



UNICAMP

# O PAPEL DA ANKHD1 NA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS

Cunha, D.P.; Baratti, M.O.; Borges, L.; Bigarella, C.L.; Salles, T.S.I.; Traina, F.; Rodrigues, P.; Saad, S.T.O

Departamento de Clínica Médica, Hemocentro, UNICAMP, São Paulo

## INTRODUÇÃO

O Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro identificou uma proteína denominada ANKHD1 (Ankyrin Repeat Single KH Domain containing 1) que apresenta significativa homologia com a proteína Mask (Multiple Ankyrin repeat and single KH domain), presente na *Drosophila Melanogaster*. O gene da ANKHD1 encontra-se no cromossomo 5 (banda 5q31.3) e possui 34 exons. Esta proteína é constituída de 2542 aminoácidos, com peso molecular de 270 kDa; possui 20 repetições de anquirina, distribuídas em 5 blocos de 4 repetições, e um domínio KH (K homology domain) na região C-terminal. A expressão ANKHD1 se apresenta elevada em células leucêmicas quando comparadas às células hematopoiéticas normais. Expressão da ANKHD1 também foi observada em tecidos humanos normais como rim, baço, estômago, intestino delgado, músculos esqueléticos, fígado, pulmão e linfonodos. Investigando aspectos funcionais da ANKHD1 observou-se que ela está associada à SHP2 em linhagem celular de leucemia mielóide crônica em fase blástica (K562), e adenocarcinoma de próstata. Observou-se também que a ANKHD1 encontra-se fosforilada em serina em células leucêmicas, mas não em células hematopoiéticas normais. A inibição de ANKHD1, por RNAi, resulta na ativação da apoptose, sugerindo que ANKHD1 desempenha uma função anti- apoptótica nas células leucêmicas.

## OBJETIVO

Investigar a participação da ANKHD1 na sinalização da proliferação de linfócitos normais através da medida da expressão gênica e protéica da ANKHD1 em linfócitos normais ativado e não ativado.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cultura de células e ativação

Células mononucleares do sangue periférico foram obtidas a partir de cremes leucocitários de bolsas de coleta de sangue obtidas pelo sistema top-bottom, de doadores saudáveis. O creme leucocitário foi centrifugado num gradiente de Ficoll-Hypaque. O botão de células foi ressuspenso em meio de cultura RPMI suplementado com plasma AB a 3%. A verificação da quantidade e viabilidade das células foi realizada através de câmara de "Neubauer" com corante azul de trypan.

A concentração das células foi ajustada para  $2 \times 10^6$  células/ml e distribuída em garrafinhas T75 de cultura de células. As células foram incubadas com fitohematoglutina e grupo controle sem fitohematoglutina por períodos de 24, 48 e 72 horas para extração de RNA e de proteína.

### PCR em tempo real

O RNA total foi extraído dos linfócitos ativado e não ativado com fitohematoglutina nos tempos T= 24h, T= 48h e T= 72h utilizando o reagente de TRIZOL. As amostras contendo 1 µg de RNA foram transcritas reversamente em cDNA. A Amplificação em tempo real foi realizada no ABI 5700 Sequence Detector System (Applied Biosystems) utilizando-se SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). Um controle negativo, sem adição de cDNA, foi realizado para cada par de iniciadores. A expressão da β-actina foi utilizada como controle endógeno.

### Eletoforese e Western Blotting

Do precipitado celular de linfócitos ativado e não ativado com fitohematoglutina nos tempos T= 48h e T= 72h foi obtido extrato protéico. 100µg de proteína foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 8%-SDS-PAGE. Os anticorpos primários utilizados foram anti-ANKHD1 e anti-actina. Para os anticorpos secundário, utilizou-se anti-rabbit para ANKHD1 e anti-goat HRT para actina. O ensaio foi revelado por ECL.

## RESULTADOS

O estudo através de RT-PCR em tempo real revelou aumento da expressão gênica de ANKHD1 no transcorrer do tempo em linfócitos normais ativado com fitohematoglutina, quando comparada com os linfócitos controle, não ativado (Figura 1).

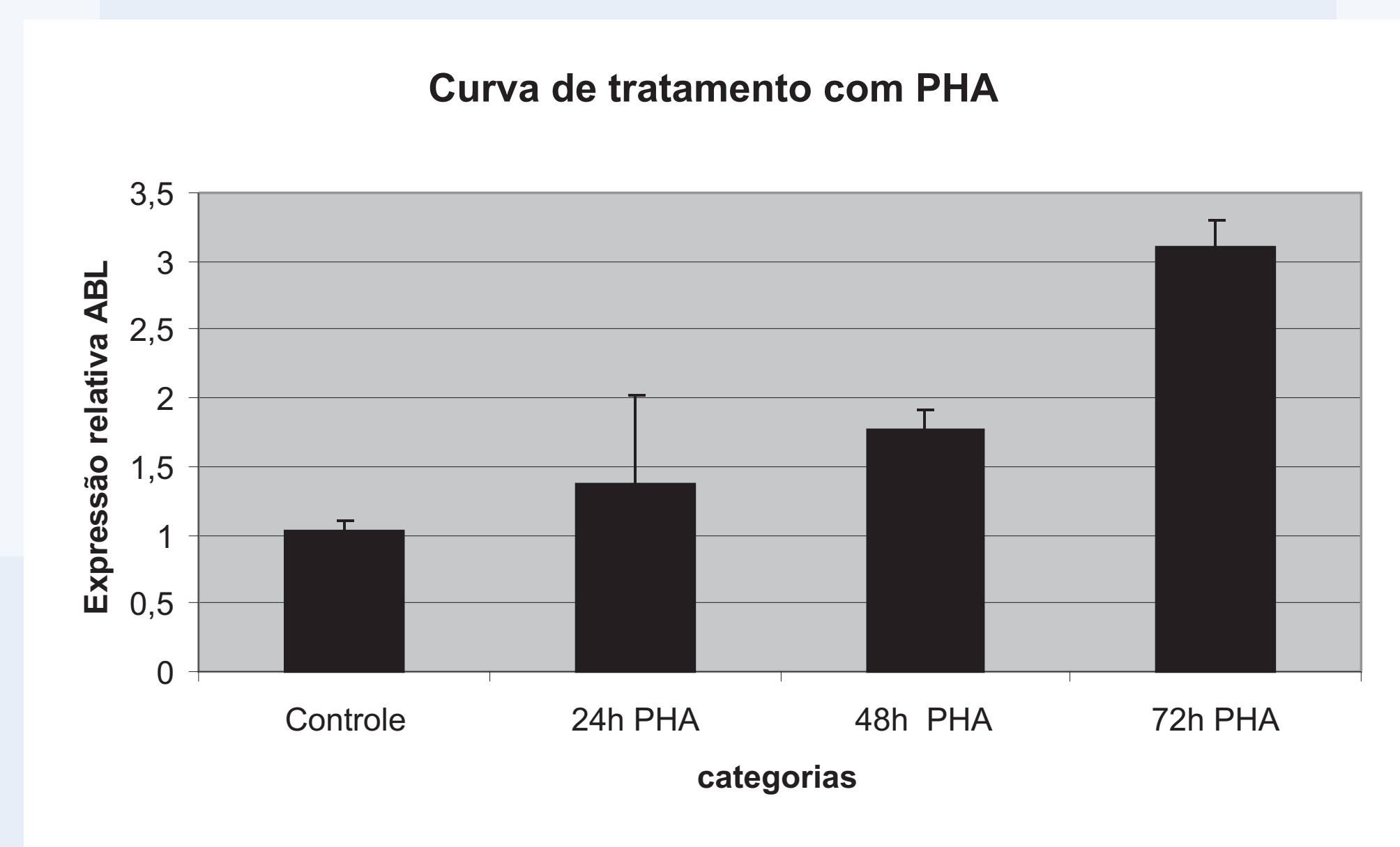


Figura 1: Expressão gênica da ANKHD1 em linfócitos normais estimulado com PHA. RT-PCR em tempo real foi realizado a partir de cDNA de linfócitos ativado e um controle. O eixo "y" representa a intensidade relativa de expressão de RNA de ANKHD1. Nota-se um aumento progressivo da expressão de RNA de ANKHD1 quando comparamos ao controle (não ativado), e no transcorrer dos tempos T=24h, T=48h e T=72h.

O estudo da expressão da proteína ANKHD1 em linfócitos normais ativado e não ativado com fitohematoglutina através da técnica de Western Blotting revelou uma expressão protéica mais elevada nas células ativado com fitohematoglutina comparado as células controle (não ativado) (Figura 2).

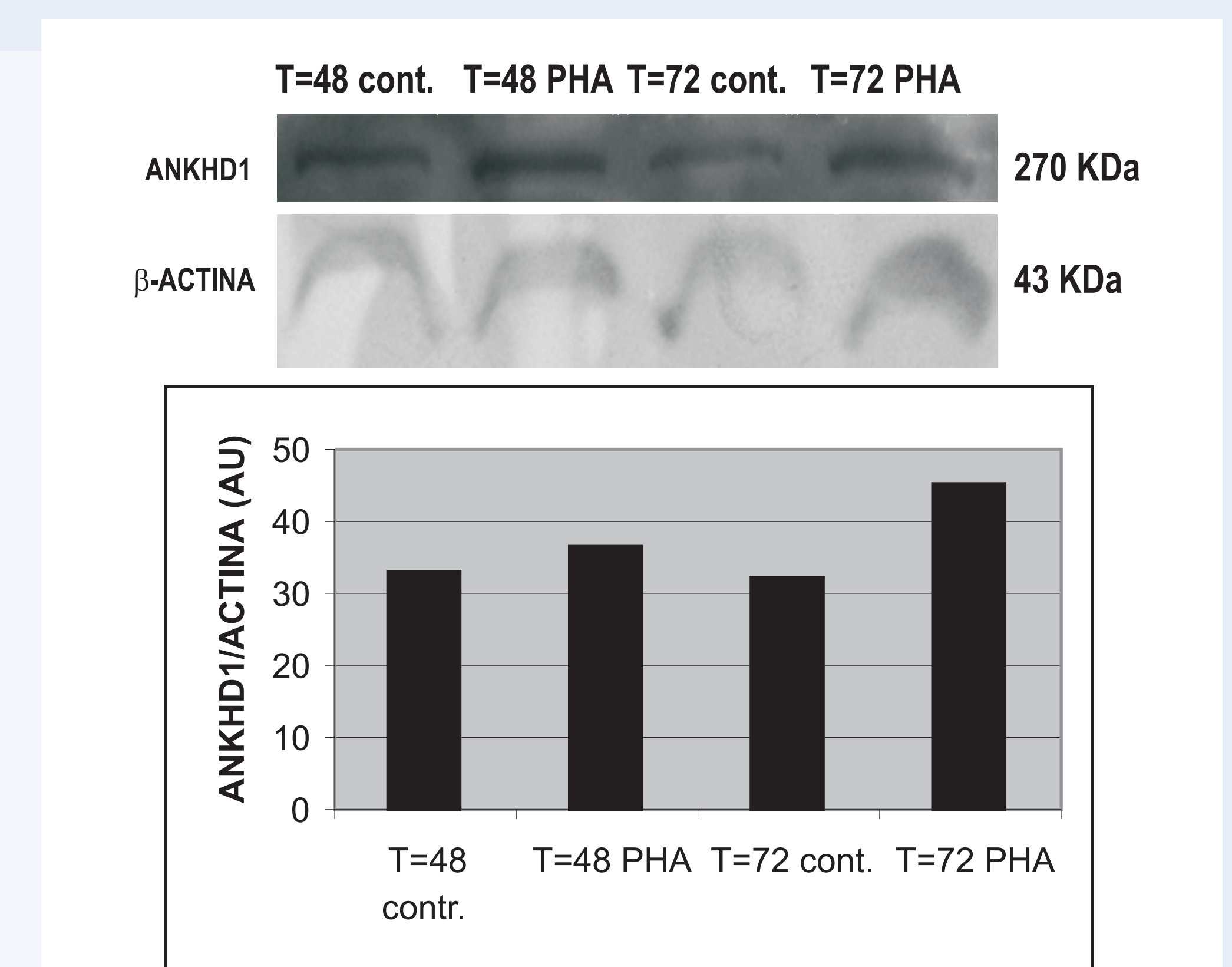


Figura 2: Expressão protéica de ANKHD1 em linfócitos normais ativado e não ativado com fitohematoglutina. Por Western Blotting analisamos a expressão da proteína ANKHD1 (representada por bandas de aproximadamente 270kDa) nos tempos 48h (controle e ativado) e 72h (controle e ativado); O controle da quantidade protéica aplicada no gel foi realizado utilizando-se anticorpo anti-β-actina (43kDa). Podemos notar pela análise da razão entre a intensidade das bandas de ANKHD1 e β-actina, determinado pelo software WCIIF ImageJ, que ocorreu elevação da expressão protéica da ANKHD1 nos linfócitos ativado com PHA.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O presente estudo sugere que a proteína ANKHD1 está envolvida nas vias de sinalização da proliferação de linfócitos normais. De fato, através de RT-PCR em tempo real observamos um aumento da expressão gênica da ANKHD1 nos linfócitos ativado comparado aos normais. Notamos também um aumento de expressão protéica nos linfócitos ativado. Em estudos já planejados pretendemos determinar a possível associação da ANKHD1 com SHP2 em linfócitos, bem como o estado de fosforilação da ANKHD1 em linfócitos estimulado com PHA. Será também determinado o envolvimento de ANKHD1 na apoptose dos linfócitos normais. Assim, em conjunto, os resultados sugerem que a proteína ANKHD1 tem um papel importante nos mecanismos de proliferação de linfócitos.

## REFERÊNCIAS

Traina, F., Favaro, P.M.B., Medina, S. S., Duarte, A.S.S., Winnischofer, S.M.B., Costa, F.F. and Saad, S.T.O. (2006). ANKHD1, ankyrin repeat and KH domain containing 1, is overexpressed in acute leukemias and is associated with SHP2 in K562 cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1762(9): 828-834.

Apoio financeiro: FAPESP CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

