UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ILLY ENNE GOMES PEREIRA

**Consequência funcional da inibição e superexpressão do fator de *splicing* *SF1* em células
de linhagem hematopoiética**

RIBEIRÃO PRETO
2019

ILLY ENNE GOMES PEREIRA

Consequência funcional da inibição e superexpressão do fator de *splicing* *SF1* em células de linhagem hematopoiética

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientadora: Profª Draª Leticia Fröhlich
Archangelo

RIBEIRÃO PRETO
2019

PEREIRA, Illy Enne Gomes. **Consequência funcional da inibição e superexpressão do fator de *splicing SF1* em células de linhagem hematopoiética**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

**A minha mãe por ter sido meu
alicerce em todos os momentos da
minha vida.**

AGRADECIMENTOS

A agência de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP), pela concessão da bolsa de mestrado (Nº 2016/19658-4 vinculado ao Projeto Jovem Pesquisador de Nº 2014/01458-3) e apoio financeiro fundamental para a execução desta pesquisa.

Ao Programa de Biologia Celular e Molecular, pela estrutura dos laboratórios multiusuários e disponibilidade dos laboratórios parceiros, permitindo o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao corpo técnico do Programa, em especial a Tânia, Silvia e Vani, pelo capacitado e experiente apoio.

Ao Laboratório de Citometria do Hemocentro, em especial a Camila e Patrícia, pelo valioso auxílio especializado e ações prestativas.

A equipe da Profª Drª Fabiola Traina, pela colaboração e linhagens celulares cedidas de fundamental importância para a execução da pesquisa realizada. Em especial ao João, pelos conhecimentos e direcionamentos compartilhados.

Aos amigos do Programa, em especial Jackeline, Talita, Marcela, Edismauro, Patrícia e Natália, pelas mais diversas informações trocadas e amizade que se estende além da área de trabalho.

Aos amigos do laboratório 19, Paulo, Rye, Flávia, AnaJú, Mari e Karen, pelo companheirismo e boas conversas, dentro e fora do laboratório, que tornaram a rotina de trabalho mais divertida e menos exaustiva.

Aos amigos do LIMCa, Guilherme, Viviana, Vanessa, Tiago, Vivian e Lucca, como também, Laissa e Péricles, pela ótima receptividade desde o momento da minha chegada e por nossa amizade, cumplicidade, união e momentos de descontração que tornaram meus dias melhores. A Profª Drª Leticia Fröhlich Archangelo, pela confiança em mim depositada ao me aceitar como sua aluna e pelo apoio durante essa caminhada.

A Rosa e Angélica por toda amizade e companheirismo.

Aos familiares e aos grandes amigos, pelo inestimável incentivo, estímulo e compreensão pela minha ausência no dia-a-dia de vocês.

A minha amada mãe, Rosa Gomes, por ser meu exemplo de coragem e resiliência e por toda paciência, afeto e amor incondicional em todos os momentos, principalmente nos mais cansativos e difíceis.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Pereira, Illy Enne Gomes –
Consequência funcional da inibição e superexpressão do fator de *splicing* *SF1* em células de linhagem hematopoiética

Illy Enne Gomes Pereira. Ribeirão Preto: USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2019.

Orientadora: Prof. Dr^a. Leticia Fröhlich Archangelo

Dissertação de Mestrado (Pós-graduação) – Universidade de São Paulo, Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, 2019.

1. SF1. 2. Expressão alterada. 3. Leucemogênese. I. Archangelo, Leticia Fröhlich. II. Universidade de São Paulo. Programa de Biologia Celular e Molecular. Título.

PEREIRA, Illy Enne Gomes. **Consequência funcional da inibição e superexpressão do fator de *splicing* SF1 em células de linhagem hematopoiética**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

RESUMO

A proteína SF1 reconhece as regiões 3' dos íntrons durante os estágios iniciais na formação do spliceossomo, mas não é necessária para o *splicing* constitutivo de todos os pré-mRNA nas células. Assim, SF1 atua como um fator de *splicing* alternativo sobre um sub-conjunto de pré-mRNAs celular. Estudos recentes demonstraram a ocorrência de mutações em SF1 em doenças hematológicas, porém ainda não está caracterizado se estas mutações causam ganho ou perda de função e nenhum estudo demonstrou a consequência funcional da expressão diferencial de SF1 no sistema hematopoiético. Nesse contexto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a consequência funcional da inibição e da superexpressão do fator de *splicing* SF1 em células de linhagem hematopoiética. Células Namalwa foram transduzidas com lentivírus e retrovírus para inibição e superexpressão de SF1 respectivamente. Células eficientemente transduzidas foram selecionadas por puomicina (inibição) ou separadas por FACS (superexpressão) e utilizadas em ensaios funcionais, como apoptose (Anexina V), proliferação (Ki67, MTT) e unidade formadora de colônia, a fim de investigar as possíveis consequências da alteração da expressão de SF1 nesta linhagem. Os resultados obtidos demonstram que em ensaios de formação de colônia, células depletadas ou que superexpressam SF1 (inibição n=1 e superexpressão n=2) formaram menos colônias em relação ao controle. As células que superexpressam SF1 formaram colônias 2 vezes maiores, que as formadas pelas células controles. O ensaio de viabilidade por MTT demonstrou menor viabilidade nas células tanto na condição inibida quanto na superexpressa para SF1 em relação ao controle; porém no ensaio de apoptose e proliferação não houve diferença em relação ao controle. Assim, os dados obtidos indicam que a alteração da expressão de SF1 não desenvolve papel relacionado a função de proliferação e apoptose em células hematopoiéticas; porém, resulta na redução da atividade metabólica, alterando o fenótipo das unidades formadoras de colônia, que apresentam menor número em consequência da redução da viabilidade e, em contrapartida, o tamanho está aumentando por razões ainda desconhecidas. **Palavras-chave:** SF1. Expressão alterada. Leucemogênese.

PEREIRA, Illy Enne Gomes. **Functional consequence of SF1 inhibition and overexpression in hematopoietic cell line**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

ABSTRACT

SF1 protein recognizes the 3' regions of the introns during the early steps of spliceosome formation, but is not required for the constitutive splicing. Thus, SF1 acts as an alternative splicing factor on a sub-set of cellular pre-mRNAs. Recent studies demonstrated the occurrence of *SF1* mutations in hematological diseases, but it is not yet clear whether these are gain or loss of function mutations and no study has demonstrated the functional consequence of differential expression of SF1 in the hematopoietic system. Therefore, the objective of this research was to evaluate the functional consequence of inhibition and overexpression of the SF1 splicing factor in hematopoietic cell line. Namalwa cells were transduced with lentiviruses and retroviruses for inhibition and overexpression of SF1, respectively. Efficiently transduced cells were puromycin selected (inhibition) or sorted by FACS (overexpression) and used for functional assays such as apoptosis (Annexin V), proliferation (Ki67, MTT) and colony forming unit to investigate the possible consequences of altered SF1 expression in this cell lineage. Our results demonstrate that SF1 depleted or overexpressing cells (inhibition $n = 1$ and $n = 2$ overexpression) formed fewer colonies in relation to the control. Similarly, SF1 overexpressing cells formed colonies 2 times larger than those formed by the control cells. The MTT viability assay demonstrated less viability of both inhibited and SF1 overexpressing cells compared to control. Both apoptosis and proliferation was not affected in the cell with altered *SF1* expression. Thus, our preliminary data indicates that altered SF1 expression does not play role in proliferation and apoptosis of hematopoietic cells; but results in reduced metabolic activity, changing the phenotype of the colony forming units which presents a fewer number as consequence of reduction of viability and, on the other hand, increased size does not has cause known yet. **Keywords:** SF1. Altered expression. Leukemogenesis.

LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

- Figura 01:** Representação esquemática das regiões de reconhecimento do *splicing* no pré-mRNA e dos locais de ligação dos principais fatores de *splicing* responsáveis pela montagem da maquinaria do spliceossomo. **13**
- Figura 02:** Representação esquemática da estrutura de SF1HL1 (a principal variante de SF1 em células HeLa), UHMk1 (KIS) e U2AF⁶⁵. **16**
- Figura 03:** Representação esquemática da posição das mutações na proteína SF1. **18**
- Figura 04:** Expressão de SF1 em células da medula óssea em doadores saudáveis e pacientes. **18**
- Figura 05:** Delineamento experimental das etapas desenvolvidas **33**
- Figura 06:** Avaliação da expressão endógena de SF1 em células aderentes e células de linhagem leucêmica. **35**
- Figura 07:** Ensaios *in vitro* a partir das células das transduzidas com shSF1 e shControl. **38**
- Figura 08:** Ensaio *in vitro* das células transduzidas com MIG-SF1wt e MIG-vazio. **41**
- Figura 09:** Gel de 4% agarose mostrando o anelamento dos oligos *Top* e *Bottom*. **43**
- Figura 10:** Representação gráfica da etapa de clonagem no vetor de entrada MSCV-U3-H1-Stuffer. **44**
- Figura 11:** Gel de 1,5% de agarose mostrando a digestão teste realizados com as enzimas de restrição BamHI e Scal após a ligação do inserto com o vetor de entrada. **44**
- Figura 12:** Gel de 1,5% de agarose mostrando o produto da digestão com as enzimas NotI e Scal realizada no DNA resultante da clonagem do vetor de entrada ligado corretamente ao inserto (Stuffer-shRNA). **45**
- Figura 13:** Representação gráfica da etapa de subclonagem no vetor de expressão MIG (pMSCV-IRES2-EGFP siRNA). **46**

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Anticorpos utilizados para marcação das proteínas e suas respectivas condições de uso.	25
Tabela 02: Tamanho em pares de bases (pb) de cada plasmídeo utilizados para a produção de vetores virais.	27
Tabela 03: Proporção e quantidade dos plasmídeos para transfectar células HEK 293T com pMIG-vazio.	27
Tabela 04: Proporção e quantidade dos plasmídeos para transfectar células HEK 293T com pMIG-SF1WTmyc.	28
Tabela 05: Sequências shRNA utilizadas.	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	<i>SPLICING</i> E MONTAGEM DO SPLICEOSSOMO	12
1.2	FATOR DE <i>SPLICING</i> 1	14
2	OBJETIVOS	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	CULTIVO CELULAR	21
3.2	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE SF1	21
3.2.1	Análise da Expressão Gênica	21
3.2.1.1	Extração de RNA e síntese do DNA complementar (cDNA)	21
3.2.1.2	PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	22
3.2.2	Análise da Expressão Proteica	23
3.3	INIBIÇÃO DE <i>SF1</i> EM LINHAGEM CELULAR LEUCÊMICA.....	25
3.4	SUPEREXPRESSÃO DE <i>SF1</i> EM LINHAGEM CELULAR LEUCÊMICA.....	26
3.4.1	Transfecção em células HEK293T.....	26
3.4.2	Transdução de células de linhagem leucêmica.....	28
3.5	ENSAIOS FUNCIONAIS <i>IN VITRO</i>	28
3.5.1	Ensaio de Apoptose.....	28
3.5.2	Ensaio de Proliferação.....	29
3.5.3	Ensaio de Viabilidade.....	29
3.5.4	Ensaio de Formação de Colônia.....	30
3.6	CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS RETROVIRAIS QUE EXPRESSAM SEQUÊNCIAS INIBITORIAS (shRNA) PARA SF1	30
3.6.1	Oligonucleotídeo.....	30
3.6.2	Anelamento dos oligonucleotídeos.....	30
3.6.3	Clonagem.....	31
3.6.3.1	Clonagem no vetor de entrada.....	31
3.6.3.2	Clonagem no vetor de destino.....	32
4	RESULTADOS.....	34

4.1	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO ENDÓGENA DE SF1 EM CÉLULAS ADERENTES E EM SUSPENSÃO.....	34
4.2	ENSAIOS FUNCIONAIS <i>IN VITRO</i>	36
4.2.1	Células Namalwa silenciadas para SF1.....	36
4.2.2	Células Namalwa superexpressas para SF1.....	39
4.3	CLONAGEM.....	42
4.3.1	Desenho e Produção dos segmentos em dupla fita.....	42
4.3.2	Clonagem do shRNA no vetor de entrada e vetor de expressão.....	43
5	DISCUSSÃO.....	47
	REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

1.1 *SPLICING* E MONTAGEM DO SPLICEOSSOMO

A expressão de genes eucarióticos requer a remoção precisa de sequências intervenientes (introns) e a justaposição dos exons flanqueadores por meio de um processo denominado *splicing* de RNA (Guth and Valcárcel, 2000). Este processo celular ocorre por meio de reações sequenciais de transferência de fosforil, conhecidas como transesterificações, e justaposição de sequências codificadoras (éxons), enquanto o íntron é excisado sob a forma de um “laço”. A maquinaria que catalisa o *splicing* é complexa, consistindo em cinco moléculas adicionais de RNA e até 200 proteínas. Essa deve reconhecer três regiões no pré-mRNA: a região de *splicing* 5' que tem como sequência consenso AGGURAGU (os nucleotídeos invariáveis estão sublinhados) em eucariotos superiores; a região de *splicing* 3' é caracterizada pela sequência YAG e a sequência de ramificação - BPS (*branchpoint sequence*) - do íntron que forma a base do fragmento em laço a ser excisado – altamente conservada em levedura (UACUAAAC) e mais degenerada em eucariotos superiores (apresentando a sequência consenso YNCURAY, onde Y representa uma pirimidina, R uma purina e N é qualquer nucleotídeo). Após estabelecer interações de pareamento de bases específicas, a BPS exhibe o nucleotídeo, geralmente adenosina, que forma uma ligação fosfodiéster 2' – 5' com a extremidade 5' do íntron. O trato de polipirimidina (Py), particularmente importante para o *splicing* em eucariotos superiores, é uma sequência rica em pirimidina localizada imediatamente antes do dinucleotídeo AG na extremidade 3' e logo após a BPS. As pequenas moléculas de RNA (U1, U2, U4, U5 e U6) envolvidas na principal forma de *splicing* do pré-mRNA são conhecidas como snRNAs (pequenos RNAs nucleares, *small nuclear RNAs*); cada uma é complexada com pelo menos sete subunidades proteicas para formar uma snRNP (pequena ribonucleoproteína nuclear, *small nuclear ribonucleoprotein*). As snRNPs formam o cerne do spliceossomo, o grande complexo de moléculas de RNA e proteínas que realiza o *splicing* do pré-mRNA na célula (Figura 01) (AGRAWAL *et. al.*, 2018; revisado em Krämer, 1996; MATERA e WANG, 2014;).

O spliceossomo é montado de modo bastante organizado, começando com a ligação de snRNP1 ao sítio doador de *splicing* (5'SS) na extremidade 5' do intron

seguida pela ligação de SF1 ao BPS e por sua interação com fator auxiliar de *splicing* U2AF (composto pelas subunidades U2AF35 e U2AF65). Esse, por sua vez, está ligado ao segmento de pirimidina e ao sítio aceptor de *splicing* (3'SS) na extremidade 3' do íntron para formar um complexo de início ou E (*early complex*). Logo após, snRNPU2 (formado pelas subunidades SF3a, SF3b e RNA 12S) é recrutado para substituir SF1 e torna-se fortemente associado ao BPS, onde, por meio de reações dependentes de ATP ocorre a formação do complexo A. A principal função deste complexo é identificar corretamente os introns a serem excisados (em *splicing* constitutivos), impedindo, assim, que ocorram reações de transesterificações inadequadas. Nessa etapa, os componentes do spliceossomo reconhecem quais sequências devem estar inclusas ou não no transcrito final, em casos de *splicing* alternativo. O tri-snRNPU4/U5/U6 é recrutado para o spliceossomo para formar complexo B, e após rearranjos estruturais o complexo C é formado, resultando na excisão dos íntrons e junção dos éxons (Figura 01) (revisado em WAHL *et al.*, 2009; VISCONTE *et al.*, 2012).

Figura 01: Representação esquemática das regiões de reconhecimento do *splicing* no pré-mRNA e dos locais de ligação dos principais fatores de *splicing* responsáveis pela montagem da maquinaria do spliceossomo. A representa o *branchpoint*, reconhecido pelo fator de *splicing* SF1. YYY representa o trato de polipirimidina. Marcados em vermelho estão os fatores de *splicing* recorrentemente mutados em doenças hematológicas. Retirado de Sperling *et. al.*, (2016).

Mutações somáticas em componentes do spliceossomo foram identificadas em estudos que utilizaram sequenciamento de nova geração para analisar o genoma e o exoma de pacientes com distúrbios hematológicos. A maioria está em componentes do spliceossomo que reconhecem a região de *splicing* 3', incluindo SF3B1, SRSF2, U2AF1 e, em menor grau, ZRSR2, fator de processamento de pré-mRNA 8 (PRPF8), PRPF40B, U2AF2, fator de *splicing* de pré-mRNA (LUC7L2) e o fator de *splicing* 1 (SF1) (revisado em Sperling *et al.*, 2016). Sugere-se que as consequências moleculares dessas mutações estejam relacionadas com a funcionalidade de proteínas envolvidas nas etapas iniciais do reconhecimento do éxon, ou seja, afetam o reconhecimento da extremidade 3' do íntron levando a produção de um mRNA maduro aberrante (YOSHIDA *et al.*, 2011).

1.2 FATOR DE *SPLICING* 1

O gene *Splicing Factor 1* (SF1) está localizado no cromossomo 11q13, foi descrito com 14 éxons e aproximadamente 20 Kb de DNA genômico, sendo expresso como um polipetídeo de 75kDa (KRÄMER, 1992; TODA *et al.*, 1994). SF1 é codificada em diferentes isoformas geradas por *splicing* alternativo, as quais possuem domínios proteicos ULM (*UHM-ligand motif*, motivo de ligação ao domínio UHM) *zinc knuckle* e *hnRNP K homology* (KH), em sua extremidade N-terminal, contendo, ainda, uma região rica em prolina na porção C-terminal, onde seu tamanho e composição são variáveis (ARNING *et al.*, 1996; KIELKOPF *et al.*, 2004; MANCEAU *et al.*, 2006) como está representado logo abaixo na figura 02.

A região amino-terminal entra em contato com o U2AF⁶⁵ através do domínio ULM o qual é um domínio com características especializadas na interação proteína-proteína (KIELKOPF *et al.*, 2004). Rino *et al.*, (2008) demonstraram, em células HeLa, que SF1 e U2AF⁶⁵ estão diretamente ligados no núcleo e em *speckles* nucleares, e propuseram que a ligação destes fatores de *splicing* ocorre de forma não-dependente da montagem do spliceossomo, pois esta associação persistiu após ensaios de inibição da transcrição.

A proteína kinase UHMK1 também interage com o domínio ULM de SF1 e é responsável por fosforilar as duas serinas (resíduos 80 e 82) presentes na região N-terminal de SF1, dentro de uma região filogeneticamente conservada (MANCEAU *et al.*, 2006). Foi demonstrado que a fosforilação do motivo SPSP aumenta a interação de SF1 com U2AF⁶⁵ e, é essencial para a proliferação de células de mamíferos (WANG *et al.*,

2013); porém, reduz levemente a afinidade da ligação de SF1 ou do complexo SF1/U2AF⁶⁵ em sítios de *splicing* na região 3' do íntron do pré-mRNA (CHATRIKHI et. al., 2016), indicando que essa redução facilitaria a ligação da snRNP U2 ao pré-mRNA.

SF1 pertence à família de proteínas STAR (*signal transduction and activation of RNA*), uma família de proteínas que compartilha uma região conservada *Quacking2* localizada na região C-terminal do domínio de homologia de *hnRNP K* (domínio KH); essa região adota uma dobra a qual é necessária e suficiente para o reconhecimento da sequência de ramificação do intron (*branch point sequence*, BPS) no pré-mRNA nascente (LIU et al. 2001).

Ainda na região N-terminal há um domínio conhecido como dedos de zinco, que também está implicado na ligação de SF1 ao RNA, pois este motivo parece conferir afinidade adicional à função do domínio KH de ligação ao RNA, provavelmente através da interação com a estrutura de fosfato carregado negativamente. Após os domínios de ligação ao RNA há uma região rica em prolina flanqueada por duas α -hélices e em seguida um domínio COOH-terminal (RAIN et al., 1998). É implicado que as modificações estruturais locais da região de SPSP ocasionadas por fosforilação pode ser amplificado por estas estruturas helicoidais, facilitando assim a interação SF1 /U2AF⁶⁵. Esta hipótese é reforçada pela observação de que a fosforilação dentro ou próximas a regiões ricas em prolina, frequentemente, induz rearranjos estruturais e que pode propagar-se para outros locais da proteína (LU et al., 2002), no caso de SF1, este sinal pode ser propagado para o local de ligação com U2AF⁶⁵.

Figura 02: Representação esquemática da estrutura de SF1HL1 (a principal variante de SF1 em células HeLa), UHMk1 (KIS) e U2AF⁶⁵. As sequências alinhadas do motivo SPSP de SF1 são dos seguintes organismos: Hs, Homo sapiens; Ce, Caenorhabditis elegans; Dm, Drosophila melanogaster; Sc, Saccharomyces cerevisiae; Sp, Schizosaccharomyces pombe. Zn, motivo de junta de zinco. UHMk1 é formada pela justaposição de um domínio kinase serina/treonina e um domínio UHM na região C-terminal. O U2AF⁶⁵ possui um domínio arginina e rico em serina (RS) na região N-terminal e três domínios RRM na região C-terminal. Adaptada de Manceau *et al.*, 2006.

Sendo assim, SF1 é um componente fundamental na montagem do pré-spliceossomo (complexo E), pois reconhece a sequência de ramificação do intron (*branch point*) no pré-mRNA nascente e permite através de sua interação com o fator auxiliar U2AF⁶⁵, a interação deste ao segmento de pirimidina e ao sítio aceptor de *splicing* (3'SS) na extremidade 3' do íntron (MANCEAU *et al.*, 2006); contudo Tanackovic e Kramer (2005) já demonstraram que SF1 não é essencial para o *splicing* constitutivo, tendo, portanto, como alvo um sub-conjunto de pré-mRNAs, atuando como um fator de *splicing* alternativo (CORIONI *et al.*, 2011). Outros dados demonstraram que SF1 também participa no recrutamento do U2 snRNP ao spliceossomo durante a formação do complexo E (CRISCI *et al.* 2015).

Além da função relacionada ao *splicing* do pré-mRNA, SF1 também tem sido implicado em outros processos celulares, como repressão da transcrição (ZHANG, D. *et al.*, 1998a; ZHANG, D. *et al.*, 1998b), retenção nuclear de pré-mRNA (RUTZ e SÉRAPHIN, 2000), proliferação/viabilidade de células HeLa (TANACKOVIC e KRÄMER, 2005) e

fibroblastos de camundongo NIH 3T3 (WANG *et al.*, 2013). Ademais, SF1 é crítico durante o desenvolvimento embrionário, pois camundongos SF1^{-/-} morreram antes do nascimento (SHITASHIGE *et al.*, 2007a; ZHU *et al.*, 2010).

Shitashige *et al.* (2007a) relataram maior incidência de tumores de cólon quando os camundongos SF1^{+/-} foram tratados com um carcinógeno organotrópico e demonstraram que o aumento da expressão de SF1 está diretamente relacionado à diferenciação de células epiteliais do intestino e inversamente relacionado à tumorigênese, e que SF1 atua, também, como um regulador negativo da atividade oncogênica do complexo β -Catenin/T-Cell-Factor-4. Os autores concluem que SF1 é um supressor tumoral associado à diferenciação celular por atuar com efeito protetor na carcinogênese de câncer colorretal no modelo animal estudado (SHITASHIGE *et al.* 2007b).

Ao contrário dos efeitos observados anteriormente, Zhu *et al.*, (2010) relataram o papel de SF1 no desenvolvimento TGCT (tumores de células germinativas, *testicular germ cell tumors*) e os resultados encontrados indicam que os níveis de expressão SF1 influenciam a incidência do desenvolvimento de tumores de células germinativas, pois se observou que os níveis mais baixos de SF1 suprimiu o desenvolvimento de TGCT, indicando que neste tecido, SF1 atua como oncogene.

Yoshida *et al.*, (2011) identificaram 5 mutações distintas, G372V, T454M, T474A, Y476C e A508G, na região rica em prolina, em amostras de pacientes com síndromes mielodisplásicas (SMD), leucemia mieloide aguda (LMA) e doença mieloproliferativa (MPN) (Figura 3). Se estas mutações causam ganho ou perda de função, e se desorganizam o processo de *splicing* de RNA e, conseqüentemente, conduzem a doenças hematológicas ainda é desconhecido.

Figura 03: Representação esquemática da posição das mutações na proteína de SF1. Triângulos mostram a posição dos aminoácidos e a troca ocorrida devido às mutações encontradas. Retirada de Yoshida et. al., (2011).

Em dados não publicados do nosso grupo a expressão de SF1 encontra-se aumentada em pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA), mas a consequência funcional da expressão diferenciada não está caracterizada no sistema hematopoiético (Figura 04).

Figura 04: Expressão de *SF1* em células da medula óssea de doadores saudáveis e pacientes. Pacientes com síndromes mielodisplásicas, leucemia mielóide aguda e leucemia linfóide aguda. Barbutti, dados não publicados.

Nossa hipótese é que alterações na expressão de *SF1* possam resultar em geração e/ou supressão de variantes de *splicing* que atuem em processos celulares cruciais para células hematopoiéticas normais ou de linhagem leucêmica. Portanto, este trabalho teve como objetivo induzir a inibição e superexpressão de SF1 para verificar se

sua expressão alterada poderia atuar, como oncogene ou supressor tumoral, em células de linhagem leucêmica, por meio da avaliação na proliferação, apoptose, viabilidade e clonogenicidade, quando seu nível de expressão está alterado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar a consequência funcional da inibição e superexpressão do fator de *splicing* SF1 em linhagem celular leucêmica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

2.2.1 Avaliação da expressão de *SF1* em células de linhagens celulares leucêmicas;

2.2.2 Inibição de *SF1* em células da linhagem leucêmica com partículas lentivirais comerciais (sc-44115; Santa Cruz, Biotechnologies)

2.2.3 Transdução de células de linhagem leucêmica com partículas retrovirais para superexpressão de *SF1*

2.2.4 Realização dos ensaios *in vitro* nas células *Namalwa*

- Apoptose
- Proliferação
- Viabilidade por MTT
- Clonogenicidade

2.2.5 Construção de vetores retrovirais contendo sequências shRNA

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTIVO CELULAR

Tanto as células aderentes, como as células em suspensão, foram agrupadas de acordo com a linhagem celular de origem. 1) Células aderentes - células renais embrionárias: HEK 293; células epiteliais do colo do útero: HeLa; osteosarcoma: U-2-OS; melanoma maligno: A375; glioblastoma: U343 e U87; e fibroblastos: NIH 3T3. Foram, então, cultivadas com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e 1% de antibiótico penicilina e estreptomicina. 2) Células em suspensão - leucêmica mieloide: U937, K562, SET e HEL; linfóide aguda tipo T: Jurkat; linfóide tipo B: Raji; e linfoma: Namalwa e Karpas 422. Essas células foram cultivadas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e 1% de antibiótico penicilina e estreptomicina. Tanto as células aderentes como as em suspensão foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Para a formação dos *pellets*, as células aderentes foram, primeiramente, lavadas com PBS 1x e retiradas da placa com tripsina; já para as células em suspensão, a quantidade do volume coletado era dependente da confluência celular. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1200rpm por 5 minutos e o sobrenadante coletado. Os *pellets* foram armazenados a -80°C.

3.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE SF1

3.2.1 Análise da Expressão Gênica

3.2.1.1 Extração de RNA e síntese do DNA complementar (cDNA)

Inicialmente, foi realizada a extração de mRNA dos *pellets* coletados a partir de linhagens celulares utilizando-se o TRI Reagent (Sigma-Aldrich). Para a extração, 300 µl de Trizol® foram adicionados aos tubos contendo o *pellet* celular, e os mesmos foram agitados em vórtex e incubados por 5 minutos em TA. Após, foram adicionados 60 µl de clorofórmio, formando duas fases dentro dos tubos, que foram agitados até estas ficarem homogêneas e, então, foram incubados por 2 minutos a TA. As amostras foram centrifugadas a 12 mil rpm por 20 minutos a 4°C, a fase aquosa (menos densa) foi coletada e a esta, adicionou-se o mesmo volume de isopropanol. Após, os tubos permaneceram a TA por 10 minutos, e foram centrifugados a 14 mil rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 1 ml de etanol 70% e novamente centrifugado a 14 mil rpm, 10 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante

e o *pellet* foi deixado para secar. O RNA foi ressuspensionado em 20 µl de água RNase free e armazenado a -80°C. A quantificação deste mRNA foi dada em ng/µl por meio de espectrofotometria Nanovue™ (GE Healthcare) e considerado adequado ao ter razão 260/280 (base nitrogenada/aminoácido) ≥ 1.7 , indicando que a preparação final do RNA está livre de DNA e proteína. Esse mRNA foi diluído para a concentração de 125ng/µl a um volume final de 8µl para realização do tratamento com DNase I. Para esse tratamento, a reação foi montada adicionando os itens nessa ordem: 1 µl de DNase, 1 µl de *Reaction Buffer* e 8 µl de RNA a 125 ng/µl. A reação foi incubada a TA por 15 minutos e, após esse período, 1 µl de *Stop Buffer* foi adicionado, e a reação foi levada para um termociclador, onde permaneceu por 10 minutos a 70°C. Os *buffers* e a DNase são partes do kit DNase I *amplification grade* (Sigma-Aldrich™).

O RNA tratado foi armazenado a -80°C. Posterior síntese de cDNA utilizando o ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen Life Technologies), onde o RNA obtido e tratado com DNase foi submetido à transcrição reversa, a fim de se obter o cDNA a ser utilizado na reação de q-PCR (*Quantitative polymerase chain reaction*). Para a reação, utilizaram-se 2 µg de RNA e os reagentes do kit *High capacity cDNA reverse transcription* (Applied biosystems®) foram adicionados nessa ordem: 2 µl de 10x RT *Buffer*, 0,8 µl de dNTP mix (100mM), 2 µl de RT *Random primer*, 4,2 µl de H₂O RNase free e 1 µl de *Multi scribe*. A reação foi colocada em um termociclador e submetida à 42°C por 60 minutos e depois à 70°C por 5 min. O cDNA obtido foi quantificado em um NanoVue™ e armazenado a -20°C.

3.2.1.2 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A padronização da reação de qPCR foi feita a partir da elaboração da curva de dissociação do primer e curva de eficiência da reação. As reações foram feitas em triplicata utilizando a menor concentração de *primers* (300nM) capaz de amplificar adequadamente o cDNA (40 ng/µl) e Power SYBR® Green PCR Master MIX (Applied biosystems®), de acordo com as recomendações do fabricante. A sequência dos *primers* de *SF1* utilizados (fw 5' - TGCAGATTACAAACCTCCAGCA -3' e rev 5'- CCCTTTCCCCGGATCAT -3') contemplam as diferentes transcritos de *SF1*.

Para fins de normalização e referência de quantificação, as amostras de cDNA foram amplificadas com *primers* para o gene de manutenção celular *HPRT*. A análise relativa dos dados foi obtida pela derivação da fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK e

SCHMITTGEN, 2001) determinando, assim, os níveis de expressão gênica das amostras em relação à amostra calibradora.

3.2.2 Análise da Expressão Proteica

Para lise celular, os pellets foram suspensos em tampão de extração de proteínas (10 mM EDTA, 100 mM Tris base, 10 mM Pirofosfato de sódio, 100 mM Fluoreto de sódio, 10% Triton e água deionizada) contendo inibidores de protease (ortovanadato 2mM, PMSF 2mM, aprotinina 0,1mg/ml), no volume adequado ao tamanho do pellet formado. As reações foram incubadas no gelo por 40 minutos, sendo que na metade desse tempo e no final, as amostras foram vortexadas. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos à 4°C, tendo seu sobrenadante transferido para um novo tubo. A quantificação de proteínas foi realizada com base em uma curva padrão de BSA (0 µg até 20 µg), utilizando reagente de Bradford 1x. Juntamente com as curvas de BSA, foram incluídas em uma placa de 96 *wells* as amostras proteicas em triplicatas (1µl de amostra com 199µl de Bradford 1x por poço). Em seguida, a placa foi levada para análise em espectrofotômetro com absorvância de 595 nm.

Foi adicionado aos lisados proteicos o tampão Laemmli 4x (1 M Tris-HCl pH 6,8, 20% SDS, 32% glicerol, 14% β-mercaptoetanol e azul de bromofenol) com quantidades correspondentes ao volume total dos lisados. As proteínas foram então desnaturadas à 95°C por 5 minutos. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida (*Resolving* 8% e *Stacking* 5%) e separadas por eletroforese. Finalizada a corrida de eletroforese, as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose durante uma hora e trinta minutos, através de sistema de transferência *semi-dry* (*Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell*). Para visualizar a eficiência da transferência, as membranas foram coradas com Ponceau. Em seguida as membranas foram bloqueadas com solução de bloqueio (10 ml de TBST 1x com 5% leite em pó desnatado) por uma hora e em seguida, foram incubadas *overnight* com anticorpos primários diluídos em 2 ml de tampão TBS 1x e 5% de leite desnatado em pó. Na manhã seguinte, lavou-se as membranas com TBST 1x (3 lavagens de cinco minutos), incubando-as logo em seguida com os anticorpos secundários por quarenta e cinco minutos em 2 ml de TBST 1x com 5% leite desnatado em pó. Após período de incubação, as membranas foram novamente

lavadas com TBST 1x e reveladas utilizando solução de ECL. Receita dos géis de poliacrilamida e ECL, estão descritas a seguir. Os anticorpos utilizados e as respectivas condições de uso estão descritas na Tabela 1.

- Montagem do gel de poliacrilamida:

Resolving 8% (8,5ml)

1,350ml H₂O deionizada

900μl Glicerol

4,5ml Tampão A (EDTA 4mM, SDS 2%, Trisma Base 750mM diluídos em 100ml de H₂O deionizada. pH 8,9)

1,750ml Acrilamida 40%

12,5μl TEMED

135μl APS 10%

Stacking 5% (6ml)

2,1ml H₂O deionizada

2,8ml Tampão B (EDTA 4mM, SDS 2%, Trisma Base 50mM diluídos em 100ml de H₂O deionizada. pH 6,7)

625μl Acrilamida

12,5μl TEMED

135μl APS 10%

- **Solução de ECL**

5ml Tris 0,1M pH8.6

11μl Ácido Cumárico

25μl Luminol

1,5μl H₂O₂ 30%

Tabela 01: Anticorpos utilizados para marcação das proteínas e suas respectivas condições de uso.

Marcação	Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário
SF1	Anti-SF1 goat IgG polyclonal N-14 (Santa Cruz Biotechnology, sc – 21157); 1:1000; <i>overnight</i> ; 4°C.	Anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc – 2020); 1:4000; 45 minutos; 25°C.
	Anti-SF1 mouse IgM monoclonal H-9 (Santa Cruz Biotechnology, sc – 398881); 1:1000; <i>overnight</i> ; 4°C.	Anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc – 2005); 1:4000; 45 minutos; 25°C.
		Anti-mouse IgM (Santa Cruz Biotechnology, sc – 2064); 1:2000; 45 minutos; 25°C.
Actina	Anti-Actina goat IgG monoclonal I-19 (Santa Cruz Biotechnology, sc – 1616); 1:2000; <i>overnight</i> ; 4°C.	Anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc – 2020); 1:4000; 45 minutos; 25°C.

3.3 INIBIÇÃO DE SF1 EM CÉLULAS DE LINHAGEM LEUCÊMICA

Inicialmente, a linhagem hematopoiética linfoide tipo B Namalwa (ATCC® CRL-1432™) derivada do linfoma de Burkitt foi infectada com partículas lentivirais (transdução) comerciais (sc-44115; Santa Cruz, Biotechnologies) que expressam um conjunto de 2 sequências inibitórias (shRNA) para *SF1* (Sequência A: *Sense* - GACCUGACUCGUAAACUGCtt e *Antisense* - GCAGUUUACGAGUCAGGUCtt; Sequência B: *Sense* - CGUUGGACUCCCAAGUAAtt e *Antisense* - UUACUUGGGAAGUCCAACGtt); sequências não relacionadas foram utilizadas como controle (sc-108080; Santa Cruz, Biotechnologies). A transdução foi realizada por meio da técnica de espinoculação, onde foi definido, inicialmente, o valor de *MOI* (*Multiplicity of infection*, Multiplicidade

de infecção) igual a um, significando que cada célula tenha recebido uma unidade de partícula viral. A partir disso e da titulação viral, previamente informada pelo fabricante (1×10^6 unidades de vírus infectantes – *IFU*), a quantidade de partículas virais necessárias para infectar a quantidade de 1×10^5 células foi igual a 20 μ l. A transdução foi realizada com o auxílio do polímero catiônico Polybrene® (Brometo de hexadimetrimina), pois este composto aumenta a eficiência de transdução ao neutralizar a repulsão de carga entre as partículas virais e o ácido siálico presente na superfície celular; a concentração utilizada foi de 4 μ g/ml. O volume da reação foi realizado para um total de 2ml. A reação foi, então, espinoculada em um tubo esférico por 60 minutos a 800xg. Após 48h do início da espinoculação foi iniciada a seleção das células por tratamento com antibiótico puromicina a uma concentração de 1 μ g/ml. Esta etapa foi realizada em três condições: 1- células transduzidas com shSF1; 2- células transduzidas com shControl e 3- células não transduzidas; quando o efeito tóxico letal da puromicina foi observado na condição 3, a efetividade da inibição da condição 1 e 2 foi avaliada por análise protéica (WB) e dado início aos testes *in vitro* descritos adiante.

3.4 SUPEREXPRESSÃO DE SF1 EM CÉLULAS DE LINHAGEM LEUCÊMICA

Para superexpressão de SF1 foram utilizadas as construções MIG-SF1mycWT e MIG-vazio produzidas pelo aluno Guilherme Brussolo Bidoia como parte do seu Projeto de Iniciação Científica (Nº FAPESP 2016/03982-7). A construção possui o cDNA de *SF1* fusionada a sequência codificadora de um myc-tag clonados em vetor retroviral bistrônico MSCV (*murine stem cell virus*) modificado, que contém um sítio de entrada interna de ribossomo (IRES) e a região codificadora da proteína fluorescente verde (MSCV-IRES-GFP; MIG). A superexpressão de *SF1*, em células Namalwa, foi alcançada utilizando-se o meio condicionado com vírus (VCM, *Virus-conditioned medium*) obtidos a partir da transfecção transiente de células HEK 293T_MIG-SF1myc e HEK 293T_MIG, conforme descrito abaixo.

3.4.1 Transfecção em células HEK 293T

As construções obtidas foram utilizadas na transfecção de células de linhagem HEK 293T, para a produção transiente de retrovírus. A transfecção química foi realizada por meio de polietilenimina (PEI), que carrega positivamente as moléculas de DNA, promovendo sua entrada na célula via endocitose.

Os vetores contendo as construções MIG-SF1wtmyc e MIG-vazio foram inseridos em células HEK 293T. Para a transfecção, $2,5 \times 10^6$ células HEK 293T foram divididas em placas de 100mm e incubadas por 20h, para aderir e atingir uma confluência de 60 a 80%. No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS e foram adicionados à placa 5mL de meio Opti-MEM (uma modificação do *Dulbecco's Modified Medium* - DMEM) sem SFB (soro fetal bovino) e antibiótico. Paralelamente, 8 µg de DNA contendo o DNA do vetor de interesse com adição de plasmídeos auxiliares como o plasmídeo pCL-Eco (Addgene plasmid #12371) (NAVIAUX *et al.*, 1996) e o plasmídeo VSV-G (OKIMOTO *et al.*, 2001), para assegurar que o produto de expressão do vetor retroviral fosse empacotado em partículas virais e exportado da célula, 12 µL de PEI (1.0 mg/ml) foram adicionadas a 100 µL de meio Opti-MEM sem soro e sem antibiótico; e a mistura foi incubada a TA por 30 minutos. Após a incubação, a mesma foi gotejada sobre as células, e estas, incubadas na estufa de cultura celular por 4h. Terminada a incubação, o meio Opti-MEM foi removido e substituído por meio DMEM (com 10% SFB e antibiótico).

A concentração utilizada para cada plasmídeo, tanto os auxiliares como os das condições de interesse, dependeu do seu tamanho e proporção em relação ao tamanho da soma de todos os plasmídeos como apresentado nas tabelas 03 a 05.

Tabela 02: Tamanho em pares de bases (pb) de cada plasmídeo utilizados para a produção de vetores virais.

Plasmídeo	Tamanho (pb)
pCMV-VSV - G	6.507
pCL-Eco	12.341
pMIG	6.492
pMIG-SF1WT-myc	8.390

Tabela 03: Proporção e quantidade dos plasmídeos para transfectar células HEK 293T com pMIG-vazio.

Plasmídeo	Proporção %	Quantidade µg
pCMV-VSV - G	25,7	2
pCL-Eco	48,7	3,9
pMIG	25,6	2
Tamanho total: 25.340 pb	100	8

Tabela 04: Proporção e quantidade dos plasmídeos para transfectar células HEK 293T com pMIG-SF1WTmyc.

Plasmídeo	Proporção %	Quantidade µg
pCMV-VSV - G	23,9	1,9
pCL-Eco	45,30	3,6
pMIG-SF1WTmyc	30,8	2,5
Tamanho total: 27.238 pb	100	8

O meio de cultura contendo as partículas virais liberadas (VCM, *virus conditioned medium*) foi recolhido nos intervalos de 24 e 48 h, após ocorrida a transfecção nas células. *Cell strainer* (Kasvi®) com poros de 40 µm foram utilizados para filtrar e garantir que não contenha resíduos celulares no VCM coletado. O mesmo foi armazenado na geladeira pelo período máximo de uma semana até sua utilização.

3.4.2 Transdução de células de linhagem leucêmica

Esta etapa foi realizada, por meio da técnica de espinoculação, de maneira semelhante ao procedimento descrito no item 3.3, porém a seleção das células eficientemente transduzidas ocorreu pela segregação das células que expressam GFP, por meio da técnica FACS (*fluorescence activated cell sorting*).

As células separadas voltaram para o cultivo celular na presença do meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®) até atingirem confluência necessária para iniciar os ensaios *in vitro*. Antes disso, foi realizada avaliação da expressão gênica e proteica como já mencionado.

3.5 ENSAIOS FUNCIONAIS *IN VITRO*

3.5.1 Ensaio de Apoptose

Após duas lavagens com PBS gelado, as células foram ressuspensas em 1x *Binding Buffer* (BD Pharmingen®) a uma concentração de 1×10^6 células/ml. 100 µl dessa solução (1×10^5) foi transferida para um *ependorf* e 5 µl do anticorpo Anexina V – APC foi adicionado, incubando-o por 15 minutos em ambiente protegido da luz; 5 µl do Iodeto de Propídeo (50 mg/ml) - um intercalante de DNA em células com membranas

permeáveis - foi adicionado só no momento da leitura e, esta foi realizada no citômetro FACS Aria™ dentro do intervalo de uma hora como recomendado pelo fabricante.

3.5.2 Ensaio de Proliferação

Inicialmente, um total de $1,5 \times 10^7$ células/ml foi lavada uma vez com PBS 1x para retirada do meio e então ressuspendida e fixada em 5ml de etanol 70% gelado e armazenada no freezer -20°C por uma semana (o tempo mínimo de armazenamento é de duas horas e o máximo é de dois meses). Antes de iniciar a marcação com o anticorpo Ki-67 - FITC, as células foram lavadas por duas vezes com PBS 1% FBS para completa retirada do meio de fixação. Em seguida, as células ($1,5 \times 10^7$ células) foram ressuspensas em 300µl de PBS 1% FBS e esta solução foi dividida em três condições, contendo 100µl ($0,5 \times 10^6$ células) cada, onde foi adicionado 10µl do anticorpo Ki67 – FITC na condição 1, 10µl do anticorpo IgG (controle) na condição 2, e na condição 3 não foi adicionado anticorpo. As amostras ficaram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e protegidas da luz. A leitura foi realizada no citômetro FACS Aria™ dentro do intervalo de uma hora como recomendado pelo fabricante.

3.5.3 Ensaio de Viabilidade

A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de 3-(4,5- dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), que baseia-se na medição da reação colorimétrica resultante da redução do difeniltetrazolium e consequente formação de formazan. O ensaio foi realizado em sextuplicatas técnicas em uma placa de 96 poços e a análise dos dados foi realizada nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas. Para o experimento as células foram ressuspensas a uma concentração de 25×10^4 células/ml, em seguida, 100µl desta solução ($2,5 \times 10^4$ células) foi transferido para cada poço das placas. Na placa correspondente ao momento 0h, 10µl da solução de MTT a 5mg/ml foi adicionada em seguida, sendo incubada por 4h a 37°C . Após este tempo, foi adicionado 100µl da solução de HCl-isopropanol a 0,1M em cada poço e foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 570nm. O mesmo procedimento foi realizado nos tempos subsequentes. A porcentagem de viabilidade foi dada por:

(Média da absorbância da condição – de cada intervalo de tempo/Média da absorbância do controle – intervalo de tempo correspondente) x 100

3.5.4 Ensaio de Formação de Colônia

A clonogenicidade das células foi avaliada através de ensaio de formação de colônia em meio de cultura semissólido (metilcelulose) desprovido de qualquer fator de crescimento (MethoCult™ H4230). A padronização do ensaio foi realizada por meio de dois protocolos: I- Foram plaqueadas $2,5 \times 10^4$ células em 550 μ l de metil/poço em uma placa de 12 poços; II – Foram plaqueadas $1,5 \times 10^4$ células em 270 μ l de metil/poço em uma placa de 24 poços. As células foram incubadas a 37°C por 12 dias e depois coradas com MTT (5mg/mL) por 3h. As unidades formadoras de colônias foram observadas e fotografadas no estereomicroscópio Leica MZFLIII/Câmera Leica DFC 500 e processadas com o auxílio do software LASV3.8 Leica.

3.6 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS RETROVIRAIS QUE EXPRESSAM SEQUENCIAS INIBITORIAS (shRNA) PARA SF1

3.6.1 Oligonucleotídeos

As duas sequências inibitórias (shRNA) para *SF1* (Sequência shSF1A: *Sense* - GACCUGACUCGUAACUGCtt e *Antisense* - GCAGUUUACGAGUCAGGUCtt; Sequência shSF1B: *Sense* - CGUUGGACUCCCCAAGUAAtt e *Antisense* - UUACUUGGGAAGUCCAACGtt) descritas acima foram sintetizadas para clonagem em vetores retrovirais MIG (MIG_shSF1A e MIG_shSF1B). Em cada uma das sequências, foram adicionadas caudas artificiais com reconhecimento para as enzimas de restrição Bgl II e Hind III (nas sequências *sense* e *antisense*, respectivamente) e uma sequência responsável pela formação do *loop* (TTCAAGAGA).

3.6.2 Anelamento dos oligonucleotídeos

Foi incubado 9 μ l de cada oligo, *sense* e *antisense* de cada par, diluídos a 100 μ M, com 2 μ l do tampão de anelamento 10x (500 μ l Tris pH 8.0 1M; 1.666,6 μ l NaCl 3M; 100 μ l EDTA pH 8.0 a 0.5M e 2.733,4 μ l H₂O). A reação ocorreu em um termociclador a 95°C por 4 minutos, seguido de resfriamento gradativo com decaimento de 0,1°C a cada segundo até atingir 4°C. Desta maneira, ocorreu a hibridização dos pares de oligonucleotídeos, formando um segmento de dupla fita com extremidades coesivas em 5' e 3'.

3.6.3 Clonagem

3.6.3.1 Clonagem no vetor de entrada

Para iniciar a clonagem, o vetor de entrada MSCV-U3-H1-Stuffer foi digerido com as enzimas de restrição Bgl II e Hind III, gerando extremidades coesivas, semelhantes as extremidades dos oligonucleotídeos anelados. A reação de digestão foi realizada com 1 µl de cada enzima, 2 µl do tampão de enzima 10x (fornecido pelo fabricante), 100 ng do plasmídeo e água deionizada para completar 20 µl e incubada a 37°C por 30 minutos. Em seguida, a reação foi submetida a eletroforese em gel de agarose a 0,8% para separar e excisar a banda de interesse, com tamanho de 7,6 Kb, compreendendo os sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição Not I e Sca I, uma sequência de regiões LTR (*Long Terminal Repeats*) e uma sequência de codificação para proteína EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*). A extração, da banda de interesse do gel, foi realizada com o *Gel extraction kit QIAquick®* (QIAGEN™), seguindo as recomendações do fabricante.

A ligação do vetor de entrada com os oligonucleotídeos, foi realizada com 100 ng do plasmídeo digerido e purificado, 1 µL do oligonucleotídeo anelado (diluído 1:20), 0,5 µl de T4 DNA ligase, 2 µl do tampão de enzima (fornecido pelo fabricante) e água deionizada para completar o volume de 20 µl. A reação foi incubada a 22°C por 1 h.

À reação de ligação (20 µl) foram adicionados 100 µl de células quimicamente competentes *E. coli* cepa DH5α, onde permaneceram por 40 minutos no gelo e, em seguida, foram submetidas a choque térmico por 90 segundos a 42°C, retornando ao gelo por mais 2 minutos; logo após, 100 µl do meio Luria Bertani (LB) para cultura bacteriana (1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl e água deionizada) a 37°C foram adicionados e a mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos a 700rpm.

As células transformadas, foram, então, semeadas, para o crescimento de colônias isoladas, em placa de Petri em meio LB com ágar (1,5%) e ampicilina (100 µg/ml) e mantidas *overnight* (ON) em estufa a 37°C e 5% de CO₂. No dia seguinte, as colônias foram inoculadas em meio de cultivo líquido (28ml de LB líquido com ampicilina a 100 µg/ml) ON a 37°C com agitação de 1500rpm.

A extração do DNA plasmidial foi realizada por mini precipitação (mini prep) caseira, onde foram utilizadas 3ml do cultivo líquido, e o volume restante foi

armazenado a -80°C para a realização da extração por *Midi Prep Kit* para obtenção do DNA plasmidial mais concentrado e com menos resíduos celulares. Para a realização da mini prep., o meio com bactérias foi centrifugado em tubos de 1,5ml a 14.000rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi, então, removido. Em seguida, 300 μl do tampão de ressuspensão (50 mM Tris pH 8,0; 100 mM EDTA; 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase; água deionizada) e 300 μl de tampão de lise (200 mM NaOH; 1% SDS; água deionizada) foram adicionados, e a reação foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente (TA) seguida da adição de 300 μl do tampão de neutralização (3 M Acetato de potássio pH 5,5) e, seguidamente, a reação foi centrifugada por 15 minutos a 14.000rpm a 4°C . O DNA plasmidial contido no sobrenadante foi transferido para outro tubo e foi adicionado 70% do seu volume em etanol para precipitação. O DNA foi incubado a -20°C por 10 minutos e, logo depois, centrifugado por 20 minutos a 14.000rpm a 4°C . Para finalizar, o sobrenadante foi retirado e, após, a secagem do DNA para completa eliminação do etanol, foram adicionados 20 μl de água milliQ.

3.6.3.2 Clonagem no vetor de expressão

As construções Stuffer-shRNA e o vetor retroviral de destino pMSCV puromycin IRES2-EGFP (MIG) foram digeridos com as enzimas Not I e Sca I conforme descrito acima, para a realização da subclonagem. As reações foram submetidas eletroforese em gel de agarose a 1,5% para separar e excisar as bandas 3,1 Kb referentes a um segmento do vetor Stuffer com a sequência shRNA (Stuffer-shRNA), e a banda de 4,7 Kb referente ao vetor de expressão MIG. Os fragmentos excisados foram extraídos com auxílio do kit *Gel extraction kit QIAquick®* (QIAGEN™) mencionado anteriormente. Os produtos da ligação da construção Stuffer-shRNA ao vetor de expressão foram transformados e, em seguida, extraídos por mini prep. como já mencionado. O DNA das construções obtidas foi submetido a sequenciamento para avaliar se as clonagens foram promissoras.

O resumo gráfico das etapas experimentais desenvolvidas está apresentado na Figura 05.

Figura 05: Delineamento experimental das etapas desenvolvidas. Procedimento esquematizado da transdução, seleção das células eficientemente transduzidas, ensaios *in vitro* e construção de plasmídeos retrovirais que expressam sequências inibitórias (shRNA) para *SF1*.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO ENDÓGENA DE SF1 EM CÉLULAS ADERENTES E EM SUSPENSÃO

A expressão gênica e proteica de SF1 foi avaliada em células de linhagens leucêmicas comparada a linhagens de tumores sólidos e a outras linhagens de células aderentes com o intuito de fornecer um comparativo entre o nível de expressão de SF1 em células de diversos tipos de câncer, assim como, conduzir a escolha da linhagem celular mais adequada para as etapas de inibição e superexpressão.

A análise da expressão gênica de *SF1* por RT-qPCR mostrou-se variável, onde, entre as linhagens aderentes, U343 derivada de glioblastoma e U-2 OS (ATCC® HTB-96™), derivada de osteossarcoma, apresentou maior nível de expressão; já entre as linhagens em suspensão, NAMALWA (ATCC® CRL-1432™), K562 e Karpas 422 apresentaram níveis de expressão mais elevados (Figura 06 A).

A análise proteica realizada por *Western Blot* utilizando o anticorpo α -SF1 N-14 detectou a presença de duas ou três bandas, possivelmente isoformas de SF1, dependendo da linhagem celular entre as células aderentes, enquanto que para as células em suspensão apenas duas bandas foram detectadas e a banda inferior foi detectada com menor intensidade.

As linhagens celulares aderentes, HeLa, A375 e U-2-OS apresentaram maior expressão proteica e as células em suspensão com maior expressão proteica foram K562, Jurkat e Namalwa (Figura 06 B). Com bases nesses dados, em associação com os dados não publicados de nosso grupo da expressão elevada de *SF1* em pacientes com leucemia linfóide aguda, foi escolhida a linhagem hematopoiética NAMALWA (ATCC® CRL-1432™) de linfócitos B, derivada de Linfoma de Burkitt, para realização da inibição de SF1 mediada por lentivirus, e superexpressão mediada por retrovírus.

A

B

Figura 06: Avaliação da expressão endógena de SF1 em células aderentes e células de linhagem leucêmica.

(A) Expressão de *SF1* relativa ao *HPRT* mensurado por PCR em tempo real. O experimento foi realizado em triplicata experimental. U937 foi utilizada como amostra normalizadora. (B) Extratos proteicos (60µg) de células de linhagens aderentes (imagem superior) e em suspensão (imagem inferior) foram analisados por *Western Blot* com anti-SF1 N-14 e anti-β-actina I-19.

4.2 ENSAIOS *IN VITRO*

4.2.1 Células Namalwa silenciadas para *SF1*

Os dados obtidos a partir dos ensaios *in vitro* descritos abaixo são preliminares e foram realizados uma única vez, pois perdemos a linhagem estavelmente inibida de *SF1* por problemas de contaminação bacteriana no cultivo celular. A efetividade da inibição nas demais tentativas de transdução não foi alcançada e as partículas lentivirais comerciais adquiridas para realizar estes ensaios acabaram antes de chegarmos a uma conclusão sobre o fenótipo. Desta forma, análise estatística não pode ser empregada e, mais experimentos devem ser realizados.

Antes de iniciar os ensaios funcionais *in vitro* (ensaio de apoptose, proliferação, viabilidade por MTT e unidade formadora de colônia) com células Namalwa transduzidas com sh*SF1* e shCTRL (Figura 07), a expressão de *SF1* foi avaliada por qPCR e por *Western Blot*. A análise da expressão relativa de *SF1* em células transduzidas com sh*SF1* apresentou uma redução da expressão de *SF1* de 82,5% comparada a células transduzidas com shCTRL e, a expressão proteica também apresentou redução de *SF1* nas células sh*SF1* (Figura 07 A).

No ensaio de apoptose, comparou-se a morte celular pela dosagem de fosfatidilserina marcada com anexina V, diferenciando as células apoptóticas das células necróticas marcadas com o iodeto de propídeo nas células Namalwa silenciadas para *SF1* com as células Namalwa shCTRL. As células inibidas para *SF1* não apresentaram diferença na taxa de morte, quando comparada com as células controle (Figura 07 B).

Anticorpos contra a proteína Ki-67 foram utilizados para avaliar a proliferação celular. As células sh*SF1* e shCTRL apresentaram taxas similares de proliferação (46,91% e 49,40%, respectivamente) (Figura 07 C).

O ensaio de MTT demonstrou uma diminuição variável da viabilidade celular nos tempos 24 horas, seguido de 72 e 48 horas (Figura 07 D).

O ensaio de formação de colônias foi realizado com o intuito de analisar a capacidade clonogênica das células inibidas para *SF1*. As células inibidas de *SF1* formaram menor número de colônias que as células controle (32 e 46,6 colônias, respectivamente), ou seja, uma redução de 31,3% da capacidade clonogênica das células *SF1* inibidas. O tamanho médio das colônias, também, foi analisado – 0,3mm e 0,2mm

para shSF1 e shCTRL respectivamente – e, embora, tenha indicado aumento de 50% nas células silenciadas, tal resultado pode estar relacionado a presença de colônias grandes e pequenas dentro da mesma circunstância (Figura 07 E).

Figura 07: Ensaios in vitro a partir das células das transduzidas com shSF1 e shControl. (A) Inibição de SF1 analisada por qPCR e *Western Blot* com anti-SF1 anti- β -actina (B) Ensaio de apoptose com anexina V e iodeto de propídeo. (C) Ensaio de proliferação realizado com anti-Ki67 (D) Ensaio de viabilidade por MTT realizado em sextuplicata e (E) ensaio de formação de colônia realizado em triplicata técnica. Todos os ensaios foram realizados uma vez. A quantificação das colônias foi realizada pelo software *Image J*.

4.2.2 Células Namalwa superexpressas para *SF1*

A linhagem celular Namalwa também foi transduzida estavelmente com retrovírus para superexpressar *SF1* denominadas de Namalwa_MIG-SF1wt, tendo como controle as células transduzidas com o vetor vazio denominadas de Namalwa_MIG-vazio. As células transduzidas foram selecionadas por FACS, o qual foi realizado duas vezes para cada condição a fim de aumentar a totalidade das células transduzidas em relação as não transduzidas. Após a seleção, foi obtido uma superexpressão eficiente como pode ser observado através do aumento da expressão proteica de *SF1* determinado por *Western blot* (Figura 08 A).

No ensaio de apoptose, as células Namalwa_MIG-SF1wt e Namalwa_MIG-vazio apresentaram taxa de morte celular similares de $24,96\% \pm 17,97$ (15,14% de morte inicial e 9,82% de morte tardia) e $23,97\% \pm 10,72$ (12,66% de morte inicial e 11,30% de morte tardia), respectivamente (Figura 08 B). Na figura observa-se que a maior parte das células se apresentam viáveis, tanto na superexpressão ($73,15\% \pm 17,77$) como no controle ($74,23\% \pm 10,93$) e a taxa média de morte causada por necrose, o que representa a morte celular associada a técnica do experimento foi de aproximadamente 1,8% em ambas as condições.

Ensaio com marcação de Ki-67 demonstrou que as células Namalwa_MIG-SF1wt apresentaram taxa de proliferação igual a $76,21\% \pm 24,32$, enquanto as células Namalwa_MIG-vazio o valor foi igual a $70,42\% \pm 37,63$, assim a condição comparada ao controle não apresentaram diferenças na taxa de proliferação celular (Figura 08 C).

No ensaio de viabilidade por MTT, a razão da condição superexpressa pelo controle, apresentou redução da viabilidade celular, que já se torna evidente a partir do tempo 24h, e esta redução apresenta-se de modo progressivo, onde no intervalo de 72h a viabilidade celular detectada corresponde a uma diminuição com cerca de 41,5% comparado ao tempo de 0h (Figura 08 D).

Em ensaio clonogênico, as células Namalwa_MIG-SF1wt formaram menor número de colônias, onde a média do número absoluto de colônias corresponde a 58,2 enquanto em células Namalwa_MIG-vazio corresponde a 155,5 colônias, o que representa uma diminuição equivalente a 62,6% da condição superexpressa para *SF1* em relação ao controle. Entretanto, embora o número médio das colônias nas células na condição superexpressa seja inferior ao controle, as colônias formadas apresentaram

diâmetro superior, com tamanho médio igual a 0,136mm enquanto que na a condição controle foi igual 0,063mm; esses valores demonstram que as colônias das células Namalwa-MIG-SF1wt tem o dobro do tamanho das colônias formadas pelas células Namalwa_MIG-vazio (Figura 08 E).

Figura 08: Ensaio *in vitro* das células transduzidas com MIG-SF1wt e MIG-vazio. (A) Superexpressão de SF1 analisada por *Western Blot* com anti-SF1 e anti-β-actina. (B) Ensaio de apoptose com anexina V e iodeto de propídeo. (C) Ensaio de proliferação realizado com anti-Ki67. (D) Ensaio de viabilidade por MTT realizado em sextuplicata técnica e (E) ensaio de formação de colônia realizado em triplicata técnica. Todos os ensaios foram realizados 3 vezes, exceto o de formação de colônia que foi realizado duas vezes. A quantificação das colônias foi realizada pelo software *Image J*.

4.3 CLONAGEM

4.3.1 Desenho e Produção dos Segmentos em Dupla Fita

Os oligonucleotídeos shRNA desenhados possuem as mesmas sequências alvo (shA e shB) para uma região específica do mRNA de *SF1* humano, presentes no lentivírus comercial (Tabela 05). Contudo, elas foram checadas, com o auxílio de BLOCK-IT™ (Invitrogen™) quanto a sua especificidade para evitar ligações *off-target*, e, em seguida, sintetizadas. Essa ferramenta, também, foi utilizada na escolha da melhor sequência embaralhada sem alvo específico (shScr). Os oligonucleotídeos fita simples *Top* e *Bottom* foram anelados em segmentos dupla fita (Figura 09) para iniciar as etapas de clonagem.

Tabela 05: Sequências de shRNA utilizadas.

Nome	Sequência
shSF1A Top	5'- GATCTGACCTGACTCGTAACTGCTCAAGAGAGCAGTTTACGAGTCAGGTCTTTTA - 3'
shSF1A Bottom	5'- AGCTTAAAGACCTGACTCGTAACTGCTCTCTTGAAAGCAGTTTACGAGTCAGGTCA - 3'
shSF1B Top	5'- GATCTCGTTGGACTTCCCAAGTAACTCAAGAGATTACTTGGGAAGTCCAACGTTTA - 3'
shSF1B Bottom	5'- AGCTTAAAGCGTTGGACTTCCCAAGTAACTCTCTTGAAATTACTTGGGAAGTCCAACGA - 3'
shScr Top	5'- GATCTACGTATCACGAACTCGCTGTCAAGAGACAGCGAGTTCGTGATACGTTTTA - 3'
shScr Bottom	5'- AGCTTAAAGACGTATCACGAACTCGCTGTCTCTTGAAACAGCGAGTTCGTGATACGTA - 3'

As sequências de reconhecimento das enzimas Bgl II (sequências *top*) e Hind III (sequências *bottom*) encontram-se nas cores lilás e azul, respectivamente. Em seguida estão as sequências complementares ao segmento alvo no mRNA de *SF1*. Em amarelo, encontra-se a região que forma o loop da estrutura do *hairpin* e em vermelho a região da cauda poliA.

Figura 09: Gel de 4% agarose mostrando o anelamento dos oligos *Top* e *Bottom*. Os poços contêm 2 μ L oligonucleotídeos *Top* e *Bottom* a 100 μ M ou 2 μ L da reação de anelamento diluída 1:20 (oligonucleotídeos anelados).

4.3.2 Clonagem do shRNA no vetor de entrada e vetor de expressão

Após o anelamento, as sequências dupla-fita de shRNA SF1A, SF1B e Scr foram inseridas no vetor de entrada MSCV-U3-H1-Stuffer, digerido, previamente, com as enzimas de restrição Bgl II e Hind III (Figura 10 A e B).

Foi utilizado em uma reação de digestão teste com as enzimas BamH I e Sca I (Figura 10 A e Figura 11) para verificar a correta inserção das sequências sh no plasmídeo de entrada. Quando a ligação ocorre de forma correta, o DNA digerido deve apresentar duas bandas de 4,15Kb e 3,49KB, enquanto a ligação malsucedida apresenta três bandas de 3,89 KB, 2,97Kb e 0,7Kb. Entre os clones selecionados, A1, A2, B1, B3, B4 e Scr1 estavam corretos.

Figura 10: Representação da etapa de clonagem no vetor de entrada MSCV-U3-H1-Stuffer. (A) Vetor de entrada vazio, com ênfase nas regiões correspondentes as enzimas de restrição utilizadas para a ligação do inserto no vetor destacadas em vermelho e as utilizadas para a digestão teste em azul. (B) Sequência sh, representada em vermelho, inserida no vetor de entrada.

Figura 11: Gel de 1,5% de agarose mostrando a digestão teste realizados com as enzimas de restrição BamHI e ScaI após a ligação do inserto com o vetor de entrada. As ligações bem-sucedidas dos clones A1, A2, B1, B3, B4 e Scr1 apresentam duas bandas, uma de 4,15Kb e a segunda de 3,49Kb.

As construções A1, B3 e Scr1 foram selecionadas para prosseguir nas etapas seguinte de subclonagem no vetor retroviral de destino MIG (pMSCV-IRES2-EGFP-siRNA). Para tal, as construções foram digeridas com as enzimas Not I e Sca I, onde o produto digerido apresentou três bandas com tamanhos de 3,89Kb, 3,11Kb e 0,7Kb (Figura 12).

Figura 12: Gel de 1,5% de agarose mostrando o produto da digestão com as NotI e Scal realizada no DNA resultante da clonagem do vetor de entrada ligado corretamente ao inserto (Stuffer-shRNA). A banda de interesse com 3,11Kb está delimitada em vermelho.

A banda correspondente ao tamanho de 3,11Kb, contendo os insertos (shRNA) e uma região de LTR, foi extraída do gel e o DNA purificado foi inserido no vetor de expressão MIG (pMSCV-IRES2-EGFP siRNA) previamente digerido com as mesmas enzimas (Figura 13). A capacidade destas construções, efetivamente, inibirem *SF1* será avaliada em células HeLa.

Figura 13: Representação gráfica da etapa de subclonagem no vetor de expressão MIG (pMSCV-IRES2-EGFP siRNA). (A) Vetor de expressão MIG vazio, antes da digestão, com destaque nas enzimas de restrição utilizadas: Not I e Sca I. (B) Construção do vetor de expressão contendo a inserção da região do vetor de entrada Stuffer que abrange a sequência shRNA e uma região LTR.

5 DISCUSSÃO

SF1 é um fator de *splicing* alternativo, dentre outras funções postuladas, participando da formação do complexo E durante a montagem do spliceossomo, reconhecendo a região do *branch point sequence* (MANCEAU *et al.*, 2006; CORIONI *et al.*, 2011). Ademais, *SF1* exerce funções antagônicas em tumores de diferentes tipos de tecido (SHITASHIGE *et al.*, 2007a; ZHU *et al.*, 2010). É descrito a relação entre vários fatores de *splicing*, incluindo *SF1*, e câncer, onde mutações e alteração na expressão estão relacionadas com a tumorigênese (revisado em Dvinge *et al.*, 2016).

Dados preliminares do nosso grupo demonstraram que o nível de expressão de *SF1* em um coorte de pacientes está elevado em pacientes com leucemia linfóide aguda quando comparado aos grupos de pacientes com leucemia mieloide aguda, síndromes mielodisplásicas e doadores saudáveis. Entre o grupo de pacientes com LLA, a maioria (20 em 22) está classificada como pertencente ao subtipo celular B, reforçando, assim, a escolha da linhagem hematopoiética Namalwa neste estudo.

Os dados, tanto de inibição como superexpressão de *SF1*, obtidos neste estudo não apresentaram diferença relevante, quando comparados ao seu respectivo controle em ensaios de proliferação e marcação com anexina V, indicando que *SF1* não desempenha função relacionada a proliferação, assim como, sua depleção não está relacionada com a apoptose em células hematopoiéticas. No entanto, Tanackovic e Krämer (2005) demonstraram que *SF1* exerce efeito na proliferação celular ao utilizaram siRNA para depleção de *SF1* em células HeLa e, 24h após a transfecção, a redução da proliferação foi observada e após as 72h essa redução foi de aproximadamente 75%. Os autores também relataram que em células depletadas para *SF1* a presença de núcleos fragmentados e acúmulo de caspase-3, característico de células apoptóticas.

Embora a taxa de proliferação não tenha sido modificada quando a expressão de *SF1* foi alterada por inibição ou superexpressão, o ensaio de viabilidade por MTT demonstrou que a capacidade de reduzir o tetrazolium pode indicar uma capacidade metabólica celular reduzida nos intervalos de tempo avaliados em ambas as condições. No entanto, devemos levar em conta que os experimentos, em células com *SF1* silenciado, foram realizados apenas uma vez e, portanto, ainda não podemos afirmar

que estes resultados são significativos. Por outro lado, o aumento da expressão de *SF1* resultou em uma diminuição progressiva e relevante na viabilidade do tipo celular avaliado neste estudo.

Heintz *et al.*, (2017) demonstraram que o aumento dos parâmetros de disfunção do *splicing* relacionados a idade, em *C. elegans*, é atenuado quando estes animais estão em uma dieta restrita (DR) em um modo dependente de *sfa-1* (homólogo de *SF1*); e, a moderada superexpressão de *sfa-1* foi suficiente para aumentar a vida útil nestes animais. Ensaios em células HeLa também foram realizados e demonstraram que siSF1 desregula o *splicing* e as vias KEGG mais significativamente enriquecidas nessas células com siSF1 estão relacionadas a processos metabólicos. Os autores concluíram que *SF1* tem papel conservado na regulação metabólica de vermes a mamíferos.

Nos dados obtidos, a diminuição da funcionalidade celular pode estar relacionada à inibição, como também, à superexpressão de *SF1*, o que difere do que foi demonstrado em *C. elegans*. Isto demonstra, que, neste organismo, a maior atividade metabólica está diretamente relacionada ao nível de expressão de *sfa-1*. No entanto, nas células Namalwa, a alteração na expressão - tanto inibição como superexpressão - de *SF1* parece exercer influência na viabilidade dessas células.

A associação da capacidade tumorigênica com os níveis de expressão de *SF1* foram avaliados, neste estudo, por meio do ensaio de formação de colônia. Nossos resultados sugerem que a alteração da expressão de *SF1* contribui com a diminuição da capacidade clonogênica na linhagem celular Namalwa, pois as células Namalwa-shSF1 e Namalwa_MIG-SF1wt apresentaram redução no número de colônias em cerca de 31% e superior a 60% respectivamente. Contudo, o tamanho das colônias está expressivamente aumentado. Os resultados do ensaio com marcação de Anexina V e Ki-67 indicam que a diminuição na formação de colônias não está relacionada com o aumento na taxa de morte celular ou diminuição da proliferação celular.

Outros estudos também avaliaram o efeito da alteração da expressão de *SF1*, onde foi demonstrado que *SF1* é necessário para o desenvolvimento embrionário, pois camundongos nocautes para *SF1* morreram antes do nascimento (SHITASHIGE *et al.*, 2007; ZHU *et al.*, 2010). Shitashige *et al.* (2007a) relataram que a depleção parcial de

SF1, em camundongos, aumentou incidência de tumores de cólon quando foram tratados com azoximetano um carcinógeno organotrópico; e demonstraram que o aumento da expressão de *SF1* está diretamente relacionado à diferenciação de células epiteliais do intestino e inversamente relacionado à tumorigênese, enquanto que os níveis de expressão de *SF1* influenciam a incidência do desenvolvimento de TGCT, pois se observou que os níveis mais baixos de *SF1* diminuiu a capacidade tumorigênica neste tecido (ZHU *et al.*, 2010).

Heintz *et al.*, (2017) demonstraram, também, que o papel de *SF1* estende-se, como um regulador geral dos componentes da via de mTOR. Esta é dividida em complexo 1 e 2, e o complexo 1 de mTOR (mTORC 1) atua no crescimento celular promovendo a tradução do mRNA, síntese proteica, além de modular processos metabólicos – tanto anabólicos quanto catabólicos – como a promoção da biossíntese de lipídeos, repressão da degradação por meio da via de autofagia, regulação do metabolismo de glicose e função mitocondrial (JOHNSON *et al.*, 2012; revisado em Saxton e Sabatini, 2017). Isso, talvez, seja um indicativo, que a expressão alterada de *SF1* possa influenciar a produção de transcritos desregulados dos componentes da via de mTOR, o que poderia implicar na atividade irregular destes componentes sob seus substratos alvos, ocasionando, assim, a redução da atividade metabólica e desequilíbrio no crescimento celular. Neste estudo, alteração da expressão de *SF1*, resultou na diminuição do número de colônias como possível consequência da redução da viabilidade e provocou aumento no tamanho das colônias por motivos ainda desconhecidos.

Na linhagem celular Namalwa, a expressão diferenciada de *SF1* não altera as taxas de apoptose e proliferação; mas, reduz, de modo considerável, a viabilidade nos intervalos de tempo avaliados e reduz, também, sua capacidade clonogênica, porém aumenta o tamanho das colônias formadas. No entanto, estes dados são preliminares e mais experimentos são necessários para que nossas hipóteses sejam confirmadas e para que possamos compreender o papel que *SF1* desempenha no sistema hematopoiético.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, AA. *et al.* Targeting splicing abnormalities in cancer. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 48, p. 67–74, 2017.
- ARNING, S. *et al.* Mammalian splicing factor SF1 is encoded by variant cDNAs and binds to RNA. **RNA**, v. 2, n. 8, p. 794–810, 1996.
- ALBERTS, B. *et al.* Biologia Molecular da Célula. 5ª edição. Porto Alegre: **Editora Artmed**, 2009.
- BENJAMIN, D. *et al.* Immunoglobulin secretion by cell lines derived from African and American undifferentiated lymphomas of Burkitt's and non-Burkitt's type. **J. Immunol.** v. 129: 1336-1342, 1982.
- CORIONI, M. *et al.* Analysis of in situ pre-mRNA targets of human splicing factor SF1 reveals a function in alternative splicing. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 5, p. 1868–1879, 2011.
- CRISCI, A. *et al.* Mammalian splicing factor SF1 interacts with SURP domains of U2 snRNP-associated proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 21, p. 10456–10473, 2015.
- DAVID, CJ; MANLEY, JL. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. **Genes Dev.** 24: 2343–2364, 2010.
- DVINGE, H. *et al.* RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 7, p. 413–430, 2016.
- GROSSO, AR; MARTINS, S; CARMO-FONSECA, M. The emerging role of splicing factors in cancer. **EMBO Rep** 2008; 9: 1087-1093.
- HEINTZ, C. *et al.* Splicing Factor 1 Modulates Dietary Restriction and TORC1 Pathway Longevity in *C. elegans*. **Nature**. 05: 102–106, 2017.
- JOHNSON, SC; RABINOVITCH, PS; KAEBERLEIN, M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. **Nature**. 493: 338–345, 2013.
- KAIDA, D; SCHNEIDER-POETSCH, T; YOSHIDA, M. Splicing in oncogenesis and tumor suppression. **Cancer Sci** 2012; 103: 1611-1616.
- KIELKOPF, CL; LUCKE, S; GREEN, MR. U2AF homology motifs: protein recognition in the RRM world. **Genes Dev.** 2004; 18(13): 1513--1526.
- KRÄMER, A. Purification of splicing factor SF1, a heat-stable protein that functions in the assembly of a presplicing complex. **Molecular and Cellular Biology**, v. 12, n. 10, p. 4545–4552, 1992.
- KRÄMER, A. The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. **Annual Review of Biochemistry**. v. 65, p. 367–409, 1996.

- LIVAK, KJ; SCHMITTGEN, TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Method.** v. 25(4):402-8, 2001.
- LIU, H.-X. et al. Exonic Splicing Enhancer Motif Recognized by Human SC35 under Splicing Conditions. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 3, p. 1063–1071, 2000.
- LIU, Z.; LUYTEN, I. Structural Basis for Recognition of the Intron Branch Site RNA by Splicing Factor 1. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1098–1102, 2001.
- LU, KP; LIOU, YC e ZHOU, XZ. Pinning down proline-directed phosphorylation signaling. **Trends Cell Biol.** 12: 164–172, 2002.
- MACIEJEWSKI, JP; PADGETT, RA. Defects in spliceosomal machinery: a new pathway of leukaemogenesis. **Br J Haematol.** 158: 165-173, 2012.
- MANCEAU, V. et al. Major phosphorylation of SF1 on adjacent Ser-Pro motifs enhances interaction with U2AF65. **FEBS Journal**, v. 273, n. 3, p. 577–587, 2006.
- MATERA, A. G.; WANG, Z. A day in the life of the spliceosome. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 2, p. 108–121, 2014.
- NAVIAUX, R.K; COSTANZI, E; HAAS, M; VERMA, I.M. The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. **J Virol.** v. 70: 5701-5705, 1996.
- OKIMOTO, T; FRIEDMANN, T, MIYANOHARA, A. VSV-G envelope glycoprotein forms complexes with plasmid DNA and MLV retrovirus-like particles in cell-free conditions and enhances DNA transfection. **Mol Ther.** v. 4(3):232-8, 2011.
- PAJARES, MJ. *et al.* Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. **Lancet Oncol.** 8: 349–357, 2007.
- RAIN, JC *et al.* Conservation of functional domains involved in RNA binding and protein–protein interactions in human and *Saccharomyces cerevisiae* pre-mRNA splicing factor SF1. **RNA** 1998; 4: 551–565.
- RINO, J. *et al.* Splicing Factors SF1 and U2AF Associate in Extraspliceosomal Complexes. **Molecular and Cellular Biology.** 28(9):3045-57, 2008.
- RUTZ, B; SÉRAPHIN, B. A dual role for BBP/ScSF1 in nuclear pre-mRNA retention and splicing. **The EMBO Journal.** 19: 1873-1886, 2000.
- SAXTON, RA; SABATINI, DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. **Cell.** 168(6): 960–976, 2017.
- SHITASHIGE, M. *et al.* Involvement of Splicing Factor-1 in β -Catenin/T-Cell Factor-4-Mediated Gene Transactivation and Pre-mRNA Splicing. **Gastroenterology.** 132: 1039–1054, 2007a.
- SHITASHIGE, M. *et al.* Increased susceptibility of Sf1+/- mice to azoxymethane-induced colon tumorigenesis. **Cancer Science.** 98: 1862–1867, 2007b.

TANACKOVIC, G.; KRÄMER, A. Human Splicing Factor SF3a, but not SF1, Is Essential for Pre-mRNA Splicing In Vivo. **Molecular biology of the cell**, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2005.

VISCONTE, V. *et al.* Emerging roles of the spliceosomal machinery in myelodysplastic syndromes and other hematologic disorders. **Leukemia**. 26: 2447–2454, 2012.

WAHL, MC; WILL, CL; LÜHRMANN, R. The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. **Cell**. 136: 701–718, 2009.

WANG, GS; COOPER, TA. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. **Nat Rev Genet** 2007; 8: 749-761.

YOSHIDA, K. *et al.* Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. **Nature**, v. 478, n. 7367, p. 64–69, 2011.

ZHANG, D.; PALEY, A.J.; CHILDS, G. The transcriptional repressor ZFM1 interacts with and modulates the ability of EWS to activate transcription. **J. Biol. Chem.** v. 273: p18086–18091, 1998a.

ZHANG, D.; CHILDS, G. Human ZFM1 protein is a transcriptional repressor that interacts with the transcription activation domain of stage-specific activator protein. **J. Biol. Chem.** v. 273: p6868–6877, 1998b.

ZHANG, J.; MANLEY, J.L. Misregulation of pre-mRNA alternative splicing in cancer Jian. **Cancer Discov**, v. 8, n. 9, p. 1385–1395, 2013.

ZHU, R. *et al.* Deficiency of splicing factor 1 suppresses the occurrence of testicular germ cell tumors. **Cancer Research**. 70: 7264–7272, 2010.