development in the zebrafish. *Int. J. Dev. Biol.* 54:1127-37.
- Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G. 1999. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126:5073-84.
- Palis J, Yoder MC. 2001. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp. Hematol.* 29:927-36.
- Patterson LJ, Gering M, Patient R. 2005. *Scl* is required for dorsal aorta as well as blood formation in zebrafish embryos. *Blood.* 105:3502-11.
- Patterson LJ, Gering M, Eckfeldt CE, Green AR, Verfaillie CM, Ekker SC, Patient R. 2007. The transcription factors *Scl* and *Lmo2* act together during development of the hemangioblast in zebrafish. *Blood* 109:2389-98.
- Person RE, Li FQ, Duan Z, Benson KF, Wechsler J, Papadaki HA, Eliopoulos G, Kaufman C, Bertolone SJ, Nakamoto B, Papayannopoulou T, Grimes HL, Horwitz M. 2003. Mutations in proto-oncogene *GFI1* cause human neutropenia and target *ELA2*. *Nat. Genet.* 34:308-12.
- Patton EE, Zon LI. 2001. The art and design of genetic screens: zebrafish. *Nat. Rev. Genet.* 2:956-66.
- Postlethwait JH, Yan YL, Gates MA, Horne S, Amores A, Brownlie A, Donovan A, Egan ES, Force A, Gong Z, Goutel C, Fritz A, Kelsh R, Knapik E, Liao E, Paw B, Ransom D, Singer A, Thomson M, Abduljabbar TS, Yelick P, Beier D, Joly JS,

- Larhammar D, Rosa F, Westerfield M, Zon LI, Johnson SL, Talbot WS. 1998. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat. Genet.* 18:345-9.
- Ransom DG, Haffter P, Odenthal J, Brownlie A, Vogelsang E, Kelsh RN, Brand M, van Eeden FJ, Furutani-Seiki M, Granato M, Hammerschmidt M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Kane DA, Mullins MC, Nüsslein-Volhard C. 1996. Characterization of zebrafish mutants with defects in embryonic hematopoiesis. *Development* 123:311–19.
- Randrianarison-Huetz V, Laurent B, Bardet V, Blobé GC, Huetz F, Duménil D. 2010. Gfi-1B controls human erythroid and megakaryocytic differentiation by regulating TGF-beta signaling at the bipotenterythro-megakaryocyticpro- genitor stage. *Blood* 115:2784–95.
- Rayapureddi JP, Kattamuri C, Steinmetz BD, Frankfort BJ, Ostrin EJ, Mardon G, Hegde RS. 2003. Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases. *Nature* 426:295-8.
- Rhodes J, Hagen A, Hsu K, Deng M, Liu TX, Look AT, Kanki JP. 2005. Interplay of pu.1 and gata1 determines myelo-erythroid progenitor cell fate in zebrafish. *Dev. Cell.* 8:97-108.
- Robinson J, Sieff C, Delia D, Edwards PA, Greaves M. 1981. Expression of cell-surface HLA-DR, HLA-ABC and glycophorin during erythroid differentiation. *Nature* 289:68-71.
- Rothenberg EV. 2007. Negotiation of the T lineage fate decision by transcription-factor interplay and microenvironmental signals. *Immunity* 26:690–702.
- Rutherford TR, Clegg JB, Weatherall DJ. 1979. K562 human leukaemic cells synthesize embryonic haemoglobin in response to haemin. *Nature* 280:164-5.
- Saleque S, Cameron S, Orkin SH. 2002. The zinc-finger proto-oncogene Gfi-1b is essential for development of the erythroid and megakaryocytic lineages. *Genes Dev.* 16:301-6.
- Shah DI, Takahashi-Makise N, Cooney JD, Li L, Schultz IJ, Pierce EL, Narla A, Seguin A, Hattangadi SM, Medlock AE, Langer NB, Dailey TA, Hurst SN, Faccenda D, Wiwczar JM, Heggors SK, Vogin G, Chen W, Chen C, Campagna DR, Brugnara C, Zhou Y, Ebert BL, Danial NN, Fleming MD, Ward DM, Campanella M, Dailey HA, Kaplan J, Paw BH. 2012. Mitochondrial Atpif1 Regulates Haem Synthesis In Developing Erythroblasts. *Nature* 491:608-12.
- Schmidt T, Karsunky H, Gau E, Zevnik B, Elsasser HP, Moroy T. 1998. Zinc finger protein GFI-1 has low oncogenic potential but cooperates strongly with pim and myc genes in T-cell lymphomagenesis. *Oncogene* 17: 2661-7.
- Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3:1101-8.

- Schmittgen TD, Zakrajsek BA. 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J. Biochem. Biophys. Met.* 46:69-81.
- Schulte-Merker S, Lee KJ, McMahon AP, Hammerschmidt M. 1997. The zebrafish organizer requires chordino. *Nature* 387:862-3.
- Sieff C, Bicknell D, Caine G, Robinson J, Lam G, Greaves MF. 1982. Changes in cell surface antigen expression during hemopoietic differentiation. *Blood* 60:703-13.
- Söker T, Dalke C, Puk O, Floss T, Becker L, Bolle I, Favor J, Hans W, Hölter SM, Horsch M, Kallnik M, Kling E, Moerth C, Schrewe A, Stigloher C, Topp S, Gailus-Durner V, Naton B, Beckers J, Fuchs H, Ivandic B, Klopstock T, Schulz H, Wolf E, Wurst W, Bally-Cuif L, de Angelis MH, Graw J. 2008. Pleiotropic effects in Eya3 knockout mice. *BMC Dev. Biol.* 8:118.
- Steinberg MH. 1998. Pathophysiology of sickle cell disease. In: Rodgers GP. *Sickle cell disease and thalassaemia*. London: Balliere Tindall.
- Steinberg MH, Rodgers GP. 2001. Pharmacologic modulation of fetal hemoglobin. *Medicine* 80:328-44.
- Stollberg J, Urschitz J, Urban Z, Boyd CD. 2000. A quantitative evaluation of SAGE. *Genome Res.* 10:1241-8.
- Stuart MJ, Nagel RL. 2004. Sickle-cell disease. *Lancet* 364:1343-60.
- Swearingen ML, Sun D, Bourner M, Weinstein EJ. 2003. Detection of differentially expressed HES-6 gene in metastatic colon carcinoma by combination of suppression subtractive hybridization and cDNA library array. *Cancer Lett.* 198:229-39.
- Tatusov RL, Koonin EV, Lipman DJ. 1997. A genomic perspective on protein families. *Science* 278:631-7.
- Telen MJ. 1995. Erythrocyte blood group antigens: not so simple after all. *Blood* 85:299-306.
- Terstappen LW, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR. 1991. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34⁺CD38⁻ progenitor cells. *Blood* 77:1218-27.
- Terstappen LW, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR. 2003. Gene expression analysis of purified hematopoietic stem cells and committed progenitors. *Blood* 102: 94-101.
- Thompson MA, Ransom DG, Pratt SJ, MacLennan H, Kieran MW, Detrich HW 3rd, Vail B, Huber TL, Paw B, Brownlie AJ, Oates AC, Fritz A, Gates MA, Amores A, Bahary N, Talbot WS, Her H, Beier DR, Postlethwait JH, Zon LI. 1998. The cloche and spadetail genes differentially affect hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev. Biol.* 197:248-69.

- Tootle TL, Silver SJ, Davies EL, Newman V, Latek RR, Mills IA, Selengut JD, Parlikar BE, Rebay I. 2003. The transcription factor Eyes absent is a protein tyrosine phosphatase. *Nature* 426:299–302.
- Traver D. 2004. Cellular dissection of zebrafish hematopoiesis. *Methods Cell Biol.* 76:127-49.
- Udvardia AJ, Linney E. 2003. Windows into development: historic, current, and future perspectives on transgenic zebrafish. *Dev Biol.* 256:1-17.
- Uratani Y, Takiguchi-Hayashi K, Miyasaka N, Sato M, Jin M, Arimatsu Y. 2000. Latexin, a carboxypeptidase A inhibitor, is expressed in rat peritoneal mast cells and is associated with granular structures distinct from secretory granules and lysosomes. *Biochem. J.* 346:817-26.
- van der Meer LT, Jansen JH, van der Reijden BA. 2010. Gfi1 and Gfi1b: key regulators of hematopoiesis. *Leukemia* 24:1834-43.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3:1-11.
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science* 270:484-7.
- Wang D, Jao LE, Zheng N, Dolan K, Ivey J, Zonies S, Wu X, Wu K, Yang H, Meng Q, Zhu Z, Zhang B, Lin S, Burgess SM. 2007. Efficient genome-wide mutagenesis of zebrafish genes by retroviral insertions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:12428-33.
- Ward AC, Lieschke G. 2002. The zebrafish as a model system for human diseases. *Front. Biosci.* 7:827–33.
- Wingert RA, Zon LI. 2003. Genetic dissection of hematopoiesis using the zebrafish. In: Godin I. *Hematopoietic Stem Cells*. Georgetown, TX: Landes Biosci.
- Weatherall DJ, Clegg JB. 2001. *The thalassemia syndrome*. Oxford: John Wiley & Sons.
- Weatherall DJ. 1977. The molecular basis for abnormal gene action: recent lessons from the thalassaemia model. *Clin. Sci. Mol. Med.* 52:223-7.
- Weatherall DJ, Clegg JB. 1979. Recent developments in the molecular genetics of human hemoglobin. *Cell* 16:467-79.
- Weinstein BM, Schier AF, Abdelilah S, Malicki J, Solnica-Krezel L, Stemple DL, Stainier DY, Zwartkuis F, Driever W, Fishman MC. 1996. Hematopoietic mutations in the zebrafish. *Development* 123:303-9.
- Westerfield M. 1995. *The zebrafish book*. Eugene, OR: University of Oregon Press.

Wienholds E, Schulte-Merker S, Walderich B, Plasterk RH. 2002. Target-selected inactivation of the zebrafish rag1 gene. *Science* 297:99-102.

Wood, W. G., and Robinson, J. S., *Br. J. Haemat.*, 33, 145 (abstract) (1976).

Woods IG, Wilson C, Friedlander B, Chang P, Reyes DK, Nix R, Kelly PD, Chu F, Postlethwait JH, Talbot WS. 2005. The zebrafish gene map defines ancestral vertebrate chromosomes. *Genome Res.* 15:1307-14.

Yuan J, Angelucci E, Lucarelli G, Aljurf M, Snyder LM, Kiefer CR, Ma L, Schrier SL. 1993. Accelerated programmed cell death (apoptosis) in erythroid precursors of patients with severe beta-thalassemia (Cooley's anemia). *Blood* 82:374-7.

Zago MA, Falcão RA, Pasquini R. 2001. *Hematologia: fundamentos e práticas*. São Paulo: Atheneu.

Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M. 1998. Human bone marrow CD34-cells engraft *in vivo* and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD341 cells. *Exp. Hematol.* 26:353-60.

Zon LI. 1995. Developmental biology of hematopoiesis. *Blood* 86:2876-91.

9-) ANEXO



CEP, 23/09/08.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 715/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0574.0.146.000-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ANÁLISE FUNCIONAL DOS GENES EYA3, HES6 E LXN DURANTE A DIFERENCIAÇÃO ERITRÓIDE E EM PACIENTES BETA TALASSÊMICOS E PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Diana Santos Branco

INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/09/2008

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 23/09/09 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Análise funcional dos genes *eya3*, *hes6* e *lxn*, durante a diferenciação eritróide e em pacientes com anemia falciforme e b-talassemia

III - SUMÁRIO

O estudo fará um recrutamento de voluntários dentro do Hemocentro/UNICAMP de pacientes com persistência de hemoglobina fetal de ambos os sexos, de idade entre 18 e 50 anos. Após a seleção dos voluntários, será feita avaliação clínica e coletado 2 frascos (4 colheres de sopa) de sangue que será submetido a várias análises genéticas para análise do padrão dos genes envolvidos nas doenças de b-talassemia e anemia falciforme.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O estudo pretende oferecer maior conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos nas doenças hematológicas, bem como o entendimento do perfil de expressão durante a diferenciação eritróide, que tem sido muito investigada. O Termo de Consentimento Livre Esclarecido está adequado. Será solicitado financiamento da FAPESP, e a pesquisa não expõe os sujeitos a riscos.

Recomendamos que a Folha de Rosto/CONEP seja assinada pelo responsável da instituição onde os voluntários serão recrutados, nesse caso o Hemocentro/UNICAMP e não pela pesquisadora responsável.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem



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

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

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

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

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

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

VII - DATA DA REUNIÃO

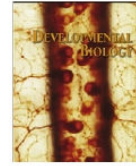
Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de setembro de 2008.


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



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Developmental Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/developmentalbiology

Teleost growth factor independence (*gfi*) genes differentially regulate successive waves of hematopoiesis

Jeffrey D. Cooney^{a,1,2}, Gordon J. Hildick-Smith^{a,1,2}, Ebrahim Shafizadeh^{a,1,2}, Paul F. McBride^{a,2}, Kelli J. Carroll^b, Heidi Anderson^{a,2}, George C. Shaw^{a,2}, Owen J. Tamplin^{c,d}, Diana S. Branco^{a,2}, Arthur J. Dalton^a, Dhvanit I. Shah^a, Clara Wong^e, Patrick G. Gallagher^e, Leonard I. Zon^{c,d}, Trista E. North^b, Barry H. Paw^{a,d,*}

^a Department of Medicine, Division of Hematology, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA

^b Department of Pathology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA

^c Howard Hughes Medical Institute and Stem Cell Program, Boston Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA

^d Department of Medicine, Division of Hematology-Oncology, Boston Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA

^e Department of Pediatrics, Division of Neonatal Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut 06520, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 May 2012

Received in revised form

8 August 2012

Accepted 22 August 2012

Keywords:

Primitive and definitive hematopoiesis

Differentiation

Lineage commitment

ABSTRACT

Growth Factor Independence (*Gfi*) transcription factors play essential roles in hematopoiesis, differentially activating and repressing transcriptional programs required for hematopoietic stem/progenitor cell (HSPC) development and lineage specification. In mammals, *Gfi1a* regulates hematopoietic stem cells (HSC), myeloid and lymphoid populations, while its paralog, *Gfi1b*, regulates HSC, megakaryocyte and erythroid development. In zebrafish, *gfi1aa* is essential for primitive hematopoiesis; however, little is known about the role of *gfi1aa* in definitive hematopoiesis or about additional *gfi* factors in zebrafish. Here, we report the isolation and characterization of an additional hematopoietic *gfi* factor, *gfi1b*. We show that *gfi1aa* and *gfi1b* are expressed in the primitive and definitive sites of hematopoiesis in zebrafish. Our functional analyses demonstrate that *gfi1aa* and *gfi1b* have distinct roles in regulating primitive and definitive hematopoietic progenitors, respectively. Loss of *gfi1aa* silences markers of early primitive progenitors, *scl* and *gata1*. Conversely, loss of *gfi1b* silences *runx-1*, *c-myb*, *ikaros* and *cd41*, indicating that *gfi1b* is required for definitive hematopoiesis. We determine the epistatic relationships between the *gfi* factors and key hematopoietic transcription factors, demonstrating that *gfi1aa* and *gfi1b* join *lmo2*, *scl*, *runx-1* and *c-myb* as critical regulators of teleost HSPC. Our studies establish a comparative paradigm for the regulation of hematopoietic lineages by *gfi* transcription factors.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Growth factor independence-1a (*Gfi1a*) is a proto-oncogene that was identified as a gene up-regulated by retroviral insertion of a Moloney murine leukemia virus in an interleukin 2 (IL-2) dependent T-cell lymphoma line (Gilks et al., 1993). A closely related gene, Growth factor independence-1b (*Gfi1b*) was subsequently cloned based on high nucleotide homology to *Gfi1a* (Grimes et al., 1996). Both *Gfi* genes are members of the highly conserved Snail superfamily of zinc-finger transcription factors that bind to consensus DNA sequences

and act as transcriptional repressors by recruiting histone-modifying enzymes at target promoters. The *Gfi1a* and *Gfi1b* proteins share a highly homologous N-terminal 20 amino-acid SNAG (for Snail/*Gfi1*) domain, and a C-terminal domain that consists of six C₂H₂ type zinc fingers (van der Meer et al., 2010). The SNAG domain is critical to the function of *Gfi1a* as a position- and orientation-independent transcriptional repressor (Grimes et al., 1996).

In mammals, *Gfi1a* and *Gfi1b* function as hematopoietic transcription factors with distinct and overlapping roles as regulators of HSC and subsequent lineage commitment and differentiation (van der Meer et al., 2010). Both *Gfi1a* and *Gfi1b* are expressed in mouse HSC, where they are responsible for repressing HSC proliferation, maintaining stem cell quiescence and self-renewal capacity (Hock et al., 2004; Khandanpour et al., 2010). Interestingly, either *Gfi1a* or *Gfi1b* is dispensable for maintenance of mouse embryonic HSC, while loss of both *Gfi* genes in mouse is incompatible with HSC maintenance (Khandanpour et al., 2010).

Although *Gfi1a* and *Gfi1b* have overlapping roles in HSC, in downstream lineages, *Gfi1a* and *Gfi1b* have discrete roles as the respective regulators of myeloid and lymphoid lineages and erythroid

* Corresponding author at: Department of Medicine, Division of Hematology, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA. Fax: +1 617 355 9064.

E-mail address: bpaw@rics.bwh.harvard.edu (B.H. Paw).

¹ J.D.C., G.J.H.-S. and E.S. contributed equally to this study.

² University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA (J.D.C.); Haemonetics Corporation, Braintree, MA, USA (E.S.); University of Buffalo School of Medicine, Buffalo, NY, USA (P.F.M.); University of Helsinki, Helsinki, Finland (H.A.); University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA (G.C.S.); Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil (D.S.B.).

and megakaryocyte lineages, respectively (van der Meer et al., 2010). Loss of *Gfi1a* in mouse results in neutropenia, a block in myeloid differentiation and impaired T-cell development (Schmidt et al., 1998; Karsunky et al., 2002). Additionally, human patients with dominant-negative mutations in *GF1A* suffer from severe congenital neutropenia (Person et al., 2003), underscoring a conserved function of the mammalian *Gfi* genes. In addition to expression in hematopoietic tissues, *Gfi1a* is also expressed in the mouse lung and in precursor cells of the central and peripheral nervous systems including the sensory epithelia of the developing inner ear, where it is required for inner ear hair cell differentiation (Wallis et al., 2003).

In contrast to *Gfi1a*, loss of *Gfi1b* has no effect on myelopoiesis (Saleque et al., 2002). Rather, loss of *Gfi1b* specifically impairs erythrocyte and megakaryocyte development (Saleque et al., 2002). *Gfi1b* deficient mice have a block in megakaryocyte maturation and die *in utero* during the transition from primitive to definitive erythropoiesis, suggesting that *Gfi1b* plays a critical role in facilitating the differentiation of bi-potential erythroid/megakaryocytic progenitors (Saleque et al., 2002). Due to the embryonic lethal phenotype of *Gfi1b*-knockout mice, investigators have turned to *in vitro* models to better characterize the role of *Gfi1b* in hematopoiesis. For example, recent studies in human HEK293 and K562 cells have demonstrated that *Gfi1b* repression of *transforming growth factor- β receptor III* is required for proper differentiation and expansion of erythroid progenitors (Randrianarison-Huetz et al., 2010), offering one mechanism by which *Gfi1b* regulates erythropoiesis.

To further characterize the function of the *Gfi* family genes *in vivo*, we utilized the genetics of *Danio rerio*. Notably, zebrafish reproduce oviparously and embryos can survive without blood cells for up to 10 days due to passive diffusion of oxygen from the water (Pelster and Burggren, 1996). These attributes make the zebrafish model particularly amenable to decipher the function of the *Gfi* transcription factors in hematopoiesis.

Zebrafish have three *gfi* family genes: *gfi1ab* (Dufourcq et al., 2004), *gfi1aa* (Wei et al., 2008) and *gfi1b*. Cloning and gene expression pattern studies in zebrafish have shown a non-hematopoietic role for *gfi1ab*, which is expressed in the ganglion cells of the neural retina and the hair cells of the inner ear (Dufourcq et al., 2004). We used the highly conserved zinc finger region of *gfi1ab* as a probe to screen a cDNA library of zebrafish HSC to identify two additional members of the zebrafish *gfi* family, *gfi1aa* and *gfi1b*. The cloning and functional analysis of *gfi1aa* has recently been described (Wei et al., 2008), advancing the understanding of its role as a regulator of primitive hematopoiesis (Wei et al., 2008). However, little is known about the role of *gfi1aa* in definitive hematopoiesis or about the role of *gfi1b* in blood development. Here, we used *in vivo* loss-of-function studies to analyze the roles of these two hematopoietic *gfi* factors in zebrafish HSPC biology. Our findings reveal that *gfi1aa* is a critical regulator of primitive hematopoietic progenitor populations, while *gfi1b* regulates definitive HSC. We further place these two *gfi* factors in a hierarchical, epistatic relationship relative to other transcription factor regulators of primitive and definitive hematopoiesis, thereby demonstrating that *gfi1aa* and *gfi1b* act in parallel with either primitive or definitive regulators of HSPC.

Materials and methods

Nomenclature

This work references orthologous *Gfi*-family genes using a newly standardized convention recommended by Zebrafish Information Network (ZFIN) and the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). The former names of the genes referenced in this work are included here in parentheses for reference: Hs

GF1A (*GF1*), Mm *Gfi1a* (*Gfi1*), Dr *gfi1ab* (*gfi1*), and Dr *gfi1aa* (*gfi1.1*).

Zebrafish maintenance and studies

Wild-type (AB⁺, Tü) and transgenic zebrafish (*Danio rerio*) were maintained, bred and staged according to standard methods (Amigo et al., 2009). *cloche* (*clo*^{m39}) (Stainier et al., 1995), *scf* (*scf/tal1*^{t21384}) (Bussmann et al., 2007), *vlad tepes* (*vlt*^{m651}) (Lyons et al., 2002), *frascati* (*frs*^{tq223}) (Shaw et al., 2006) and *runx-1* (*runx-1*^{w84x}) (Sood et al., 2010) mutant lines have been described previously. The following transgenic zebrafish lines were used in this study: *Tg(gata1:eGFP)* (Long et al., 1997), *Tg(pu.1:eGFP)* (Hsu et al., 2004), *Tg(globin-LCR:eGFP)* (Ganis et al., 2012), and *Tg(cd41:eGFP)* (Lin et al., 2005). All zebrafish experiments were conducted with the guidance and approval of the Institutional Animal Care and Use Committee at Boston Children's Hospital.

Isolation and sequence analysis of zebrafish hematopoietic *gfi* genes

Embryonic and adult blood, and kidney marrow cells were collected from *Tg(cd41:GFP)* transgenic fish and subjected to fluorescence-activated cell sorting (FACS) using a Becton Dickinson FACS Vantage SE machine. After two rounds of sorting, cells expressing GFP^{lo} and GFP^{hi} were collected to generate a cDNA library in TriplEx2 (Clontech).

The cloning of the zebrafish *gfi1ab* has been described (Dufourcq et al., 2004). Using the published sequence, primers flanking zinc fingers 1–6 were designed to amplify a DNA fragment of zebrafish *gfi1ab*. The primer sequences are in Table S1. This fragment was used as a probe to screen ~10⁶ plaque forming units of our cDNA library under a low stringency hybridization wash (2 × SSC, 0.1% SDS, at 42 °C). From this screen, we recovered three distinct *gfi* related family members. One was “*gfi1ab*”, including additional 5' and 3' un-translated region, was identical to a previously published “*gfi1*” clone (Dufourcq et al., 2004). The second clone was identified as “*gfi1aa*”, the putative zebrafish ortholog of *Gfi1a* and previously referred to as “*gfi1.1*” (Wei et al., 2008). The third clone was referred to as “*gfi1b*”, according to Zebrafish Information Network nomenclature standards <http://zfin.org/zf_info/nomen.html>. The *gfi1b* cDNA sequence has been deposited in GenBank under accession code: HQ599192. *gfi1aa* and *gfi1b* were subcloned in the vector pCS2+.

Sequence analysis and bioinformatics

DNA and protein sequence analysis was performed using Lasergene software (DNASTAR, Madison, WI) and the protein prediction and analysis tools at the ExPASy home page <<http://au.expasy.org/>>. Genomic DNA sequences data were produced by the Zebrafish Sequencing Group at the Sanger Institute and can be obtained from <http://www.ensembl.org/Danio_rerio/>.

Whole mount RNA *in situ* hybridization, hemoglobin and cartilage staining

Digoxigenin-labeled antisense RNA probes were generated according to the manufacturer's protocol using subcloned *gfi1aa* and *gfi1b* (Roche). Whole mount *in situ* hybridization (WISH) was performed as previously described (Amigo et al., 2009). Embryos were stained for hemoglobinized cells with *o*-dianisidine (Sigma) as previously described (Amigo et al., 2009). Embryo cartilage was stained with Alcian Blue as described previously (Amigo et al., 2009). For histological sectioning, embryos were processed by WISH and embedded in JB4 plastic resin (Polysciences Inc.);

8–10- μ m sections were mounted onto glass slides and photographed as previously described (Burns et al., 2005).

Morpholino injection

Custom antisense morpholino oligomers (MO) (Gene Tools) were designed against *gf1aa* and *gf1b*. Two different MO targeting distinct sequences (translational methionine initiator, ATG MO, and splice site blocking, splice MO) were used to knockdown each respective gene. Both *gf1aa* MOs have been used previously (Wei et al., 2008). A standard MO was used as a control. MO sequences can be found in Supplementary Table S1. Approximately 10–20 ng of *gf1aa*, *gf1b* or standard control MO was injected into 1–2 cell-stage embryos.

RNA isolation, cDNA synthesis, and quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR)

Pools of 30 embryos were collected at 96 hpf; RNA was isolated using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) and the First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) was used to generate cDNA as

described previously (Nilsson et al., 2009). Real-time qRT-PCR was performed on an iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). TaqMan Gene Expression Assays for *gf1aa*, *gf1b*, *itga2b* and *prtfdc1* were obtained from Applied Biosystems. Analysis was performed by the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method as described previously (Schmittgen and Livak, 2008; Nilsson et al., 2009).

Fluorescence-activated cell sorting of transgenic embryos

Pools of 20–100 embryos were collected from MO-injected and control clutches. Disaggregated cells were sequentially passed through 70 and 40 μ m cell strainers, washed in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Sigma), and pelleted by low speed centrifugation. The cells were re-suspended in HBSS. Cells were sorted in a BD Biosciences FACS Vantage SE machine.

DNA isolation and allele-specific oligonucleotide hybridization (ASO)

DNA was isolated from paraformaldehyde-fixed embryos as described previously (Meeker et al., 2007). Primer sequences used to amplify a fragment of *runx-1* DNA are in Table S1. For the ASO

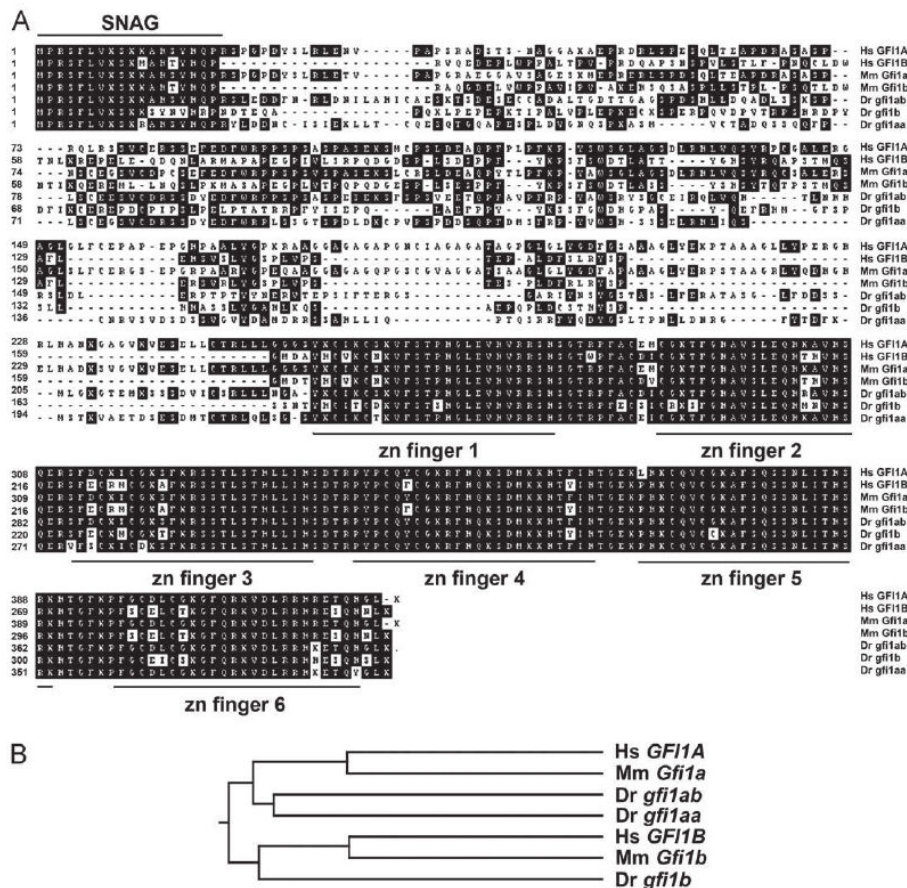


Fig. 1. Evolutionary conservation between members of zebrafish and mammalian growth factor independence family of zinc finger transcription factors. (A) Deduced amino acid alignment of zebrafish (Dr), human (Hs) and mouse (Mm) growth factor independence transcription factors. The conserved SNAG domain and zinc finger motifs are marked. Zinc finger domains are underlined and numbered. Conserved amino acid residues are highlighted in black. (B) The phylogenetic relationship of homologous zebrafish, mouse, and human Gfi factors was constructed based on the J. Hein method. The MegAlign application in DNASTAR software was used for multiple alignment and construction of the phylogenetic dendrogram. Zebrafish *gf1ab* (NP_958495.1) and *gf1aa* (NP_001018612.1) cluster most closely with human *GF1A* (NP_005254.2) and mouse *Gfi1a* (NP_034408.1), while zebrafish *gf1b* (HQ599192) clusters most closely with human *GF1B* (NP_004179.3) and mouse *Gfi1b* (NP_032140.1). The corresponding GenBank accession numbers are given in parenthesis.

Please cite this article as: Cooney, J.D., et al., Teleost growth factor independence (*gfi*) genes differentially regulate successive waves of hematopoiesis. *Dev. Biol.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.08.015>

assay, approximately 10 ng of PCR products was dotted on a Hybond nylon membrane (Amersham) as described previously (Paw et al., 1990). ASO probe sequences for mutant and wild type *runx-1* alleles are in Table S1. The ASO probes were 5'-kinased with [γ - 32 P]ATP (6000 Ci/mmol, Amersham). Membranes were washed with tetramethylammonium chloride solution (Sigma) as described previously (Farr et al., 1988) and subjected to autoradiography.

Imaging and analysis

Stained embryos were photographed using a Leica MXFLIII microscope and a DC500 digital camera (8 bit). Transgenic embryos were photographed on a Nikon TE-200 microscope equipped with a 10 \times objective (numerical aperture, 1.4). Fluorescent images were acquired with an Orca IIER charge-coupled-device camera (Hamamatsu). The electronic shutters were controlled with Metamorph software (Universal Imaging Corporation of Molecular Devices).

Statistical analysis

Data are displayed as relative mean \pm standard error of the mean (SEM) with the number of experiments indicated. Pairwise comparisons were performed by the Student *t* test. Significance was set at $p < 0.05$.

Results

Isolation and cloning of zebrafish *gfi* genes

We performed a screen of a zebrafish cDNA library constructed from cd41 GFP^{lo} expressing cells using a PCR amplified DNA fragment corresponding to the zinc finger domain of zebrafish *gfi1ab* as a probe (Dufourcq et al., 2004). cd41 GFP^{lo} cells have been functionally characterized as zebrafish HSC (Ma et al., 2011). We isolated nine full-length clones under a low-stringency hybridization wash. DNA sequencing analyses revealed that these clones encode polypeptides with high homology to mouse and human oncoprotein Gfi family members. Three clones encode full-length polypeptides containing a conserved 20 amino acid SNAG transcriptional repressor domain and six C₂H₂ zinc finger domains. One of the recovered clones was a full-length clone of the published zebrafish *gfi1ab*, including additional 5' and 3' un-translated region sequences to the published results (Dufourcq et al., 2004). The second gene was a full-length clone of the previously published zebrafish *gfi1aa* (Wei et al., 2008). Based on peptide homology and gene expression pattern, we termed the third gene *gfi1b*.

The genomic organization and exon–intron boundaries of zebrafish *gfi1aa* and *gfi1b* were assembled from available genomic DNA sequences using Genotrace and Spidey applications. The results revealed that both zebrafish genes consist of six coding exons and five introns with a genomic organization similar to the human *GFI1A* and *GFI1B* (data not shown). The first exon encodes

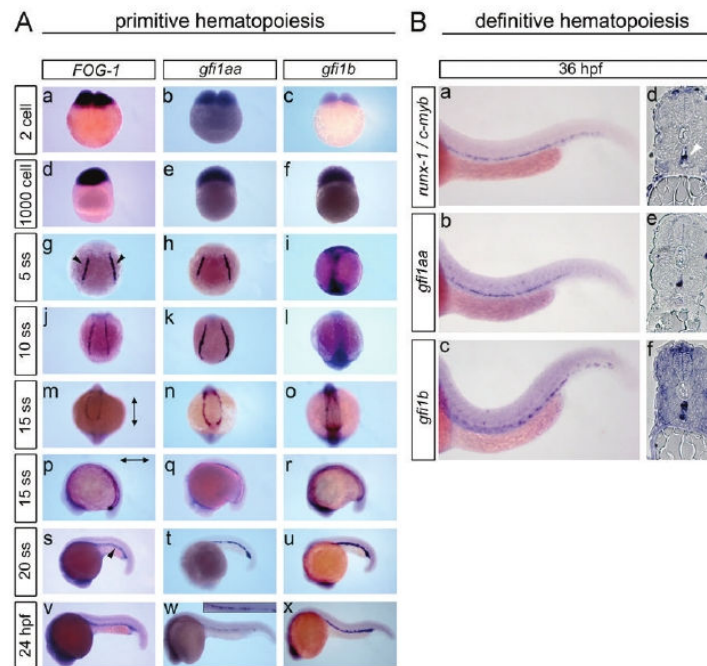


Fig. 2. *gfi1aa* and *gfi1b* expression pattern during primitive and definitive hematopoiesis. The expression pattern of *gfi1aa* and *gfi1b* was detected by WISH of developing zebrafish embryos. (A) For the primitive wave of hematopoiesis, *FOG-1* was included as a reference control. Dark-blue staining indicates pre-zygotic maternal expression of *gfi1aa* and *gfi1b* transcripts, along with *FOG-1*, at the 2-cell and 1000-cell stages (a–f). At the 5 and 10 ss, zygotic *gfi1aa* and *FOG-1* expression is localized to the LPM (black arrowheads) (g–h, j–k), while *gfi1b* is expressed in the ectoderm (i, l). As the LPM converges to the ICM at the 15 ss, *gfi1aa* and *FOG-1* expression remains localized to the LPM (j–k, m, n), while *gfi1b* transitions from ectoderm to LPM expression (l, o). (The vertical arrow indicates the anterior–posterior axis and the horizontal arrow indicates the rostral–caudal axis.) *gfi1aa* and *gfi1b* are strongly expressed in the ICM at the 20 ss along with *FOG-1* (s–u). At 24 hpf, *gfi1b* and *FOG-1* remain strongly expressed in the ICM, while expression of *gfi1aa* shows a relative decrease in ICM expression (v–x, insert). (B) AGM expression of *gfi1aa* and *gfi1b* during definitive hematopoiesis was analyzed by whole-mount and sectioned *in situ* using *runx-1* and *c-myb* as reference controls (a–f). The white arrowhead indicates AGM expression of *runx-1* and *c-myb* in the ventral wall of the dorsal aorta (d).

Please cite this article as: Cooney, J.D., et al., Teleost growth factor independence (*gfi*) genes differentially regulate successive waves of hematopoiesis. *Dev. Biol.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.08.015>

the first 106 amino acids including the SNAG domain, which is conserved between human, mouse and zebrafish *Gfi* genes (Fig. 1A). The homologous C-terminal zinc fingers are coded by the 3' end of exon 3 and continue to the exon 6. Our *in silico* data was verified by PCR amplification of zebrafish genomic DNA using intron-specific primers flanking the exon/intron boundaries (data not shown).

Phylogenetic analysis revealed that zebrafish *gfi1ab* and *gfi1aa* cluster most closely with mammalian *Gfi1a* factors (Fig. 1B), suggesting that the functions of mammalian *Gfi1a* were split between the zebrafish *gfi1ab* and *gfi1aa* genes in a gene duplication event during teleost evolution (Postlethwait et al., 2000; Woods et al., 2000). Likewise, our phylogenetic analysis revealed that *gfi1b* clusters most closely with mammalian *Gfi1b* factors (Fig. 1B). Since *gfi1ab* lacks expression in hematopoietic tissues (Dufourcq et al., 2004), we chose to focus our functional analyses on *gfi1aa* and *gfi1b*.

Zebrafish *gfi1aa* and *gfi1b* are expressed in primitive and definitive hematopoietic tissues

In zebrafish, hematopoietic progenitors are first observed in the lateral plate mesoderm (LPM), which subsequently gives rise to the intermediate cell mass (ICM), the functional equivalent of the yolk sac blood islands in mammals (Davidson and Zon, 2004). To compare the embryonic expression of *gfi1aa* and *gfi1b*, we performed WISH of wild-type zebrafish embryos at different developmental stages. Similar to the expression of *Friend of GATA1* (*FOG-1*), another hematopoietic transcription factor (Amigo et al.,

2009), *gfi1aa* and *gfi1b* are expressed as maternal transcripts at the 2-cell stage (Fig. 2A, a–c). The maternal expression pattern persists through the sphere stage, where *gfi1aa* and *gfi1b* are expressed along with *FOG-1* mRNA (Fig. 2A, d–f). At the 5 and 10 somite stages (ss) *gfi1aa* and *FOG-1* zygotic expression is localized to the LPM, suggesting a role for *gfi1aa* in the earliest stages of hematopoiesis (Fig. 2A, g–h, j–k). In contrast, *gfi1b* is abundantly expressed in the ectoderm (Fig. 2A, i, l), analogous to *gata2* expression early in development (Thompson et al., 1998). As the LPM converges to the ICM at the 15 ss, *gfi1b* expression transitions from the ectoderm to the ICM (Fig. 2A, o, r). Expression of *FOG-1* and *gfi1aa* persists in the LPM at the 15 ss (Fig. 2A, m–n, p–q). By the 20 ss *gfi1aa* and *gfi1b* expression is localized to the ICM along with *FOG-1* (Fig. 2A, s–u), after which point *gfi1aa* expression decreases at 24 h post fertilization (hpf) (Fig. 2A, w). In contrast, *gfi1b* and *FOG-1* are robustly expressed in the ICM at 24 hpf (Fig. 2A, v, x). In zebrafish, definitive hematopoiesis occurs in the ventral wall of dorsal aorta, which is analogous to the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region in mammals (Davidson and Zon, 2004). Definitive HSC expressing *runx-1* and *c-myb* can be detected at 36 hpf in the AGM (Davidson and Zon, 2004). Whole-mount and section analyses indicated that both *gfi1aa* and *gfi1b* are expressed in the AGM along with *runx-1* and *c-myb* at 36 hpf (Fig. 2B, a–f).

Zebrafish *gfi1aa* is required for primitive hematopoiesis

To evaluate the roles of *gfi1aa* and *gfi1b* in hematopoiesis, we designed two different MO to knockdown each *gfi* gene. The MO

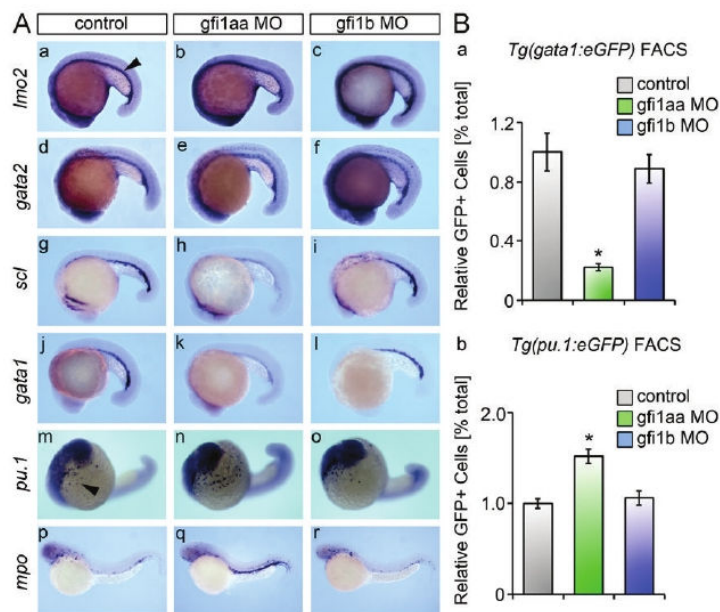


Fig. 3. *gfi1aa* regulates the primitive wave of zebrafish hematopoiesis. (A) *gfi* morphants and matching controls were subjected to WISH and analyzed for ICM expression (arrowhead) of primitive hematopoietic markers at the 20 ss. (a–f) ICM expression of the early hematopoietic markers, *lmo2* and *gata2*, is preserved in *gfi* morphants and controls. (g–l) *gfi1aa* morphants show a reduction in ICM expression of *scl* and *gata1*, markers of primitive hematopoietic progenitors as compared to controls. Loss of *gfi1b* does not affect *scl* or *gata1* expression in primitive hematopoiesis (c, f, i, l). (m–o) Loss of *gfi1aa* shows an expansion in the population of *pu.1* myeloid progenitors, while no change is observed in *gfi1b* morphants. (p–r) The *mpo* myeloid population is expanded in *gfi1aa* morphants. (B) Transgenic reporter fish for primitive wave hematopoietic progenitors were subjected to FACS analysis after morpholino-mediated knockdown. (a) FACS of *Tg(gata1:eGFP)* embryos at the 20 ss reveals a significant decrease in the population of erythroid progenitors in *gfi1aa* morphants relative to controls. Erythroid progenitors are unaffected in *gfi1b* morphants (mean \pm SE, *t* test, **p* < 0.05, *n* = 3). (b) FACS of *Tg(pu.1:eGFP)* embryos at the 20 ss reveals a significant increase in the population of myeloid progenitors in *gfi1aa* morphants relative to controls. Myeloid progenitors are unaffected in *gfi1b* morphants (mean \pm SE, *t* test, **p* < 0.05, *n* = 5).

Please cite this article as: Cooney, J.D., et al., Teleost growth factor independence (*gfi*) genes differentially regulate successive waves of hematopoiesis. *Dev. Biol.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.08.015>

target either: (1) the 5'UTR and putative ATG methionine initiator site of their respective *gfi* transcript (translation-blocker), or (2) intron/exon splice junction sequences unique to each *gfi* gene (splice-blocker). Injection of both the translation-blocker and splice-blocker MO resulted in identical, distinct phenotypes for each *gfi* gene. To verify the specificity of each ATG MO, we performed an *in vitro* translation in the absence or presence of increasing concentrations of matched and mismatched MO to evaluate the inhibition of protein synthesis. As shown in Supplementary Fig. 1A, an increasing concentration of *gfi1aa* ATG MO specifically inhibits the *in vitro* translation of *gfi1aa*, whereas it has no effect on the translation of *gfi1b* mRNA. Similarly, the *gfi1b* ATG MO has no effect on the translation of *gfi1aa* mRNA, but effectively inhibits translation of its cognate *gfi1b* mRNA. qRT-PCR analysis of embryos injected with the ATG MO showed no significant change in the level of *gfi* transcripts, indicating a lack auto- or cross-regulatory feedback mechanisms (Supplementary Fig. 1B). To verify the efficacy of each splice-blocker MO, qRT-PCR analysis showed that each *gfi* MO efficiently and selectively targets its respective pre-mRNA (Supplementary Fig. 1C). As with the ATG MO, qRT-PCR showed no auto- or cross-regulatory feedback with the splice-blocker MO (Supplementary Fig. 1C).

Embryos injected with either *gfi1aa* or *gfi1b* MO (hereafter referred to as "morphants") show normal expression of hematopoietic progenitors, as evident by *lmo2* and *gata2* expression at the 20 ss (Fig. 3A, a–f). However, consistent with prior analyses (Wei et al., 2008), *gfi1aa* morphants show a reduction in *scl* and *gata1* expression, the respective markers of primitive hematopoietic progenitors (Fig. 3A h, k). These results are consistent with observations that loss of either *scl* or *gata1* does not impact the initial specification of hematopoietic progenitors, but does impair subsequent differentiation (Dooley et al., 2005; Amigo et al., 2011). In contrast to *gfi1aa* morphants, *gfi1b* morphants show no change in either *scl* or *gata1* expression, indicating that *gfi1b* is not essential for the initial commitment or differentiation of primitive hematopoietic progenitors (Fig. 3A, i, l). To validate and quantify our *gata1* results, we knocked down *gfi1aa* and *gfi1b* in the *Tg(gata1:eGFP)* reporter line and subjected the morphants to FACS analysis at the 20 ss. We found a significant decrease in the population of *gata1*⁺ cells in *gfi1aa* morphants (Fig. 3B, a). Consistent with our WISH results, no change in the population of *gata1*⁺ cells was observed after knockdown of *gfi1b* (Fig. 3B, a).

Primitive hematopoiesis generates *gata-1* regulated erythroid progenitors and *pu.1* regulated myeloid progenitors (Lieschke et al., 2002). The cross antagonism of *gata1* and *pu.1* in primitive hematopoiesis is well-characterized (Rhodes et al., 2005). Since our analysis of *gfi1aa* morphants showed a significant reduction in the pool of primitive *gata1*⁺ erythroid progenitors, we sought to determine whether the population of *pu.1* progenitors was affected. Consistent with the antagonistic relationship between *gata1* and *pu.1*, WISH showed an increase in the expression of *pu.1* expressing cells in *gfi1aa* morphants, while *gfi1b* morphants showed no change in *pu.1* expression (Fig. 3A, m–o). Also consistent with the increase in *pu.1*⁺ cells, the *mpo*⁺ myeloid population downstream of *pu.1* is expanded in *gfi1aa* morphants at 48 hpf (Fig. 3A, p–r). To rigorously quantify the change in the population of primitive myeloid progenitors, we performed FACS in the *Tg(pu.1:eGFP)* line (Hsu et al., 2004). FACS analysis of *gfi1aa* morphants at the 20 ss revealed a significant increase in the population of *pu.1*⁺ myeloid cells (Fig. 3B, b). The increase in *pu.1*⁺ cell number is consistent with previous observations showing that overexpression of *gfi1aa* expands the pool of erythroid progenitors at the expense of myeloid progenitors (Wei et al., 2008). In contrast to the knockdown of *gfi1aa*, the knockdown of *gfi1b* had no effect on the population of *pu.1*⁺ myeloid progenitors (Fig. 3B, b), thereby reinforcing our

conclusion that *gfi1b* has no functional role in primitive hematopoiesis.

gfi1aa and *gfi1b* have distinct roles in erythropoiesis

To further evaluate the roles of *gfi1aa* and *gfi1b* in erythropoiesis, we stained *gfi* morphants with *o*-dianisidine and assessed their degree of hemoglobinization. At 48 hpf, *gfi1aa* morphants have reduced hemoglobinization relative to control embryos (Fig. 4A, a–b). In contrast, *gfi1b* morphants showed normal levels of hemoglobinization (Fig. 4A, c). At 72 hpf, both *gfi1aa* and *gfi1b* morphants show a partial reduction in hemoglobinized erythrocytes (Fig. 4A, d–f). This incomplete reduction motivated us to

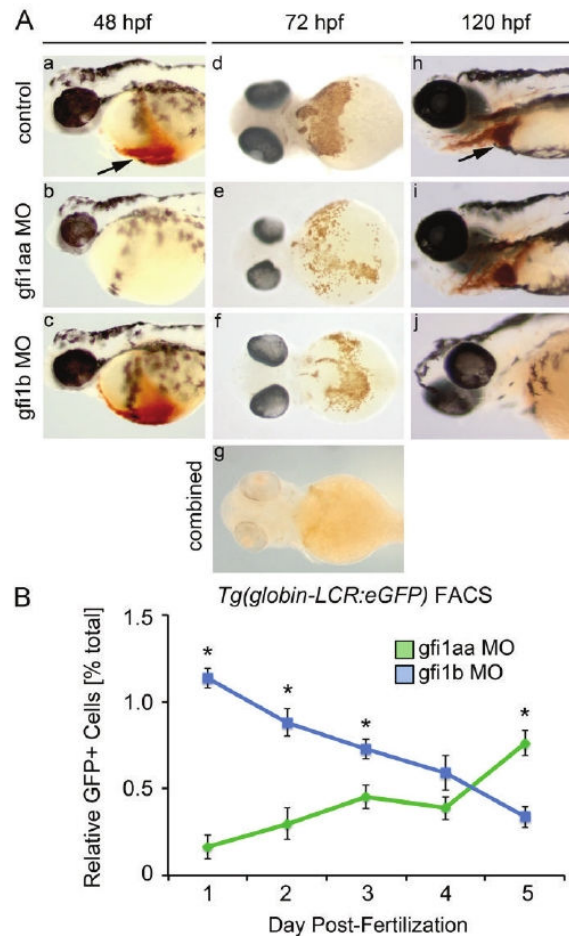


Fig. 4. *gfi1aa* and *gfi1b* have distinct roles at different stages in erythropoiesis. (A) Morphant and control embryos were stained with *o*-dianisidine to detect hemoglobinized cells. At 48 hpf, knockdown of *gfi1aa* results in severe anemia, as indicated by the absence of hemoglobinized cells in the cardiac region (arrow) (a–b). Knockdown of *gfi1b* does not impact hemoglobinization at this stage (c). At 72 hpf, knockdown of either *gfi1aa* or *gfi1b* partially reduces hemoglobinized erythrocytes relative to control embryos, while knockdown of both genes results in a more profound reduction of hemoglobinized erythrocytes (d–g). At 120 hpf, *gfi1aa* morphants have recovered from their initial anemia, as indicated by the presence of hemoglobinized cells, whereas *gfi1b* morphants are severely anemic (h–j). (B) FACS of *Tg(globin-LCR:eGFP)* embryos injected with MO targeting either *gfi1aa* (green) or *gfi1b* (blue) quantifies the relative change in erythrocytes over time, showing that loss of either *gfi1aa* or *gfi1b* differentially impacts erythropoiesis at different stages of development (mean \pm SE, *t* test, **p* < 0.05, *n* = 3).

investigate whether knockdown of both *gfi* genes would have a greater impact on hemoglobinization than knockdown of either gene alone. Knockdown of both *gfi* genes using the same total dosage of MO showed an absence of hemoglobinized cells at 72 hpf (Fig. 4A, g). Extending our time course, we evaluated hemoglobinization in *gfi* morphants at 120 hpf. Remarkably, *gfi1aa* morphants recover from their initial anemia as observed by their abundance of hemoglobinized cells at 120 hpf (Fig. 4A, h–i). Conversely, *gfi1b* morphants are severely anemic by 120 hpf (Fig. 4A, j). To rigorously quantify the change in erythrocytes over time in *gfi* morphants, we knocked down *gfi1aa* and *gfi1b* in the *Tg(globin-LCR:eGFP)* line. Consistent with the hemoglobinization trend observed by *o*-dianisidine staining, *gfi1aa* morphants showed a significant reduction in erythrocytes at 48 hpf, subsequently recovering by 120 hpf, while *gfi1b* morphants showed a significant decrease in erythrocytes at later time points (Fig. 4B). *in toto*, our erythrocyte data demonstrated that *gfi1aa* and *gfi1b* have discrete roles at different stages of erythropoiesis and

suggested that the loss of each *gfi* gene could be differentially impacting primitive and definitive hematopoietic lineages.

Zebrafish *gfi1b* is required for definitive hematopoiesis

To evaluate the roles of *gfi1aa* and *gfi1b* in definitive hematopoiesis, we knocked down each gene and used WISH to evaluate the impact on definitive HSC using *runx-1*, *c-myb* and *ikaros* as markers (Davidson and Zon, 2004). Loss of *gfi1b*, but not *gfi1aa*, reduces the expression of *runx-1*, *c-myb* and *ikaros* in the AGM at 36 hpf, indicating a reduction of definitive HSC (Fig. 5A, a–f). To quantify the reduction in definitive HSC, we performed FACS of *Tg(cd41:eGFP)* *gfi* morphants and examined the GFP^{lo} expressing definitive HSC population (Ma et al., 2011). Consistent with our WISH results, loss of *gfi1b* reduces the population of definitive HSC, while loss of *gfi1aa* has no effect (Fig. 5B). We also used the *Tg(cd41:eGFP)* line to evaluate the thrombocyte lineage in *gfi*

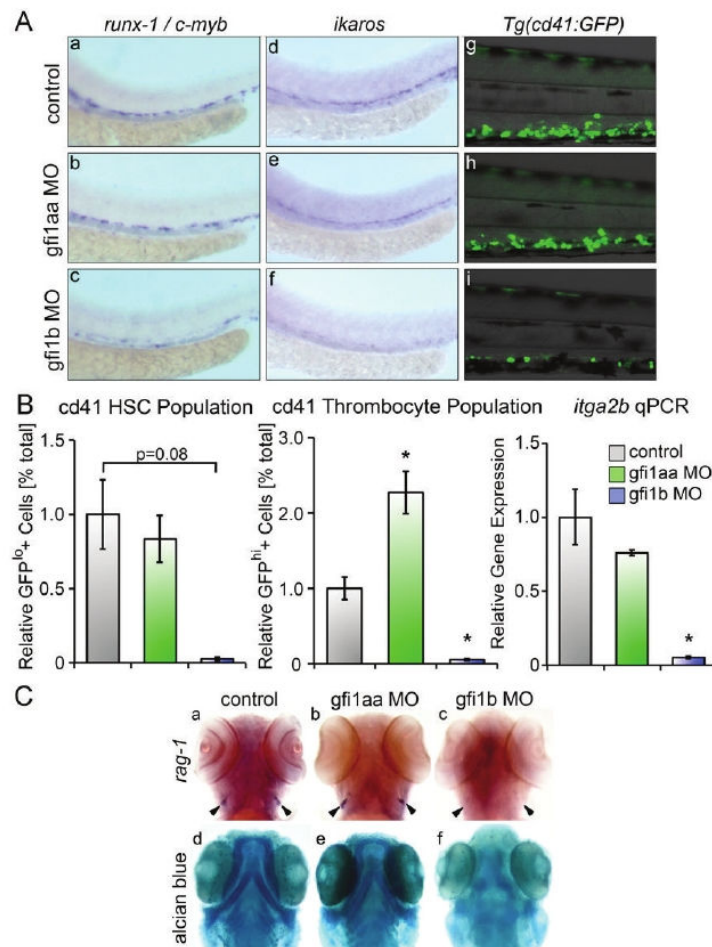


Fig. 5. Loss of *gfi1b* silences definitive HSC. (A) Loss of *gfi1b* silences *runx-1*, *c-myb* and *ikaros* expressing HSC in the AGM at 36 hpf relative to matched controls (a–f). Loss of *gfi1b* also reduces expression of GFP⁺ *cd41* cells in *Tg(cd41:eGFP)* embryos at 96 hpf (d–f). (B) FACS of *Tg(cd41:eGFP)* embryos at 96 hpf injected with MO targeting either *gfi1aa* or *gfi1b* reveals a marked reduction in the GFP^{lo} and GFP^{hi} populations in *gfi1b* morphants (mean \pm SE, *t* test, **p* < 0.05, *n* = 3). qRT-PCR of *gfi* morphants shows significantly reduced expression of *itga2b* (*cd41*) in *gfi1b* morphants at 96 hpf (mean \pm SE, *t* test, **p* < 0.05, *n* = 3). (C) Loss of *gfi1b* silences *rag-1* expressing thymic lymphocytes, while loss of *gfi1aa* has no effect on lymphopoiesis in the thymic anlage (a–c). (d–f) Embryos were stained with Alcian Blue to delineate the morphologic architecture of the jaw cartilages. *gfi1aa* morphants have normal jaw cartilage development compared with wild type controls (d, e), while *gfi1b* morphants show dysplastic development of the jaw cartilage (f).

morphants using GFP^{hi} as a marker. Zebrafish thrombocytes are the hemostatic cellular equivalent of mammalian platelets (Lin et al., 2005). Consistent with the loss of definitive HSC in *gfi1b* morphants, loss of *gfi1b* reduces the population of downstream thrombocytes (Fig. 5B). Loss of *gfi1aa* caused an unexpected increase in the thrombocyte population, possibly due to reactive thrombocytosis often observed in anemias (Dan, 2005) (Fig. 5B). To confirm the defect in thrombopoiesis, we analyzed the expression of *cd41* in *gfi* morphants using *itga2b*. *itga2b* encodes the platelet glycoprotein GPIIb and is a member of the *cd41* protein complex in zebrafish thrombocytes (Davidson and Zon, 2004). Consistent with our thrombocyte FACS data, *gfi1b* morphants showed a significant reduction in expression of *itga2b* relative to controls (Fig. 5B). *gfi1aa* morphants, in contrast, showed no significant change in *itga2b* expression (Fig. 5B).

To assess the role of *gfi1aa* and *gfi1b* in lymphocyte development, we performed WISH of *rag-1* in *gfi* morphants. Consistent with their lack of *ikaros* expression, *gfi1b* morphants showed a reduction in *rag-1* expressing thymic lymphocytes, while the thymic expression of *rag-1* was preserved in *gfi1aa* morphants (Fig. 5C, a–c). Since other hematopoietic factors have been shown to participate in ectoderm and endoderm development (Amigo et al., 2009), we further analyzed whether the jaw cartilage supporting the thymic anlage was properly formed in *gfi* morphants. Alcian blue staining showed dysplastic development of

the jaw cartilage in *gfi1b* morphants, while *gfi1aa* morphants showed normal jaw cartilage development (Fig. 5C, d–f).

Genetic epistasis of *gfi1aa* and *gfi1b* in primitive and definitive hematopoiesis

To understand the epistatic relationship of the *gfi* genes in the context of other hematopoietic transcription factors, we evaluated the ICM expression of *gfi1aa* and *gfi1b* in mutant zebrafish with genetic blocks at sequential stages of hematopoietic differentiation. Since both *gfi1aa* and *gfi1b* are strongly expressed in the ICM at the 20 ss in wild type zebrafish (Fig. 6A, a, b, arrowhead). We chose this stage to evaluate *gfi* expression in mutant embryos. The earliest blood mutant, *cloche* (*clo*), is defective in a gene at the hemangioblast level that specifies the formation of hematopoietic and vascular progenitors (Stainier et al., 1995). Neither *gfi1aa* nor *gfi1b* are expressed in the ICM in *clo* embryos (Fig. 6A, c, d), indicating that the *clo* gene product functions upstream of *gfi1aa* and *gfi1b* and confirming the hematopoietic specificity of our WISH results. We next evaluated *gfi* expression in the *scl* mutant, *scl*²¹³⁸⁴ (Bussmann et al., 2007). Previous epistatic analyses have confirmed that *scl* acts downstream of *clo* in primitive hematopoietic progenitors (Gering et al., 1998). Expression of both *gfi1aa* and *gfi1b* is absent in *scl*²¹³⁸⁴ mutants (Fig. 6A, e, f), suggesting that the *gfi* genes function either downstream or in parallel to *scl*.

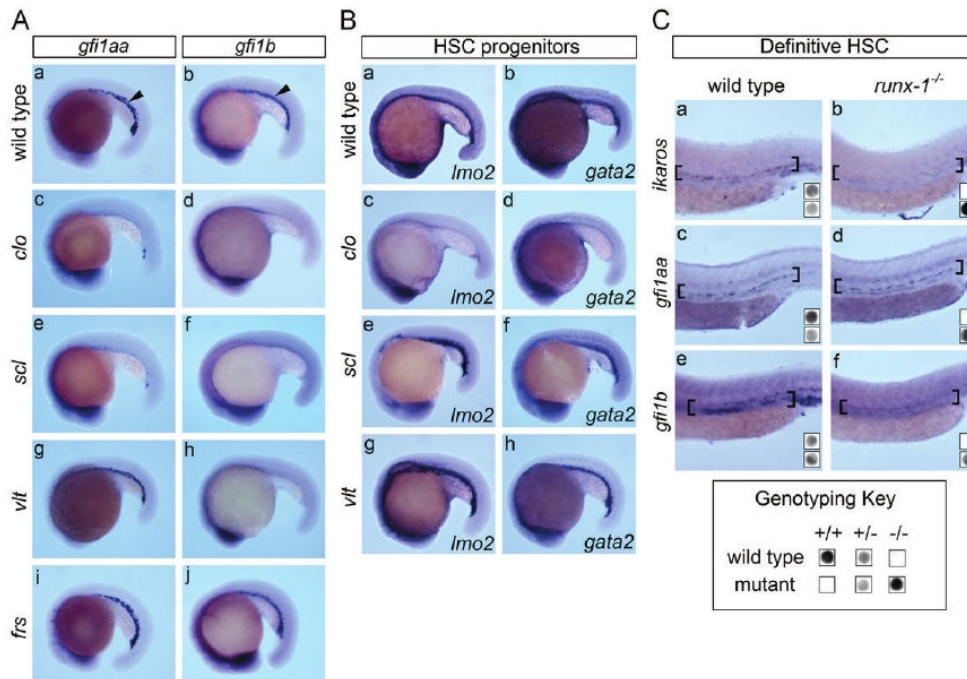


Fig. 6. *gfi1aa* and *gfi1b* function at different hierarchical levels in hematopoietic epistasis. (A) The ICM expression of *gfi1aa* and *gfi1b* was evaluated in mutants with genetic blocks at sequential stages in hematopoiesis at the 20 ss. (a–b) Both *gfi1aa* and *gfi1b* are expressed in the ICM (arrowheads) in wild type embryos. (c–d) Mutants with genetic defects at the hemangioblast level (*clo*) and hematopoietic progenitors (*scl*) specifically lack ICM expression of either *gfi1aa* or *gfi1b*. Note that the neural expression of the *gfi* genes is preserved in these genetic mutants, confirming the specificity of the assay. (g–h) ICM expression of *gfi1aa* is preserved in the *gata1* mutant, *vlt*, whereas *gfi1b* expression is deficient. (i–j) In contrast, both *gfi1aa* and *gfi1b* are expressed in the ICM of the *mfn1* mutant, *fs*. (B) To confirm the presence of hematopoietic progenitors in various genetic mutants, the expression of *lmo2* and *gata2* was evaluated in mutant embryos at the 20 ss. (a–b) Both *lmo2* and *gata2* are expressed in the ICM of wild type control embryos. (c–d) Neither *lmo2* nor *gata2* is expressed in the ICM of *clo* mutants, which fail to specify hematopoietic and vascular progenitors. (e–h) Expression of *lmo2* and *gata2* is preserved in *scl* and *gata1* (*vlt*) mutants, confirming that hematopoietic progenitors are present. (C) The AGM expression of *ikaros*, *gfi1aa* and *gfi1b* was evaluated in *runx-1* mutants at 36 hpf and embryos were genotyped for *runx-1* wild type and mutant alleles. *ikaros* was included as a reference control. (a–b) AGM expression (brackets) of *ikaros* is silenced in *runx-1* mutants relative to wild type embryos (wt), confirming the defect in definitive hematopoiesis. (c–d) AGM expression of *gfi1aa* is preserved in *runx-1* mutants. (e–f) Loss of *runx-1* silences expression of *gfi1b* in the AGM.

Please cite this article as: Cooney, J.D., et al., Teleost growth factor independence (*gfi*) genes differentially regulate successive waves of hematopoiesis. Dev. Biol. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.08.015>

Taken together with our prior loss-of-function analyses, *gfi1aa* and *scl* likely function in parallel, as loss of either gene silences expression of the other gene.

Moving further downstream in the epistatic hierarchy, we evaluated *gfi* expression in the *gata1* mutant, *vlad tepes* (*vlt*) (Lyons et al., 2002). *gata1* functions downstream of *scl* to drive the specification of erythroid progenitors (Davidson and Zon, 2004). The expression of *gfi1aa* is preserved in *vlt* mutants, indicating that *gfi1aa* is epistatically upstream of *gata1* (Fig. 6A, g). In contrast, *gfi1b* expression is absent in *vlt* mutants, indicating that *gfi1b* functions downstream of *gata1* in primitive hematopoiesis (Fig. 6A, h). To determine whether *gata1* also regulates *gfi1b* in definitive hematopoiesis, we isolated RNA from control and *gata1* morphants at 30, 36, and 96 hpf and performed qRT-PCR using probes for *gfi1aa*, *gfi1b*, and *cd41* (*itga2b*). *gfi1b* expression is reduced in *gata1* morphants at 30 and 36 hpf, reinforcing our conclusion that *gfi1b* functions downstream or in parallel to *gata1* in the primitive program (Supplementary Fig. S2). In contrast to the primitive wave, both *gfi1b* and *cd41* show normal levels of expression in *gata1* morphants by 4 dpf, indicating that their expression is not dependent on *gata1* in the definitive program (Supplementary Fig. S2) (Davidson and Zon, 2004).

We next evaluated *gfi1aa* and *gfi1b* expression in the *frascati* (*frs*) mutant (Shaw et al., 2006), which has a block in erythroid maturation at a later stage than *vlt*. *frs* mutants are defective for *mitoferrin1* (*slc25a37*), the primary importer of mitochondrial iron in developing erythroblasts (Shaw et al., 2006). Both *gfi1aa* and *gfi1b* are expressed in *frs* mutants, indicating that the block in terminal erythroid differentiation in *frs* mutants is epistatically downstream of the expression of the *gfi* genes.

To strengthen our epistasis model, we analyzed the expression of *lmo2* and *gata2* in primitive hematopoietic progenitors in the ICM of mutants with defects in early hematopoiesis. Compared to wild type embryos, which have robust expression of *lmo2* and *gata2* in the ICM at the 20 ss (Fig. 6B, a, b), *clo* mutants lack *lmo2* and *gata2* expression in the ICM due to an absence of hematopoietic progenitors (Stainier et al., 1995) (Fig. 6B, c, d). Conversely, both *lmo2* and *gata2* are expressed in *scl* and *vlt* mutants (Fig. 6B, e–h), thereby excluding the possibility that loss of *gfi* expression in *scl* and *vlt* mutants is due to a global loss of hematopoietic progenitors. The presence of *lmo2* and *gata2* in the *scl* mutant is consistent with previous observations in embryos depleted of *scl* by MO-mediated knockdown (Dooley et al., 2005; Patterson et al., 2005).

Extending our epistasis studies to definitive hematopoiesis, we examined the expression of *gfi1aa* and *gfi1b* in the AGM in *runx-1* mutants, which lack definitive HSC (Sood et al., 2010). We included *ikaros*, another marker of definitive HSC progenitors (Davidson and Zon, 2004) as a reference control. The AGM expression of *ikaros* is silenced in *runx-1* mutants as compared to wild type embryos (Fig. 6C, a, b, brackets), thus confirming the defect in definitive HSC in *runx-1* mutants. Consistent with our functional data, *gfi1aa* has no role in definitive hematopoiesis, as loss of *runx-1* does not impact *gfi1aa* expression in the AGM (Fig. 6C, c, d, brackets). Conversely, expression of *gfi1b* is silenced in *runx-1* mutants (Fig. 6C, e, f), demonstrating that *gfi1b* is epistatically in parallel or downstream of *runx-1*. We further validated our genetic analysis using ASO probes specific for either wild type or mutant *runx-1* alleles to genotype representative embryos. Taken together with our prior loss-of-function analyses, we conclude that *gfi1b* and *runx-1* likely function in parallel, as loss of either gene silences expression of the other gene.

Discussion

In mammalian models, *Gfi* factors have discrete roles as critical regulators of either myeloid and lymphoid lineages (*Gfi1a*) or

erythroid and megakaryocyte lineages (*Gfi1b*). Previous studies in zebrafish have proposed that *gfi1aa* functions as the teleost ortholog of *Gfi1a* (Wei et al., 2008); however, the phenotype of *gfi1aa* morphants, particularly the severe anemia observed during early embryogenesis, is inconsistent with the mammalian *Gfi1a* paradigm. Through extending the functional studies of zebrafish *gfi1aa* in definitive hematopoiesis and functionally characterizing a novel *gfi*-family transcription factor, *gfi1b*, we suggest that zebrafish *gfi* factors are functionally distinct from their mammalian orthologs. In contrast to the mammalian *Gfi* paradigm, we demonstrate that the putative zebrafish ortholog of *Gfi1a*, *gfi1aa*, is specifically required in early embryogenesis as a regulator of primitive hematopoietic progenitors, while *gfi1b* is required at a later stage to regulate definitive HSC (Fig. 7).

Studies of *Gfi1a* knockouts in mouse have established that *Gfi1a* is required to maintain HSC quiescence and preserve HSC self-renewal capacity (Hock et al., 2004; Zeng et al., 2004). Despite a critical role in HSC maintenance, loss of *Gfi1a* in mouse results in discrete, rather than global defects in specific downstream lineages (Karsunky et al., 2002; Hock et al., 2003). Two independent studies of *Gfi1a* knockout mice have demonstrated that *Gfi1a* deficiency impairs differentiation of granulocytes, neutrophils and lymphocytes while preserving erythrocytes and megakaryocytes (Karsunky et al., 2002; Hock et al., 2003). In contrast to the mouse model, we show that loss of *gfi1aa* in zebrafish results in severe anemia in early embryogenesis secondary to a reduction in *scl* and *gata1* expression. By quantifying the change in erythrocytes over time and examining definitive HSC markers, we demonstrate that loss of *gfi1aa* specifically impacts primitive, but not definitive hematopoietic progenitors.

Interestingly, the defect in primitive hematopoiesis observed in *gfi1aa* morphants is strikingly similar to the phenotype of an unmapped zebrafish mutant named *bloodless* (*bls*) (Liao et al., 2002). The *bls* mutant, which has a specific defect in ICM hematopoiesis, starts to recover erythrocytes and other lineages after 5 dpf (Liao et al., 2002). Like *gfi1aa* morphants, *bls* embryos

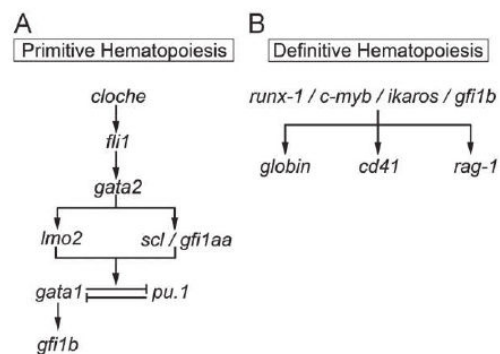


Fig. 7. Model of *gfi1aa* and *gfi1b* epistasis in primitive and definitive hematopoiesis. (A) The *clo* gene product and *fli1* function at the top of the hierarchical cascade to drive formation of the hemangioblast from mesoderm precursors. The hemangioblast subsequently gives rise to hematopoietic progenitors expressing *gata2*, *lmo2* and *scl*. Expression of *gata2* is independent of *gfi1aa* expression, while *gata2* is required for *scl* expression, and vice-versa. Primitive hematopoietic progenitors expressing *lmo2*, *scl* and *gfi1aa* generate erythroid and myeloid progenitors, regulated by *gata1* and *pu.1*, respectively. *gata1* and *pu.1* antagonize each other to specify erythroid vs. myeloid progenitor commitment. Downstream in the primitive wave, *gata1* is required for *gfi1b* expression. (B) In definitive hematopoiesis, *runx-1*, *c-myb*, *ikaros* and *gfi1b* act in parallel to specify definitive HSC and subsequently drive formation of downstream definitive lineages marked by *globin* (erythrocytes), *cd41* (thrombocytes) and *rag-1* (lymphocytes).

show reduced expression of *scl* and *gata1* in primitive wave hematopoiesis, but subsequently recover during definitive hematopoiesis (Liao et al., 2002). Since the *bls* gene product has yet to be identified, *gfi1aa* might be a reasonable candidate gene for the *bls* mutant.

In contrast to the well-established role of *Gfi1a* as a regulator of HSC, evidence that *Gfi1b* plays a role in mammalian HSC regulation has only recently emerged. Like *Gfi1a*, *Gfi1b* also regulates HSC dormancy and quiescence (Khandanpour et al., 2010). Notably, mouse knockouts of *Gfi1b* result in an increase in HSC populations while specifically reducing the populations of downstream platelets and erythrocytes (Khandanpour et al., 2010). Myelopoiesis and lymphopoiesis is normal in *Gfi1b* knockout mice (Saleque et al., 2002; Khandanpour et al., 2010). In contrast to the mouse model of *Gfi1b* function, loss of *gfi1b* impacts definitive HSC populations and, consequently, the ability to generate downstream definitive hematopoietic lineages. While *gfi1aa* morphants are severely anemic during early embryogenesis, we showed that the erythrocyte population in *gfi1b* morphants is intact at this stage. However, as the production of erythrocytes transitions from the primitive to the definitive HSC program, *gfi1b* morphants show a steady reduction in erythrocytes over time. A similar phenotype is observed beginning at 3 dpf in the *grechetto* zebrafish mutant, which undergoes normal primitive wave hematopoiesis but lacks definitive HSC due to a defect in *cpsf1* (Bolli et al., 2011).

After establishing that *gfi1aa* and *gfi1b* represent a departure from the mammalian *Gfi* paradigm, we analyzed the epistatic relationship between *gfi1aa* and *gfi1b* and known teleost hematopoietic transcription factors. Using our analyses of *gfi* morphants and genetic mutants, we generated a model depicting the epistatic hierarchy of the *gfi* factors in primitive and definitive hematopoiesis. In primitive hematopoiesis, the *clo* gene product and *fli1* act at the top of the genetic cascade to drive the development of the hemangioblast from mesoderm precursors (Liu et al., 2008) (Fig. 7A). The hemangioblast subsequently gives rise to endothelial and hematopoietic progenitors expressing *gata2*, *lmo2* and *scl* (Davidson and Zon, 2004). Our analysis of *scl* genetic mutants along with extensive studies of *lmo2* and *scl* morphants (Dooley et al., 2005; Patterson et al., 2005, 2007) demonstrated that *scl* and *lmo2* function in parallel, downstream of *gata2*. Through our analyses of *gfi1aa* morphants, we concluded that *gfi1aa* functions downstream of *gata2*, in parallel with *scl*. Recent murine studies have shown that *Scl* can regulate *Gfi1a* expression in early hematopoietic cells (Wilson et al., 2010); however, given the functional differences between *gfi1aa* and mammalian *Gfi1a*, it is unclear whether the specific regulatory mechanisms of higher vertebrates are directly applicable to the teleost *gfi* model. In more differentiated primitive populations, the reduction of erythroid progenitors and concomitant expansion of myeloid progenitors observed in *gfi1aa* morphants is a consequence of both reduced *gata1* expression and disinhibition of *pu.1* repression by loss of *gfi1aa*. Thus, the function of *Gfi1a* as a repressor of myeloid differentiation (Spooner et al., 2009) appears to be conserved in murine and teleost models.

While *gfi1aa* likely acts early in primitive hematopoiesis, our epistasis studies of genetic morphants indicate that *gfi1b* functions at a later stage, downstream or in parallel to *gata1* during the primitive wave. Extending our epistasis studies in definitive hematopoiesis, we further concluded that *gfi1b* acts in parallel with *runx-1*, *c-myb* and *ikaros* to regulate definitive HSC and subsequent downstream definitive lineages (Fig. 7B). In contrast to the primitive program, the expression of *gfi1b* is not dependent on *gata1* in the definitive program.

The partitioning of complex mammalian *Gfi* transcription factors into teleost genes with different roles in zebrafish provides

a unique opportunity to dissect discrete roles in hematopoiesis and embryogenesis. Through our cloning and functional analysis of a novel *gfi*-family transcription factor: *gfi1b*, and functional characterization of *gfi1aa* in definitive hematopoiesis, we showed that zebrafish have evolved a new paradigm for the regulation of primitive and definitive hematopoietic lineages. While mammalian *gfi* factors regulate the differentiation of hematopoietic lineages at the committed progenitor stage, teleost *gfi* factors regulate hematopoiesis at the HSPC level. This is not too dissimilar to *FOG-1*, which functions as a multi-versatile *GATA-1* cofactor in all hematopoietic and endodermal tissues in teleosts; in contrast, this multifaceted function is divided between *FOG-1* and *FOG-2* in higher vertebrates (Amigo et al., 2009).

We demonstrated that during early embryogenesis, zebrafish *gfi1aa* specifically regulates the primitive wave of hematopoiesis, while *gfi1b* regulates the subsequent, definitive wave. By harnessing the genetic power of the zebrafish model, we placed the *gfi* factors within the hierarchy of genes whose native function is required for hematopoiesis.

Author contributions

J.D.C., G.J.H-S., E.S. and B.H.P. conceived the project, designed and performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. P.F.M., K.J.C., H.A., D.S.B., D.I.S., G.C.S., C.W. and P.G.G. designed experiments, performed research and analyzed data. A.J.D. helped with zebrafish colony maintenance. O.J.T., T.E.N. and L.I.Z. provided reagents.

Acknowledgments

We thank members of our lab (Drs. Caiyong Chen, Iman Schultz, Jacky Chung) and colleagues (Drs. Eric Liao, Alan Cantor) for critical review of the manuscript, Christian Lawrence and his team for the zebrafish husbandry, Chris Simpson for histology sections, Emily Huang for the *scl*^{T21384} embryos, Dr. Joseph Italiano for access to the Orca IIER CCD camera and fluorescence imaging software, Dr. Karin Hoffmeister for use of the FACS machine, Jared Ganis for the *Tg(globin LCR:eGFP)* line, Drs. Paul Liu and Raman Sood for the *runx-1*^{w84x} line, Dr. Robert Handin for the *Tg(cd41:eGFP)* line, and Drs. Amy Singer and John Postlethwait for their help with *gfi* nomenclatures. This research was supported with grants from the American Heart Association (J.D.C., A.J.D.), the American Society of Hematology (P.F.M., G.C.S.), the Finnish Sigrid Juselius Foundation (H.A.), CAPES and FAPESP (D.S.B.), the Canadian Institutes of Health Research (O.J.T.), the Howard Hughes Medical Institute (L.I.Z.), the March of Dimes Foundation (B.H.P.), and by the National Institutes of Health grants R01 DK070838 (B.H.P.), P01 HL032262 (B.H.P., L.I.Z.), T32 HL07623 (E.S., D.I.S.), K01 DK085217 (D.I.S.).

GenBank Accession numbers: *Danio rerio gfi1aa* (NM_001020776.1) and *gfi1b* (HQ599192).

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.08.015>.

References

Amigo, J.D., Yu, M., Troadec, M.-B., Gwynn, B., Cooney, J.D., Lambert, A.J., Chi, N.C., Weiss, M.J., Peters, L.L., Kaplan, J., Cantor, A.B., Paw, B.H., 2011. Identification of

- distal cis-regulatory elements at mouse mitoferrin loci using zebrafish transgenesis. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1344–1356.
- Amigo, J.D., Ackermann, G.E., Cope, J.J., Yu, M., Cooney, J.D., Ma, D., Langer, N.B., Shafizadeh, E., Shaw, G.C., Horsely, W., Trede, N.S., Davidson, A.J., Barut, B.A., Zhou, Y., Wojiski, S.A., Traver, D., Moran, T.B., Kourkoulis, G., Hsu, K., Kanki, J.P., Shah, D.J., Lin, H.-F., Handin, R.I., Cantor, A.B., Paw, B.H., 2009. The role and regulation of friend of GATA-1 (FOG-1) during blood development in the zebrafish. *Blood* 114, 4654–4663.
- Bolli, N., Payne, E.M., Rhodes, J., Gjini, E., Johnston, A.B., Guo, F., Lee, J.-S., Stewart, R.A., Kanki, J.P., Chen, A.T., Zhou, Y., Zon, L.I., Look, A.T., 2011. Cpsf1 is required for definitive HSC survival in zebrafish. *Blood* 117, 3996–4007.
- Bums, C.E., Traver, D., Mayhall, E., Shepard, J.L., Zon, L.I., 2005. Hematopoietic stem cell fate is established by the Notch–Runx pathway. *Genes Dev.* 19, 2331–2342.
- Bussmann, J., Bakkers, J., Schulte-Merker, S., 2007. Early endocardial morphogenesis requires Scf/Tal1. *PLoS Genet.* 3, e140.
- Dan, K., 2005. Thrombocytosis in iron deficiency anemia. *Intern. Med.* 44, 1025–1026.
- Davidson, A.J., Zon, L.I., 2004. The 'definitive' (and "primitive") guide to zebrafish hematopoiesis. *Oncogene* 23, 7233–7246.
- Dooley, K.A., Davidson, A.J., Zon, L.I., 2005. Zebrafish scl functions independently in hematopoietic and endothelial development. *Dev. Biol.* 277, 522–536.
- Dufourcq, P., Rastegar, S., Strähle, U., Blader, P., 2004. Parapineal specific expression of *gfi1* in the zebrafish epithalamus. *Gene. Expr. Patterns* 4, 53–57.
- Farr, C.J., Saiki, R.K., Erlich, H.A., McCormick, F., Marshall, C.J., 1988. Analysis of RAS gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1629–1633.
- Ganis, J.J., Hsia, N., Trompouki, E., de Jong, J.L.O., Dibiase, A., Lambert, J.S., Jia, Z., Sabo, P.J., Weaver, M., Sandstrom, R., Stamatoyannopoulos, J.A., Zhou, Y., Zon, L.I., 2012. Zebrafish globin switching occurs in two developmental stages and is controlled by the LCR. *Dev. Biol.* 366, 185–194.
- Gering, M., Rodaway, A.R., Götgens, B., Patient, R.K., Green, A.R., 1998. The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm. *EMBO J.* 17, 4029–4045.
- Gilks, C.B., Bear, S.E., Grimes, H.L., Tschlis, P.N., 1993. Progression of interleukin-2 (IL-2)-dependent rat T cell lymphoma lines to IL-2-independent growth following activation of a gene (*Gfi-1*) encoding a novel zinc finger protein. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1759–1768.
- Grimes, H.L., Chan, T.O., Zweidler-Mckay, P.A., Tong, B., Tschlis, P.N., 1996. The *Gfi-1* proto-oncogene contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6263–6272.
- Hock, H., Hamblen, M.J., Rooke, H.M., Schindler, J.W., Saleque, S., Fujiwara, Y., Orkin, S.H., 2004. *Gfi-1* restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* 431, 1002–1007.
- Hock, H., Hamblen, M.J., Rooke, H.M., Traver, D., Bronson, R.T., Cameron, S., Orkin, S.H., 2003. Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor *Gfi-1* in neutrophil differentiation. *Immunity* 18, 109–120.
- Hsu, K., Traver, D., Kutok, J.L., Hagen, A., Liu, T.-X., Paw, B.H., Rhodes, J., Berman, J.N., Zon, L.I., Kanki, J.P., Look, A.T., 2004. The *pu.1* promoter drives myeloid gene expression in zebrafish. *Blood* 104, 1291–1297.
- Karsunky, H., Zeng, H., Schmidt, T., Zevnik, B., Kluge, R., Schmid, K.W., Dührsen, U., Möröy, T., 2002. Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor *Gfi1*. *Nat. Genet.* 30, 295–300.
- Khandanpour, C., Sharif-Askari, E., Vassen, L., Gaudreau, M.-C., Zhu, J., Paul, W.E., Okayama, T., Kosan, C., Möröy, T., 2010. Evidence that growth factor independence 1b regulates dormancy and peripheral blood mobilization of hematopoietic stem cells. *Blood* 116, 5149–5161.
- Liao, E.C., Trede, N.S., Ransom, D., Zapata, A., Kieran, M., Zon, L.I., 2002. Non-cell autonomous requirement for the bloodless gene in primitive hematopoiesis of zebrafish. *Development* 129, 649–659.
- Lieschke, G.J., Oates, A.C., Paw, B.H., Thompson, M.A., Hall, N.E., Ward, A.C., Ho, R.K., Zon, L.I., Layton, J.E., 2002. Zebrafish SPI-1 (*PU.1*) marks a site of myeloid development independent of primitive erythropoiesis: implications for axial patterning. *Dev. Biol.* 246, 274–295.
- Lin, H.-F., Traver, D., Zhu, H., Dooley, K., Paw, B.H., Zon, L.I., Handin, R.I., 2005. Analysis of thrombocyte development in CD41-GFP transgenic zebrafish. *Blood* 106, 3803–3810.
- Liu, F., Walmsley, M., Rodaway, A., Patient, R., 2008. *Flh1* acts at the top of the transcriptional network driving blood and endothelial development. *Curr. Biol.* 18, 1234–1240.
- Long, Q., Meng, A., Wang, H., Jessen, J.R., Farrell, M.J., Lin, S., 1997. GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene. *Development* 124, 4105–4111.
- Lyons, S.E., Lawson, N.D., Lei, L., Bennett, P.E., Weinstein, B.M., Liu, P.P., 2002. A nonsense mutation in zebrafish *gata1* causes the bloodless phenotype in vlad tepes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 5454–5459.
- Ma, D., Zhang, J., Lin, H.-F., Italiano, J., Handin, R.I., 2011. The identification and characterization of zebrafish hematopoietic stem cells. *Blood* 118, 289–297.
- Meeker, N.D., Hutchinson, S.A., Ho, L., Trede, N.S., 2007. Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues. *BioTechniques* 43, 610–614.
- Nilsson, R., Schultz, I.J., Pierce, E.L., Soltis, K.A., Naranuntarat, A., Ward, D.M., Baughman, J.M., Paradkar, P.N., Kingsley, P.D., Culotta, V.C., Kaplan, J., Palis, J., Paw, B.H., Mootha, V.K., 2009. Discovery of genes essential for heme biosynthesis through large-scale gene expression analysis. *Cell Metab.* 10, 119–130.
- Patterson, L.J., Gering, M., Patient, R., 2005. *Scf* is required for dorsal aorta as well as blood formation in zebrafish embryos. *Blood* 105, 3502–3511.
- Patterson, L.J., Gering, M., Eckfeldt, C.E., Green, A.R., Verfaillie, C.M., Ekker, S.C., Patient, R., 2007. The transcription factors *Scf* and *Lmo2* act together during development of the hemangioblast in zebrafish. *Blood* 109, 2389–2398.
- Paw, B.H., Moskowitz, S.M., Uhrhammer, N., Wright, N., Kaback, M.M., Neufeld, E.F., 1990. Juvenile GM2 gangliosidosis caused by substitution of histidine for arginine at position 499 or 504 of the alpha-subunit of beta-hexosaminidase. *J. Biol. Chem.* 265, 9452–9457.
- Pelster, B., Burggren, W.W., 1996. Disruption of hemoglobin oxygen transport does not impact oxygen-dependent physiological processes in developing embryos of zebra fish (*Danio rerio*). *Circ. Res.* 79, 358–362.
- Person, R.E., Li, F.-Q., Duan, Z., Benson, K.F., Wechsler, J., Papadaki, H.A., Eliopoulos, G., Kaufman, C., Bertolone, S.J., Nakamoto, B., Papayannopoulou, T., Grimes, H.L., Horwitz, M., 2003. Mutations in proto-oncogene *Gfi1* cause human neutropenia and target ELA2. *Nat. Genet.* 34, 308–312.
- Postlethwait, J., Woods, L., Ngo-Hazelett, P., Yan, Y., Kelly, P., Chu, F., Huang, H., Hill-Force, A., Talbot, W., 2000. Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome Res.* 10, 1890.
- Randrianarison-Huetz, V., Laurent, B., Bardet, V., Blobé, G.C., Huetz, F., Duménil, D., 2010. *Gfi-1B* controls human erythroid and megakaryocytic differentiation by regulating TGF-beta signaling at the bipotent erythro-megakaryocytic progenitor stage. *Blood* 115, 2784–2795.
- Rhodes, J., Hagen, A., Hsu, K., Deng, M., Liu, T.-X., Look, A.T., Kanki, J.P., 2005. Interplay of *pu.1* and *gata1* determines myelo-erythroid progenitor cell fate in zebrafish. *Dev. Cell* 8, 97–108.
- Saleque, S., Cameron, S., Orkin, S.H., 2002. The zinc-finger proto-oncogene *Gfi-1b* is essential for development of the erythroid and megakaryocytic lineages. *Genes Dev.* 16, 301–306.
- Schmidt, T., Karsunky, H., Gau, E., Zevnik, B., Elsässer, H.P., Möröy, T., 1998. Zinc finger protein *Gfi-1* has low oncogenic potential but cooperates strongly with *pim* and *myc* genes in T-cell lymphomagenesis. *Oncogene* 17, 2661–2667.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.
- Shaw, G.C., Cope, J.J., Li, L., Corson, K., Hersey, C., Ackermann, G.E., Gwynn, B., Lambert, A.J., Wingert, R.A., Traver, D., Trede, N.S., Barut, B.A., Zhou, Y., Minet, E., Donovan, A., Brownlie, A., Balzan, R., Weiss, M.J., Peters, L.L., Kaplan, J., Zon, L.I., Paw, B.H., 2006. Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature* 440, 96–100.
- Sood, R., English, M.A., Belele, C.L., Jin, H., Bishop, K., Haskins, R., McKinney, M.C., Chahal, J., Weinstein, B.M., Wen, Z., Liu, P.P., 2010. Development of multi-lineage adult hematopoiesis in the zebrafish with a *runx1* truncation mutation. *Blood* 115, 2806–2809.
- Spooner, C.J., Cheng, J.X., Pujadas, E., Laslo, P., Singh, H., 2009. A recurrent network involving the transcription factors *PU.1* and *Gfi1* orchestrates innate and adaptive immune cell fates. *Immunity* 31, 576–586.
- Stainier, D.Y., Weinstein, B.M., Detrich, H.W., Zon, L.I., Fishman, M.C., 1995. *Cloche*, an early acting zebrafish gene, is required by both the endothelial and hematopoietic lineages. *Development* 121, 3141–3150.
- Thompson, M.A., Ransom, D.G., Pratt, S.J., MacLennan, H., Kieran, M.W., Detrich, H.W., Vail, B., Huber, T.L., Paw, B., Brownlie, A.J., Oates, A.C., Fritz, A., Gates, M.A., Amores, A., Bahary, N., Talbot, W.S., Her, H., Beier, D.R., Postlethwait, J.H., Zon, L.I., 1998. The *cloche* and *spadetail* genes differentially affect hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev. Biol.* 197, 248–269.
- van der Meer, L.T., Jansen, J.H., van der Reijden, B.A., 2010. *Gfi1* and *Gfi1b*: key regulators of hematopoiesis. *Leukemia* 24, 1834–1843.
- Wallis, D., Hamblen, M., Zhou, Y., Venken, K.J.T., Schumacher, A., Grimes, H.L., Zoghbi, H.Y., Orkin, S.H., Bellen, H.J., 2003. The zinc finger transcription factor *Gfi1*, implicated in lymphomagenesis, is required for inner ear hair cell differentiation and survival. *Development* 130, 221–232.
- Wei, W., Wen, L., Huang, P., Zhang, Z., Chen, Y., Xiao, A., Huang, H., Zhu, Z., Zhang, B., Lin, S., 2008. *Gfi1.1* regulates hematopoietic lineage differentiation during zebrafish embryogenesis. *Cell Res.* 18, 677–685.
- Wilson, N.K., Timms, R.T., Kinston, S.J., Cheng, Y.-H., Oram, S.H., Landry, J.-R., Mullender, J., Ottersbach, K., Gottgens, B., 2010. *Gfi1* expression is controlled by five distinct regulatory regions spread over 100 kilobases, with *Scf/Tal1*, *Gata2*, *PU.1*, *Erg*, *Meis1*, and *Runx1* acting as upstream regulators in early hematopoietic cells. *Mol. Cell. Biol.* 30, 3853–3863.
- Woods, L., Kelly, P., Chu, F., Ngo-Hazelett, P., Yan, Y., Huang, H., Postlethwait, J., Talbot, W., 2000. A comparative map of the zebrafish genome. *Genome Res.* 10, 1903.
- Zeng, H., Yücel, R., Kosan, C., Klein-Hitpass, L., Möröy, T., 2004. Transcription factor *Gfi1* regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. *EMBO J.* 23, 4116–4125.

Macrocytic anemia and mitochondriopathy resulting from a defect in *Sideroflexin 4*.

*Gordon J. Hildick-Smith, B.A.¹, *Jeffrey D. Cooney, B.S., M.A.^{1†}, *Caterina Garone, M.D.², Jonathon N. Thorn, Ph.D.¹, Non Miyata, Ph.D.³, Yvette Y. Yien, Ph.D.¹, H. Orhan Akman, Ph.D.², Caiyong Chen, Ph.D.¹, Diana S. Branco, Ph.D.^{1†}, Dhvanit I. Shah, Ph.D.¹, Matthew L. Freedman, M.D.⁴, Sarah E. Calvo, Ph.D.⁵, Carla M. Koehler, Ph.D.³, Joseph E. Italiano, Jr., Ph.D.¹, M. Alice Donati, M.D.⁶, Vamsi K. Mootha, M.D.⁵, Salvatore DiMauro, M.D.², Barry H. Paw, M.D., Ph.D.^{1,7,8§}

¹ Department of Medicine, Division of Hematology, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA.

² Department of Neurology, The Neurological Institute of New York, Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York, New York 10032, USA.

³ Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, Los Angeles, Los Angeles, California 90095, USA.

⁴ Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA.

⁵ Department of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02114, USA.

⁶ Departments of Pediatric Neurology and Metabolic and Neuromuscular Disorders, Anna Meyer Children's Hospital, University of Florence, 50132 Florence, Italy.

⁷ Department of Medicine, Division of Hematology-Oncology, Boston Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA.

⁸ Department of Pediatric Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA.

§ Address for correspondence: B.H.P., E-mail: bpaw@rics.bwh.harvard.edu, Tele: +1 617-355-9008, Fax: +1 617-355-9064.

* G.J.H-S., J.D.C., and C.G. contributed equally to this study.

† Present address: University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA (J.D.C.); Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil (D.S.B.).

Key words: *SFXN4*, red cell disorder, zebrafish, genetic complementation, mitochondria

Abbreviation Used: MRI (magnetic resonance imaging), MRS (magnetic resonance spectroscopy), ASO (allele-specific nucleotide hybridization).

The online version of the article contains data supplements

Abstract

Here, we describe a child with a mitochondrial disorder and macrocytic anemia, likely megaloblastic, of unknown etiology. Whole-exome sequencing identified a homozygous, recessive loss-of-function mutation in *Sideroflexin4 (SFXN4)*, a predicted mitochondrial multi-spanning transmembrane protein. Knockdown of *sfxn4* in zebrafish recapitulated the macrocytic anemia, with megaloblastic features, observed in the index patient. In vitro and in vivo complementation studies with patient fibroblasts and zebrafish models demonstrated the requirement of *SFXN4* for mitochondrial respiratory homeostasis and erythropoiesis. Our findings establish *SFXN4* as a new candidate gene for mitochondriopathies and macrocytic anemias of unknown etiology.

Introduction

Here we present a patient that presented at birth with combined mild normochromic macrocytic anemia and mitochondrial disease. Both conditions have persisted throughout the patient's life. A diverse group of diseases can generate macrocytic anemia. Although isolated macrocytosis does not adversely affect the patient, it is an indicator of aberrant biological processes. We have excluded all known causes of macrocytosis, which were recently reviewed by Aslinda et al.¹ Macrocytosis, in the form of megaloblastic anemia, can occur when DNA synthesis is inhibited, thereby delaying nuclear maturation while cytosolic maturation proceeds. This asynchrony produces the classic erythroid macrocytes and neutrophils with hypersegmented nuclei in the peripheral blood of patients with megaloblastic anemia, and as such, in our index patient.

Vitamin B12 and folate are crucial cofactors involved in purine and pyrimidine synthesis. This pathway can be blocked by dietary deficiencies in these vitamins. Additionally, there are disorders of cobalamin absorption, including pernicious anemia and Imerslund-Gräsbeck Syndrome.² These vitamin deficiencies were excluded, as the patient has normal serum B12 and folate. There are additional rare diseases that cause defects in cobalamin intercellular transport, such as transcobalamin deficiencies, and cellular cobalamin modification, represented by eight genetic complementation groups (recently reviewed by Whitehead).² Although these patients can have normal serum cobalamin and folate, defects in the cellular metabolism of either vitamin can be unmasked by elevated levels of either homocysteine or methylmalonic acid. Importantly, the patient has normal levels of these metabolic intermediates, thereby, ruling out defects in this canonical pathway. Less prevalent, orotic aciduria, is also known to cause megaloblastic anemia. This too was excluded, as the patient had no

detectable levels of orotic acid in her urine.³ We believe this patient to have a novel macrocytic anemia that is likely megaloblastic in character.

In search of the pathogenic mutation, we used the patient's mitochondrial disease to narrow the range of potential candidates to mitochondrial genes and nuclear genes encoding proteins expressed in the mitochondria.⁴ With this targeted approach, we used next-generation sequencing to identify a homozygous deletion mutation in the novel gene, *Sideroflexin 4 (SFXN4)*, a predicted multispinning transmembrane protein. To functionally validate the causal relationship, we successfully phenocopied the disease by knock down of the orthologous gene in the zebrafish (*Danio rerio*), an excellent model system to study human disease (reviewed by Lieschke and Currie).⁵ We further validated the molecular causality in primary fibroblasts derived from the patient using genetic complementation. We conclusively show that mutations in *SFXN4* are a novel cause for combined macrocytic anemia and mitochondrial disease.

Case Report

The patient is a 14-year-old female of white European origin, born to reportedly non-consanguineous healthy parents in Italy. Due to intrauterine growth retardation and oligohyramnios, delivery was induced at 37 weeks gestational age. Although the infant had Apgar scores of 8 and 10, her weight was 2.26 kg (3rd percentile), length was 45 cm (3rd percentile), and cranial circumference was 31.5 cm (3rd percentile). At 48 hours of life she showed Kussmaul respiration, increased blood lactate, ammonia and uric acid. A muscle biopsy showed cytochrome c oxidase deficiency, while her brain MRI study was normal. By 3 months of life, she had macrocytic anemia, increased blood alanine and variably increased lactate. At 1 year she could walk but developed growth delays. Although she could understand many spoken words, she had a limited speaking

vocabulary. Additionally, she had dysmorphic features. By 3 years of age she was treated with CoQ, carnitine, and vitamins C and B1. One year later a new muscle biopsy revealed severe complex I deficiency (activity of 2 nmoles substrate utilized/min/mg protein (normal reference, 13-24 nmoles substrate utilized/min/mg protein). Since then she has improved gradually but remains small and thin with atrophic muscles. Although her gait is normal she has difficulty running. A finger-to-nose test reveals a fine tremor and mild dysmetria. Additional neurological symptoms include a language delay, difficulty with expressive language and slight mental retardation. Despite a normal retinogram, she also has a severe visual deficit. At age 12, her red blood cells retained macrocytic indices (Table 1). She weighs 21 kg (<3rd percentile) and is 117 cm tall (<3rd percentile). Her brain MRI scan remains normal, while MRS reveals a lactate peak (data not shown).

Methods

Genetic studies.

The human subject ethics committee from the University of Florence approved the study, and the parents provided informed consent. Targeted exome sequencing of mitochondrial and nuclear DNA was performed on a patient DNA sample as previously described.⁴ Allele-specific oligonucleotide hybridization (ASO) was used to verify the mutation in the patient and her family members.⁶ qRT-PCR was used to quantify the steady state level of mutant *SFXN4* mRNA isolated from the patient's primary fibroblasts (see on-line *Supplemental Methods Appendix*).

Analysis of patient's mitochondrial respiratory function.

The function of respiratory chain components and citrate synthase from the patient were assayed relative to a standard control (see *Supplemental Methods Appendix*).

Cellular localization studies.

Transiently transfected Cos7 cells were fractionated into mitochondrial and cytoplasmic fractions. Lysates from subcellular fractionation and whole cells were assayed for FLAG-epitope tagged *SFXN4* by both Western and immunofluorescence assays (see *Supplemental Methods Appendix*).

Zebrafish modeling.

Two antisense splice blocking morpholinos⁶ were designed to knockdown *sfxn4* in wild-type (AB) and transgenic, *Tg(globin-LCR:eGFP)* zebrafish.⁷ Knockdown of *sfxn4* in morphant zebrafish embryos was confirmed with qRT-PCR. Flow cytometry was used to quantify and collect erythrocytes.⁶ The nuclear and cytoplasmic area of collected red blood cells were determined using a researcher-coded software (see *Supplemental Methods Appendix*). The functional homology between human and zebrafish *SFXN4* was verified using respiratory chain assays on plasmid transfected fibroblasts from the patient (see *Supplemental Methods Appendix*). Zebrafish studies were conducted with the approval of the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) at Boston Children's Hospital.

Statistical analysis.

All data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM) for three independent experiments unless otherwise indicated. Statistical significance was tested

using Student's T-test (<http://studentsttest.com>) unless otherwise indicated. A p-value of <0.05 was considered as statistically significant.

Results

Clinical and metabolic investigation

Hematological blood measurements reveal significantly decreased red blood cell counts. Red blood cell size is highly variable with an average that is slightly larger than normal (Table 1). Consistent with megaloblastic anemia, peripheral blood smears reveal hypersegmented neutrophils, as well as erythroid macrocytes that are larger than the lymphocytes (Figure 1A). Her vitamin B₁₂ and folate levels, however, are within the normal range, and homocysteine and methylmalonic acid levels are undetectable, eliminating a vitamin deficiency as the cause of the disease.

The mitochondriopathy was analyzed using the patient's fibroblasts. Proband fibroblasts showed a severe reduction relative to control of complex I (37%) and complex I+III (7%) activity, as well as a slight reduction of the mitochondrial mass indices, complex II (70%) and citrate synthase (71%) (activities normalized to mg-protein contents and expressed as percent of controls) (complex I+III, Figure 1B; complex I, complex II and citrate synthase, Supplemental Figure 1A).

Recessive *SFXN4* mutation in proband

Whole-exome sequencing of a DNA sample from the patient revealed a single nucleotide deletion in *SFXN4* (c.233delC) (Supplemental Figure 1B). Bioinformatic analysis predicted that the mutation would introduce a frame shift and a premature stop codon (p.Pro78Leufs*25). While the wild type *SFXN4* protein is predicted to be a 337 amino acid protein containing 5 transmembrane domains, the mutant protein, if expressed, would be severely truncated: consisting of a short N-terminal peptide lacking all of the putative transmembrane domains (Figure 1C).

To determine whether the mutant protein is expressed we assessed the steady state level of *SFXN4* mRNA in patient fibroblasts. qRT-PCR showed a 92% reduction in *SFXN4* expression, consistent with nonsense-mediated decay of the mutant transcript ($p < 0.0005$) (Figure 1D). Thus, the significant reduction in *SFXN4* steady state mRNA taken together with the severely truncated mutant protein indicated that the c.233delC mutation results in a loss-of-function phenotype.

***SFXN4* targets the mitochondria**

To determine the subcellular localization of SFXN4, we transfected Cos7 cells with FLAG-tagged *SFXN4* constructs and separated lysed cells into mitochondrial and cytosolic fractions. Western blotting of the fractions revealed that both zebrafish and human SFXN4 proteins efficiently target to the mitochondria (Figure 1E). To verify our western analysis, we analyzed transfected cells by confocal immunofluorescence microscopy (IFA) using Hsp60, a known mitochondrial protein. IFA confirmed the mitochondrial co-localization of FLAG-SFXN4 (fluorescein, green) with mitochondrial Hsp60 (Texas red) (Figure 1F).

We next sought to determine the sub-mitochondrial localization of SFXN4. We isolated mitochondria from HeLa cells expressing FLAG-SFXN4 and treated mitochondria with trypsin, which degrades the mitochondrial outer membrane. After trypsin digestion, both FLAG-SFXN4 and Tim23, a known inner-membrane protein, were protected; conversely, Tom20, an outer-membrane protein, was degraded by the protease (Figure 1G, lane 2). In a complementary experiment, we hypotonically ruptured the mitochondrial outer membrane and found that FLAG-SFXN4 and Tim23 are sensitive to proteolysis, whereas Mortalin, an inner-membrane matrix protein, is

protected from proteolysis (lane 3). These results indicate that SFXN4 localizes to mitochondrial inner membrane.

Mendelian segregation of mutant allele

To confirm our sequencing results and determine the inheritance pattern of the c.233delC mutation, we designed allele-specific oligonucleotides (ASO) that hybridize with either the normal or mutant *SFXN4* alleles. Genotyping of our index patient and 3 generations of her nuclear family revealed that the mutant allele is inherited in an autosomal recessive manner, consistent with the fact that SFXN4 is nuclear-encoded (Figure 1H).

Knockdown of *sfxn4* in zebrafish models disease

To model the macrocytic anemia observed in the index patient *in vivo*, we used zebrafish, an excellent model for hematopoietic disorders.⁵ Using morpholino antisense oligos (MO)⁶ that target *sfxn4* pre-mRNA, we induced a loss-of-function phenotype in zebrafish embryos (hereafter, referred to as “morphants”). A non-targeting MO was used as a control. Morpholino-mediated knockdown of *sfxn4* in zebrafish embryos results a gross reduction in the population of hemoglobinized cells, as indicated by *o*-dianisidine staining (Figure 2A, upper panel). To quantify this reduction, *sfxn4* was knocked-down in transgenic *Tg(globin-LCR:eGFP)* zebrafish, which express GFP under the regulation of the *globin-LCR* promoter (Figure 2A, middle panel).⁷ FACS analysis revealed that *sfxn4* morphants have a 65% reduction of GFP⁺ red cells relative to those injected with the control MO (MO1: Figure 2A-B, center; MO2: Supplemental Figure 2). Additionally, *sfxn4* morphant embryos exhibit erythrocytes with enlarged nuclei containing open chromatin (mature teleost erythrocytes are nucleated),

characteristic features of the blockage in DNA synthesis observed in megaloblastic anemias (Figure 2A, lower panel). Quantification of the nuclear:cytoplasmic ratio of control MO vs. *sfxn4* MO red cells showed that red blood cells from *sfxn4* morphant fish exhibit nearly a three-fold increase in the ratio of nuclear to cytoplasmic size (Figure 2C). qRT-PCR confirmed the efficient knockdown of *sfxn4*, as morphant embryos have <10% *sfxn4* mRNA (Figure 2D, right). In summary, *sfxn4* morphant fish phenocopy the anemia observed in the patient.

Validation of functional homology of vertebrate SFXN4

We validated the functional homology of the human and zebrafish *sfxn4* orthologs using a combination of zebrafish and fibroblast complementation experiments. Zebrafish embryos co-injected with *sfxn4* MO and human or zebrafish *SFXN4* mRNA showed a significant increase in the red cell population relative to embryos injected with *sfxn4* MO alone (Figure 2E). qRT-PCR confirmed the efficient knockdown of the endogenous *sfxn4* mRNA in the animals rescued with human *SFXN4* mRNA: both the morphants and the rescued animals had comparative levels of *sfxn4* mRNA (15% and 13%, respectively) (Supplemental Figure 2B). Similarly, the over-expression of wild type human *SFXN4* rescued the defect of complex I+III (150%) without increasing the mitochondrial mass ($p < 0.05$) (Figure 2F). No clear difference was identified in the level of complex I (data not shown). Transient expression of *Danio sfxn4* increased the activity of complex I+III (80%) (Figure 2F). Transfection of the human c.233delC *SFXN4* construct failed to increase the activity of complex I+III (data not shown). Together, these data demonstrate the conserved role of *SFXN4* in humans and zebrafish.

Discussion

Mitochondrial diseases are multisystem disorders that can be due to mutations either in the mitochondrial DNA (mtDNA) or in over 1,000 nuclear genes encoding mitochondrial proteins. Diagnosis is a challenge and often requires a multidisciplinary approach. Recent advances in next-generation targeted exome sequencing have proven powerful tools in the genetic diagnosis of these rare and clinically heterogeneous recessive disorders.⁴

Here, we describe the first mutation in *SFXN4*, c.233delC, by MitoExome sequencing in a patient with infantile macrocytic anemia, in addition to the growth, neurological and muscular symptoms of a mitochondrial deficit. The mutation likely arose via a CpG mechanism, with spontaneous deamination of methylcytosine to thymidine, followed by a failure in correction of the excised apurinic site, resulting in a single nucleotide deletion.⁸

We suggest that the c.233delC homozygous mutation in *SFXN4* in the proband is causative. The mutation leads to nonsense-mediated decay of the mutant mRNA transcript, and—if expressed—the prematurely truncated mutant protein would lack all transmembrane domains. We functionally tested the molecular causality of *SFXN4* by transient transfection in the proband's fibroblasts and knockdown studies in zebrafish embryos. These complementary studies demonstrate that overexpression of human and zebrafish wild-type *SFXN4* rescues the complex I+III respiratory chain defects in proband fibroblasts and the anemia in morphant zebrafish embryos.

Hematologic manifestations of mitochondrial diseases are not unprecedented, and include aplastic, macrocytic, or sideroblastic anemia, leukopenia, neutropenia, thrombocytopenia, or pancytopenia, and they may occur in syndromic or non-

syndromic mitochondrial disorders.⁹ The pathogenic mechanism linking mitochondrial dysfunction and hematological manifestations is poorly understood. Iron metabolism dysfunction could play a central role causes in sideroblastic anemia in the MLASA (myopathy, lactic acidosis, sideroblastic anemia) syndrome¹⁰ and in X-linked sideroblastic anemia due to defects in *ALAS2*,¹¹ whereas a toxic iron overload is generated in the GRACILE (growth retardation, aminoaciduria, cholestasis, iron overload, lactic acidosis, and early death) syndrome.¹² Also, defects in mitochondrial glutaredoxin 5 (*GLRX5*), required for mitochondrial Fe/S cluster biogenesis, also result in sideroblastic anemia.^{13,14} Additional examples of mitochondrial diseases with hematological manifestations have been recently reviewed (*SLC19A2*, *SLC25A38*, *PUS1*, *ABCB7*, *GLRX5* and mtDNA del).¹⁵

While the function *SFXN4* has yet to be characterized, it is part of a superfamily of predicted mitochondrial transmembrane proteins, presumably transporters. The founding family member, *Sfxn1*, was first reported to be mutated in the *flexed-tail* mouse mutant with sideroblastic anemia.¹⁶ However, others have subsequently reported that the defect in *flexed-tail* mice is in the transcription factor *Smad5*, rather than *Sfxn1*.¹⁷ The controversy surrounding *Sfxn1* remains unresolved. Additionally there is information to suggested that *Sfxn5* (also known as *BBG-TCC*) can function as a mitochondrial citrate exchanger.¹⁸

Although there is no published information on *SFXN4* and a paucity of information regarding the function of other sideroflexin superfamily members, we can speculate that *SFXN4* functions as a transporter because it locates to the inner mitochondrial membrane. Furthermore, the functional conservation of *SFXN4* in vertebrates suggests that it is a critical gatekeeper maintaining mitochondrial homeostasis. Because the patient has a severe combined deficiency of activity in

complex I and complexes I+III, it is possible that SFXN4 plays a direct or indirect role in the coordinated function or assembly of the two respiratory complexes. In fact, combined defects of complex I and III were previously described in patients with mutations in cytochrome b (*MTCYB*), a protein essential for the assembly and function of complex III that, together with cytochrome c1 and the Rieske iron–sulfur protein, forms the catalytic core of the enzyme.^{19,20} Studies of human and mouse cells lines carrying mutations in *MTCYB* demonstrated the interdependence of the two enzymes and showed how a defect of complex I can be secondary to defective function or assembly of complex III.²¹ Isolated complex I deficiency has been also described in the thiamine-responsive megaloblastic anemia due mutations of the solute transmembrane carrier SLC19A2 and manifesting with the Rogers Triad of, megaloblastic anemia, deafness and diabetes. However, it is not clear if the biochemical defect is secondary to the pyruvate dehydrogenase complex (PDHC) deficiency or directly linked to the protein defect.²² Ultimately, future studies are needed to identify the functional substrate of SFXN4.

Although the mechanism of disease remains elusive, it is clear that mutations in SFXN4 are exceedingly rare. We were unable to find the c.233delC mutation in either the 1000 Genomes (www.1000genomes.org), or the dbSNP (build 137) (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP) databases. Furthermore, there are no listed mutations in the exonic regions of SFXN4 listed in the dbSNP database. Interestingly, genome wide association studies (GWAS) have yet to link mutations in SFXN4 with hematologic disease.²³⁻²⁵ These data suggest that indicating that the c.233delC allele is likely a private mutation.

The identification of this rare mutation in an uncharacterized gene, and *in vivo* functional validation illustrates the power of coupling targeted-exome sequencing with

the zebrafish model to rapidly model disease. Our studies demonstrate that SFXN4 should be added to the list of proteins required for mitochondrial homeostasis and hematopoiesis.

Acknowledgments

We thank members of our respective labs (Dr. Jacky Chung) and Drs. [Samuel E. Lux, Frank Bunn, David G. Nathan, and Ellis J. Neufeld for critical feedback on the manuscript. We thank Dr. Leonard Zon for the *Tg(globin LCR:eGFP)* transgenic line, Dr. Karin Hoffmeister for use of the FACS machine, and Christian Lawrence and his team for the zebrafish husbandry. This work was supported by grants from the American Heart Association (J.D.C.), Cooley's Anemia Foundation (C.C., D.I.S.), the March of Dimes Foundation (6-FY09-289, B.H.P.), Brazilian CAPES and FAPESP Foundations (D.S.B.), and the National Institutes of Health (K01 DK085217, D.I.S.; T32 HL007574, Y.Y.Y.; R01 DK070838 and P01 HL032262, B.H.P.).

Author Contributions. G.J.H-S., J.D.C., B.H.P., C.G., D.S.B., Y.Y.Y., and S.D. designed the studies, performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. N.M. and C.M.K. performed and analyzed the sub-mitochondrial localization of *Sfxn4*. C.C. and D.I.S. performed the western and qRT-PCR analyses. S.E.C. and V.K.M. performed and analyzed the exome sequencing. J.N.T. and J.E.I. wrote the software for quantifying the nuclear:cytoplasmic ratio. M.L.F. analyzed the GWAS database for potential SNPs in the *SFXN4* locus. H.O.A. performed the mitochondrial respiratory assays. M.A.D. clinically followed and collected the genomic DNA from the proband and her family members.

Author Information. The authors declare no competing financial interests. Correspondence and requests for materials should be addressed to B.H.P. (bpaw@rics.bwh.harvard.edu).

Figure Legends

Figure 1. A genetic deficiency of *SFXN4* results in macrocytic anemia and mitochondriopathy. Panel A. Peripheral blood smears from the affected proband reveals hypersegmented neutrophils (left, arrow) and erythroid macrocytosis (right, arrow heads). Panel B. Respiratory chain defect in primary fibroblasts from the affected proband compared to control fibroblasts. Panel C. A schematic representation of the normal *SFXN4* protein is shown with the predicted multi-spanning transmembrane domains (top, highlighted in yellow). The c.233delC mutation in the proband results in a frame shift (bottom, highlighted in pink) and eventual nonsense mutation at amino acid residue 102. Panel D. qRT-PCR analysis from control and proband fibroblasts reveals markedly decreased steady-state *SFXN4* mRNA when normalized to *GAPDH*, consistent with non-sense mediated mRNA decay; * $p < 0.0005$. Panel E. FLAG-tagged *SFXN4* from human and zebrafish localizes to the mitochondrial compartment in transiently transfected Cos7 cells, analyzed by western blotting with anti-FLAG antibody (lane 1: mock transfection, lane 2: human *SFXN4*, lane 3: zebrafish *sfxn4*). Lysate refers to total cellular lysate, and mito and cytosolic refer to fractionated sub-cellular fractions. Normalization was achieved with anti-Hsp60 (total and mitochondria) and anti-GAPDH (cytosolic) antibodies. Panel F. Confocal immunofluorescence microscopy confirms the co-localization of *SFXN4* with the mitochondrial resident protein, Hsp60 (yellow, merged panel). FLAG-*SFXN4* (fluorescein, green), mitochondrial hsp60 (Texas red) and DAPI-stained nuclei (blue). Panel G. FLAG-*SFXN4* localizes to the inner mitochondrial membrane in transfected HeLa cells after trypsin digestion (lane 2). Tim23, an inner-membrane protein, was protected from trypsin digestion, whereas Tom20, an outer-membrane protein was degraded (lane 2). Rupturing of the mitochondrial inner membrane by hypotonic

treatment showed that FLAG-SFXN4 and Tim23 are sensitive to proteolysis, whereas Mortalin, a matrix protein is protected (lane 3). Panel H. A Mendelian recessive inheritance segregation pattern is demonstrated in the proband's (arrow) nuclear family by the allele-specific oligonucleotide hybridization with the normal (top) or mutant c.233delC (bottom) ³²P-labeled oligo probes. Control, GM00536A healthy male.

Figure 2. SFXN4 is functionally conserved across vertebrate species in both erythropoiesis and mitochondrial respiration. Panel A. Phenotypic characterization of control and zebrafish morphants for *sfxn4*. *Sfxn4* morphants show a defect in hemoglobinization (brown color) when stained with *o*-dianisidine (upper panel). The anemia in *sfxn4* morphants is evident by the reduction of GFP⁺ erythroid cells in the *Tg(globin-LCR:eGFP)* transgenic zebrafish reporter line (middle panel). Cytospins of flow-sorted erythroid cells from control (left) and *sfxn4* morphant (right) reveal large nuclei with non-condensed chromatin in the latter (lower panel). Enlarged magnifications of individual cells (arrow) are shown in the insets. Panel B. Flow cytometry of the *Tg(globin LCR:eGFP)* transgenic line quantifies the anemia in *sfxn4* morphants using a splice-blocking morpholino (**P<0.0005). Panel C. Enumeration of the ratio of nuclear:cytoplasmic area shows: control, 0.56 ± 0.04; morphant, 1.37 ± 0.08; *** p <0.0005, t-test, where n>250 cells analyzed for each condition (left graph). Panel D. qRT-PCR analysis from control and morphant embryos reveals a marked reduction on steady-state *sfxn4* mRNA level when normalized to *hprt* (right graph) (**P<0.0005). Panel E. Normal *SFXN4* cRNA from either zebrafish or human partially complements the anemia in morphant embryos (**P<0.005, *P<0.05). Panel F. Normal *SFXN4* cDNA from zebrafish and human complements the respiratory chain defects from proband's primary fibroblasts (ANOVA, *P<0.05). Respiratory chain

activities for Complex I and III were compared to mock transfected (empty vector) sample.

Table 1.

	Normal Values (mean)	Affected Individual
WBC (/μL)	4.5-13.5×10 ³ *	5.39×10 ³
Neutrophils	54%*	63.2%
Monocytes	4%*	5.3%
Eosinophils	2%*	1.4%
Basophils	0.6%*	0.2%
Lymphocytes	38%*	27.5%
Platelets (/nL)	140-440	370
RBC (10¹²/liter)	3.7-5.3	2.95
Hemoglobin (g/dL)	10.5-15.0	11.3
Hematocrit (%)	33-39	33.1
MCV (fl)	70-86	100.9
MCH (pg)	23-31	31.8
MCHC (g/dL)	30-36	32.6
RDW (%)	12.6-14.0 [†]	23.7
Vitamin B12 (ng/L)	168-1116*	569
Folic acid (nmol/L)	4.1-21.2	7.4
Homocysteine	0	0
Methylmalonic acid	0	0

*Age 13 (Blood principals and practice of hematology Handin, Lux and Stossel)

[†]Novak RW Red Blood Cell Distribution Width in Pediatric Microcytic Anemias.

References

1. Aslinia F, Mazza JJ, Yale SH. Megaloblastic anemia and other causes of macrocytosis. *Clin Med Res* 2006;4:236-41.
2. Whitehead VM. Acquired and inherited disorders of cobalamin and folate in children. *Br J Haematol* 2006:125-36.
3. Nyhan WL. Disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Mol Genet Metab* 2005;86:25-33.
4. Calvo SE, Compton AG, Hershman SG, et al. Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing. *Sci Transl Med* 2012;4:118ra10.
5. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 2007:353-67.
6. Cooney JD, Hildick-Smith GJ, Shafizadeh E, et al. Zebrafish growth factor independence transcription factors offer a comparative paradigm for regulating primitive and definitive hematopoietic lineages. *Dev Biol* 2013;373:431-41.
7. Ganis JJ, Hsia N, Trompouki E, et al. Zebrafish globin switching occurs in two developmental stages and is controlled by the LCR. *Dev Biol* 2012;366:185-94.
8. Kunkel TA. Misalignment-mediated DNA synthesis errors. *Biochemistry* 1990;29:8003-11.
9. Finsterer J. Hematological manifestations of primary mitochondrial disorders. *Acta Haematol.* 2007 S. Karger AG, Basel; 2007:88-98.
10. Riley LG, Cooper S, Hickey P, et al. Mutation of the mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase gene, YARS2, causes myopathy, lactic acidosis, and sideroblastic anemia--MLASA syndrome. *Am J Hum Genet* 2010:52-9.
11. Cotter PD, Rucknagel DL, Bishop DF. X-linked sideroblastic anemia: identification of the mutation in the erythroid-specific delta-aminolevulinate synthase gene (ALAS2) in the original family described by Cooley. *Blood* 1994;84:3915-24.
12. Fellman V. The GRACILE syndrome, a neonatal lethal metabolic disorder with iron overload. *Blood Cells Mol Dis* 2002:444-50.
13. Ye H, Jeong SY, Ghosh MC, et al. Glutaredoxin 5 deficiency causes sideroblastic anemia by specifically impairing heme biosynthesis and depleting cytosolic iron in human erythroblasts. *J Clin Invest* 2010;120:1749-61.
14. Wingert RA, Galloway JL, Barut B, et al. Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* 2005;436:1035-39.
15. Bergmann AK, Campagna DR, McLoughlin EM, et al. Systematic molecular genetic analysis of congenital sideroblastic anemia: evidence for genetic heterogeneity and identification of novel mutations. *Pediatr Blood Cancer* 2010;54:273-8.
16. Fleming MD, Campagna DR, Haslett JN, Trenor CC, 3rd, Andrews NC. A mutation in a mitochondrial transmembrane protein is responsible for the pleiotropic hematological and skeletal phenotype of flexed-tail (f/f) mice. *Genes Dev* 2001;15:652-7.
17. Hegde S, Lenox LE, Lariviere A, et al. An intronic sequence mutated in flexed-tail mice regulates splicing of Smad5. *Mamm Genome* 2007;18:852-60.
18. Miyake S-i, Yamashita T, Taniguchi M, Tamatani M, Sato K, Tohyama M. Identification and characterization of a novel mitochondrial tricarboxylate carrier. *Biochem Biophys Res Comm* 2002;295:463-8.
19. Emmanuele V, Sotiriou E, Rios PG, et al. A novel mutation in the mitochondrial DNA cytochrome b gene (MTCYB) in a patient with mitochondrial

- encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes syndrome. *J Child Neurol* 2013;235-42.
20. Lamantea E, Carrara F, Mariotti C, Morandi L, Tiranti V, Zeviani M. A novel nonsense mutation (Q352X) in the mitochondrial cytochrome b gene associated with a combined deficiency of complexes I and III. *Neuromuscul Disord* 2002;49-52.
21. Acin-Perez R, Bayona-Bafaluy MP, Fernandez-Silva P, et al. Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol Cell* 2004;805-15.
22. Scharfe C, Hauschild M, Klopstock T, et al. A novel mutation in the thiamine responsive megaloblastic anaemia gene SLC19A2 in a patient with deficiency of respiratory chain complex I. *J Med Genet* 2000;37:669-73.
23. Soranzo N, Spector TD, Mangino M, et al. A genome-wide meta-analysis identifies 22 loci associated with eight hematological parameters in the HaemGen consortium. *Nat Genet* 2009;1182-90.
24. Ganesh SK, Zakai NA, van Rooij FJ, et al. Multiple loci influence erythrocyte phenotypes in the CHARGE Consortium. *Nat Genet* 2009;1191-8.
25. Van der Harst P, Zhang W, Mateo Leach I, et al. Seventy-five genetic loci influencing the human red blood cell. *Nature* 2012;369-75.

Fig. 1

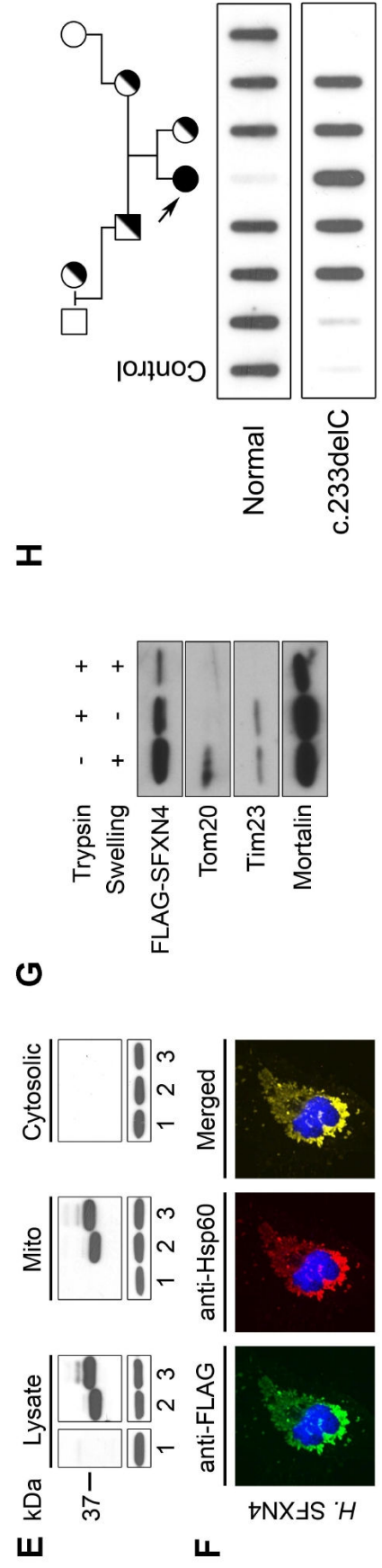
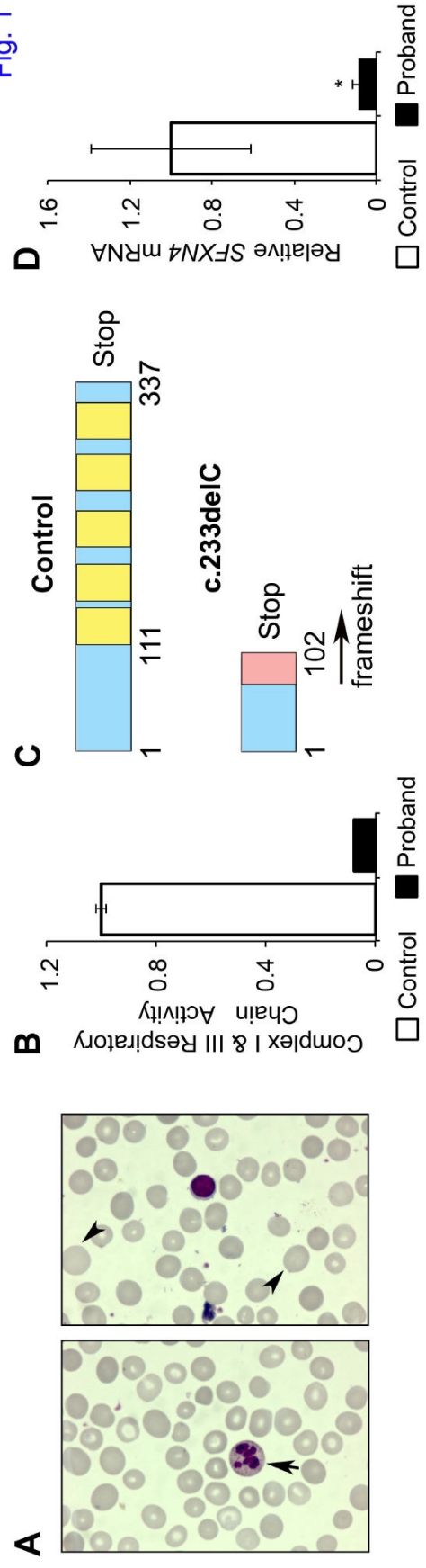
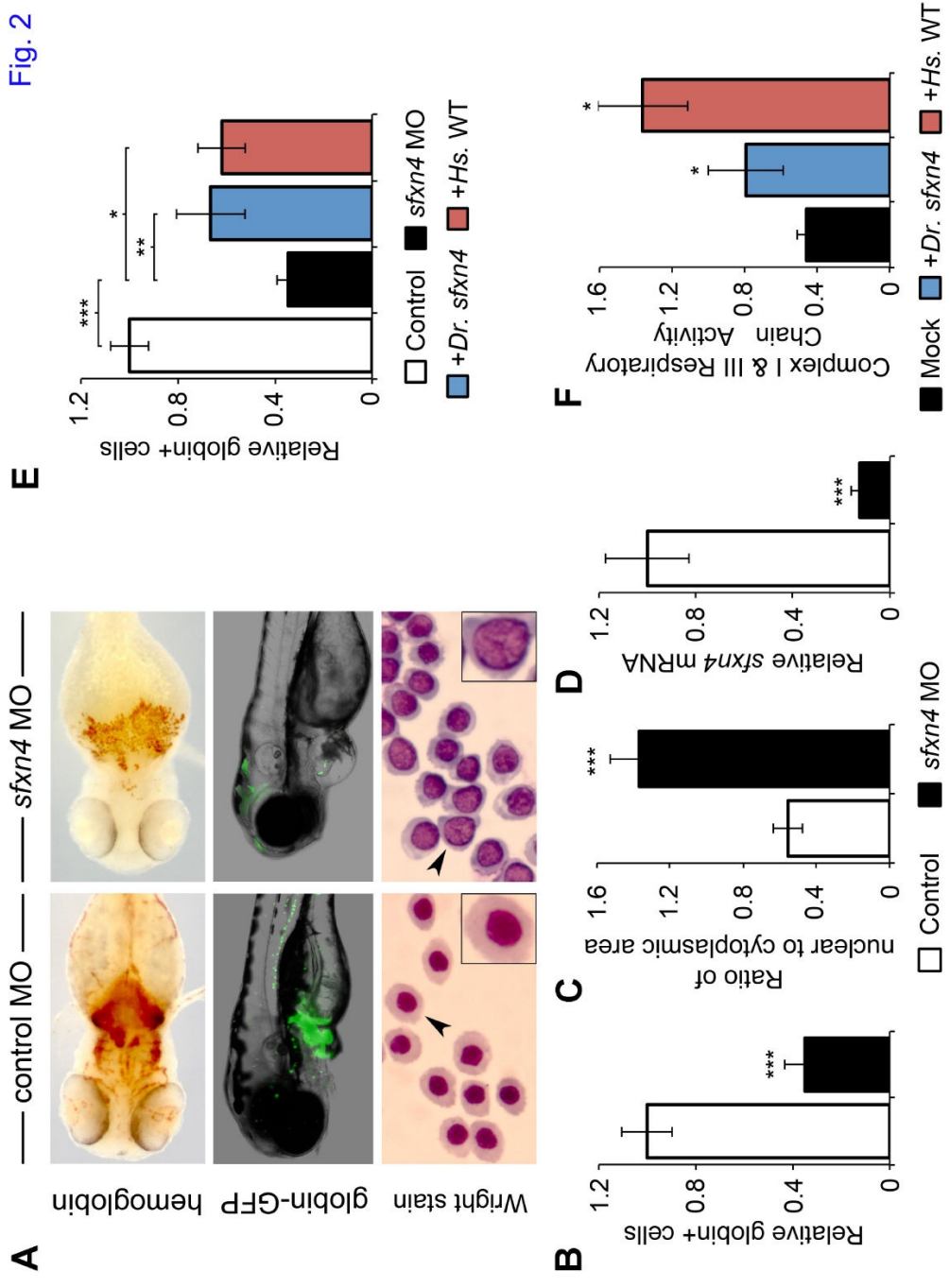
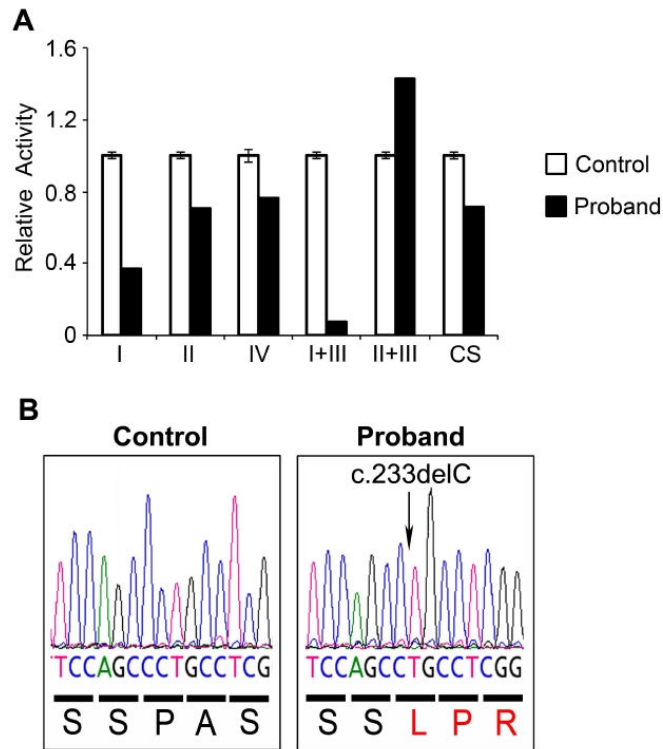
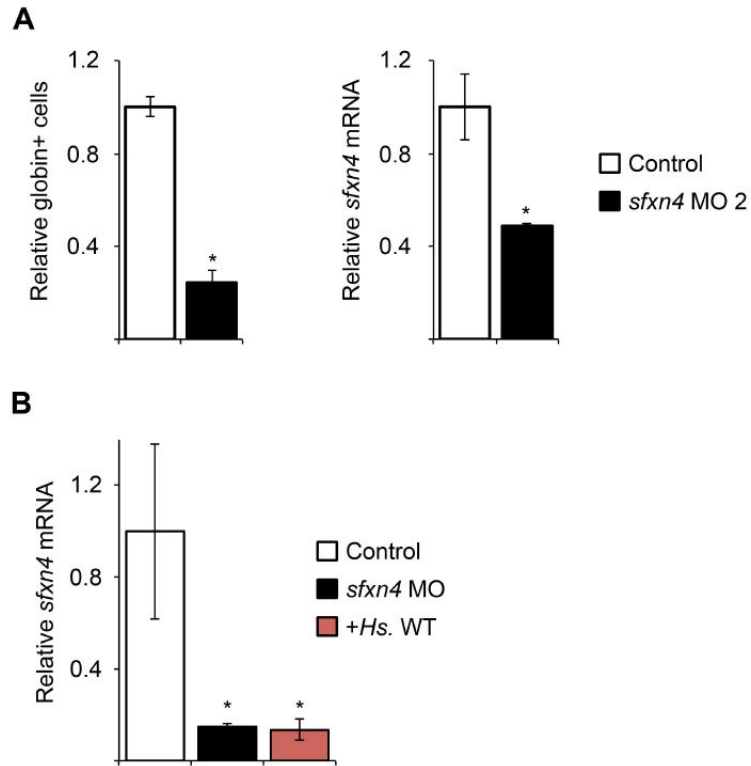


Fig. 2





Supplemental Figure S1. Panel A. Primary fibroblasts for affected proband exhibit global respiratory chain defects when compared to control fibroblasts. Panel B. Targeted-exome sequencing reveals a single nucleotide deletion (c.233delC) in the *SFXN4* cDNA from the proband (right) compared to control (left). Below left, normal amino acid sequence is displayed; below right, mutation causes a frameshift.



Supplemental Figure S2. Panel A. Alternate morpholino (MO2) knockdown of *sfxn4* in zebrafish produces the same anemic phenotype. Flow cytometry of the *Tg(globin LCR:eGFP)* line quantifies the anemia, 25% of normal, in *sfxn4* morphants using splice-blocking morpholino (MO2) (left panel). MO2 selectively targets *sfxn4* mRNA. qRT-PCR reveals that steady state *sfxn4* mRNA levels are reduced are 45% of normal when normalized to *hprt* (right panel); * $p < 0.05$. Panel B. qRT-PCR demonstrates that *sfxn4* expression is effectively silenced in both morphant (*sfxn4* MO) and morphant embryos rescued with human *SFXN4* cRNA (+Hs. WT). Expression of the endogenous zebrafish *sfxn4* mRNA is reduced to 15% in both the morphants and the morphants that are rescued with human *SFXN4* cRNA; * $p < 0.05$.

