UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

TIAGO SELAU RODRIGUES

**Investigação de oncogenes cooperativos na emergência da leucemia mediada
por *IL7R***

RIBEIRÃO PRETO

2019

TIAGO SELAU RODRIGUES

**Investigação de oncogenes cooperativos na emergência da leucemia mediada
por *IL7R***

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Leticia Fröhlich
Archangelo

RIBEIRÃO PRETO

2019

RODRIGUES, Tiago Selau. **Investigação de oncogenes cooperativos na emergência da leucemia mediada por *IL7R***. 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A todos aqueles que se sentem fascinados pela
ciência e pelo conhecimento.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de mestrado nº 2016/20071-8 (vinculado ao projeto Jovem Pesquisador de nº 2014/01458-3).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da FMRP-USP pelo apoio estrutural e financeiro.

Ao corpo técnico do programa de pós-graduação pelo capacitado suporte técnico em diversas etapas dessa pesquisa.

Aos laboratórios parceiros pelos conselhos e permissões de uso de equipamentos quando se fez necessário; em especial, às técnicas Silvia, Tânia, Elizabete e Patrícia.

Aos companheiros e amigos do laboratório 19: Flávia, Paulo, Rye, Rodrigo, Ana Júlia e Karen; pela companhia e incentivo diários.

À família que fiz no LIMCa: Vanessa, Iuly, Viviana, Guilherme, Laíssa, Vivian e Lucca; por todo o carinho e apoio que me permitiram crescer profissional e pessoalmente.

À Leticia pela confiança em me receber como mestrando e pela orientação e incentivo proporcionados em nossa jornada de aprendizado.

A diversos amigos e familiares que, de longe, serviram de amparo nos momentos em que duvidei de mim mesmo; em especial ao Douglas e ao Gabriel por me ajudarem a aceitar que a mente está atrelada ao coração.

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.

Rodrigues, Tiago Selau –
Investigação de oncogenes cooperativos na emergência da leucemia mediada por IL7R
Tiago Selau Rodrigues. 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. IL7R. 2. Leucemia. 3. RUNX1-RUNX1T1. I. Archangelo, Leticia Fröhlich. II.
Universidade de São Paulo. Programa de Biologia Celular e Molecular. Título.

RODRIGUES, Tiago Selau. **Investigação de oncogenes cooperativos na emergência da leucemia mediada por *IL7R***. 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

RESUMO

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é caracterizada pela expansão clonal de células progenitoras linfoides carregando mutações genéticas herdadas e/ou alterações epigenéticas acumuladas. Interleucina-7 (IL-7) é uma citocina necessária para o desenvolvimento normal de células linfoides e promove respostas de sobrevivência e proliferação através da ligação com receptores de IL-7 (IL-7R). Mutações do tipo ganho-de-função no gene *IL7R* atuam na emergência de LLAs, pois os receptores mutados são extremamente sensíveis ao ligante ou ativam as vias de sinalização proliferativa de forma constitutiva. Embora esse fenótipo maligno esteja relacionado aos progenitores da linhagem linfoide, um caso de paciente com leucemia mieloide aguda (LMA) carregando *IL7R* mutado foi reportado. Esse mesmo paciente também possuía a proteína de fusão RUNX1-RUNX1T1 gerada pela translocação cromossômica t(8;21). A fim de verificar um possível papel oncogênico cooperativo entre *IL7R* mutado e *RUNX1-RUNX1T1*, introduzimos tais alterações em modelo de linfócito murino dependente de IL-3 (Ba/F3) para avaliar seu efeito transformante – tornar o crescimento de Ba/F3 independente de IL-3 – e aditivo como potenciais oncogenes.

Palavras-chave: IL7R. Leucemia. RUNX1-RUNX1T1.

RODRIGUES, Tiago Selau. **Investigation of cooperative oncogenes in the emergence of *IL7R*-mediated leukemia**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is characterized by clonal expansion of lymphoid progenitor cells carrying inherited genetic mutations and/or accumulated epigenetic alterations. Interleukin-7 (IL-7) is a cytokine necessary for normal development of lymphoid cells and promotes survival and proliferative responses through its ligation with IL-7 receptors (IL-7R). Gain-of-function mutations in the *IL7R* gene causes ALLs, since mutated receptors either become extremely sensible to ligand or activate proliferative signaling path constitutively. Even though this malignant phenotype is related to lymphoid progenitors, a case of a patient with acute myelogenous leukemia (AML) bearing mutated *IL7R* was reported. This same patient also presented the fusion protein RUNX1-RUNX1T1 generated by chromosome translocation t(8;21). In order to verify a possible oncogenic cooperative role between mutated *IL7R* and *RUNX1-RUNX1T1*, we introduced such alterations in a IL-3-dependent murine lymphocyte model (Ba/F3) to evaluate their transforming – make Ba/F3 growth independent of IL-3 – and additive effect as potencial oncogenes.

Keywords: IL7R. Leukemia. RUNX1-RUNX1T1.

LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Modelo computacional do posicionamento das cadeias IL-7R α e γ c ao interagir com o ligante IL-7.	16
Figura 2. Representação esquemática das principais vias de sinalização de sobrevivência ativadas pelo estímulo de IL-7.	18
Figura 3. Comparação dos mecanismos de ativação de IL-7R α selvagem e contendo diferentes tipos de mutações.....	20
Figura 4. Posicionamento das mutações G2-1, RRI e P2 na cadeia proteica de IL-7R α	21
Figura 5. Curva de crescimento de células Ba/F3 cultivadas em meio suplementado com IL-3 recombinante ou com meio condicionado contendo IL-3 (VCM).....	36
Figura 6. Curva de crescimento de linhagens Ba/F3 na ausência de IL-3.	38
Figura 7. Esquema de clonagem da porção final do gene fusionante <i>RUNX1-RUNX1T1</i> em vetor retroviral contendo o marcador dTOMATO.	40
Figura 8. Géis de agarose contendo o produto da amplificação de <i>RUNX1-RUNX1T1</i> por PCR e inserto e vetor digeridos com BamHI e NotI para ligação.	41
Figura 9. Resultados da clonagem de <i>RUNX1-RUNX1T1</i> : gel de agarose contendo os fragmentos de plasmídeo digeridos por BglII dos 12 clones transformados; e mapa do vetor contendo <i>RUNX1-RUNX1T1</i> completo e dTOMATO.	42
Figura 10. Visualização da fluorescência dos marcadores eGFP e dTOMATO em células HeLa após transfecção com pMIG-AEfl-GFP, pMIG-AEtr-TOM ou pMIG-AEfl-TOM.	43
Figura 11. <i>Western blot</i> retratando a expressão da proteína de fusão RUNX1-RUNX1T1 em suas formas truncada e íntegra por células 293T transfectadas com vetor pMIG-AEtr-TOM e pMIG-AEfl-TOM.	44
Figura 12. Gel de agarose contendo as bandas resultantes da digestão de pMIG-IL7R-WT, pMIG-IL7R-G2-1, pMIG-IL7R-P2 e pMIG-IL7R-RRI por HindIII.	45
Figura 13. <i>Western blot</i> retratando a expressão de STAT5, AKT e BAD em suas formas nativas e fosforiladas nas linhagens Ba/F3 crescidas com ou sem IL-3.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tampões e géis utilizados no <i>western blot</i>	31
Tabela 2. Quantificação dos plasmídeos pMIG-IL7R-WT, pMIG-IL7R-G2-1, pMIG-IL7R-P2 e pMIG-IL7R-RR1 extraídos por MIDI-PREP.....	45
Tabela 3. Quantificação do percentual de células 293T GFP+ após transfecção com pMIG-IL7R-WT, pMIG-IL7R-G2-1 e pMIG-IL7R-P2 por citometria de fluxo.....	46
Tabela 4. <i>Cell sorting</i> de linhagens Ba/F3 transduzidas com IL7R-WT, IL7R-G2-1 e IL7R-P2, indicando o percentual de transdução e a quantidade de células GFP+ em cada população.	46
Tabela 5. Quantificação do percentual de células 293T GFP+ ou TOMATO+ após transfecção com pMIG-IL7R-WT, pMIG-IL7R-G2-1, pMIG-IL7R-P2, pMIG-IL7R-RR1 ou pMIG-AEfl-TOM por citometria de fluxo.	48
Tabela 6. <i>Cell sorting</i> de linhagens Ba/F3 transduzidas com IL7R-WT, IL7R-G2-1, IL7R-P2, IL7R-RR1 ou RUNX1-RUNX1T1, isoladamente ou em conjunto, indicando o percentual de transdução e a quantidade de células GFP+, dTOMATO+ ou duplo+ em cada população.	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Leucemia Linfoblástica Aguda	12
1.2	Alterações Genéticas em LLA-T	13
1.3	IL-7 na hematopoese	14
1.4	Receptor de IL-7 e sua sinalização	15
1.5	Mutações de <i>IL7R</i> em leucemias	18
2	OBJETIVO GERAL	23
3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4	MATERIAIS	24
4.1	Vetores e Construções Plasmidiais	24
4.2	Linhagens Celulares Parentais	24
4.3	Linhagens Celulares Estabelecidas	25
4.4	Oligonucleotídeos	25
4.5	Citocinas	26
4.6	Anticorpos	26
4.7	Enzimas de Restrição	26
5	MÉTODOS	27
5.1	Cultivo de Células	27
5.2	Produção de meio condicionado contendo IL-3	27
5.3	Produção de meio condicionado contendo partículas retrovirais pMIG	27
5.4	Teste de viabilidade (MTT)	28
5.5	Transfecção e produção transiente de partículas retrovirais	28
5.6	Transdução por meio de espinoculação	29
5.7	Visualização de células por microscopia de fluorescência	29
5.8	<i>Western blot</i>	29
5.9	Transformação de DNA plasmidial em bactérias	32
5.10	Extração de DNA plasmidial por MINI-PREP	32
5.11	Extração de DNA plasmidial por MIDI-PREP	33
5.12	Amplificação de DNA por PCR	33
5.13	Precipitação de DNA com acetato de sódio	34
5.14	Eletroforese em gel de agarose	34
5.15	Extração de DNA em gel de agarose	34
5.16	Digestão de DNA com enzimas de restrição	35
5.17	Ligação de inserto em vetor	35
5.18	Sequenciamento de DNA	35

6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.1	Comparação entre o crescimento de células Ba/F3 cultivadas com IL-3 recombinante e meio condicionado contendo IL-3	36
6.2	Caracterização do crescimento de linhagens Ba/F3 superexpressando <i>IL7R</i> selvagem e mutado	37
6.3	Clonagem de <i>RUNX1-RUNX1T1</i> em vetor retroviral	39
6.3.1	Amplificação de <i>RUNX1-RUNX1T1</i> e ligação em vetor retroviral	39
6.3.2	Transformação e seleção dos clones pMIG-AEfl-TOM	41
6.4	Testes de expressão da construção pMIG-AEfl-TOM	42
6.4.1	Fluorescência de dTOMATO	42
6.4.2	Expressão proteica de <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	43
6.5	Estabelecimento de linhagens Ba/F3 superexpressando <i>IL7R</i> e <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	44
6.5.1	Preparo dos plasmídeos contendo <i>IL7R</i> selvagem e mutado	44
6.5.2	Transdução de Ba/F3 por meio de espinoculação	45
7	CONCLUSÃO	50
8	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda

Leucemias são tipos de câncer hematológicos, caracterizadas pela transformação maligna e expansão clonal de células progenitoras hematopoiéticas, que adquirem vantagens proliferativas e alterações em mecanismos celulares e moleculares durante o processo de diferenciação. A leucemia linfoblástica aguda (LLA) emerge a partir da transformação de precursores linfoides na medula óssea ou no timo e sua propagação no sangue periférico e tecidos linfoides secundários. De maneira geral, as LLAs podem ser consideradas doenças heterogêneas, contendo diversas classificações de subtipos baseadas em características clínicas e morfologia dos blastos leucêmicos, assim como características imunofenotípicas, citogenéticas e moleculares (PUI et al., 2008; TEITELL, PANDOLFI, 2009).

Dependendo da linhagem celular acometida (precursores de linfócitos-T ou -B), a leucemia será denominada como leucemia linfoblástica de células-T (LLA-T) ou de células-B (LLA-B). O pico de incidência destas doenças está entre 3 e 7 anos de idade, sendo que cerca de 75% dos casos acomete crianças de até 6 anos. As LLAs são também o tipo de leucemia mais comum em pacientes até 19 anos de idade, representando três-quartos dos casos. LLA-T representa 10-15% dos casos de LLA infantil e 20-25% dos casos de LLA adulta, enquanto LLA-B acomete os outros 85% e 75% dos pacientes, respectivamente (HOFFBRAND, MOSS, 2013). Embora menos frequente, LLA-T tende a apresentar pior prognóstico que LLA-B (GREAVES, 2006). Contudo, o desenvolvimento de tratamentos direcionados, contando com tecnologias como perfilamento genético, elevou as taxas de cura de LLA-T infantil acima de 80% e garante mais de 10 anos de sobrevida livre da doença (PUI, EVANS, 2006; VITALE et al., 2006).

A Organização Mundial da Saúde agrupa informações de estudos científicos que incluem biomarcadores de diagnóstico e prognóstico no *World Health Organization (WHO) Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, atualmente em sua quarta edição, a fim de classificar os subtipos da doença e organizar dados relevantes para prognóstico e escolha de tratamentos (ARBER et al., 2016).

1.2 Alterações Genéticas em LLA-T

O processo de transformação dos precursores linfoides resulta do acúmulo de anormalidades genéticas, incluindo alterações cromossômicas estruturais, como aneuploidias e rearranjos cromossômicos, variação no número de cópias, inserções e deleções (BELVER, FERRANDO, 2016). As primeiras mutações (chamadas de *drivers* ou promotoras) possivelmente se originam no progenitor hematopoiético, alterando as capacidades de proliferação e diferenciação. O surgimento e o acúmulo de mutações adicionais (chamadas de cooperativas) permitem a efetivação do completo estado leucêmico. Embora muitas descobertas tenham sido essenciais para melhorias nos tratamentos de subtipos específicos de LLAs, casos de recidiva ainda são frequentes. Isso sugere que alterações de menores proporções envolvendo oncogenes cooperativos podem desempenhar papéis na leucemogênese em casos de supressão das mutações promotoras (PUI et al., 2008; TEITELL, PANDOLFI, 2009).

Em LLA-T, as alterações mais recorrentes envolvem genes que participam da hematopoiese e do ciclo celular, modificadores epigenéticos, a maquinaria ribossomal, sinalização de NOTCH1 e transdução de sinal (CHEN et al., 2018; NEUMANN et al., 2015). Dentre os fatores de transcrição alterados frequentemente em LLA-T destacam-se *TAL1* (APLAN et al., 1992; XIA et al., 1991), *LYL1* (MELLENTIN et al., 1989), *HOX11* (HATANO et al., 1991), *LMO1* e *LMO2* (VALGE-ARCHER et al., 1994; VAN VLIERBERGHE et al., 2006). Já dentre os genes que codificam modificadores de cromatina, receptores de membrana ou sinalizadores intracelulares, são comuns alterações em *NOTCH1* (ELLISEN et al., 1991) e seus genes-alvo (ALLENSPACH et al., 2002; PALOMERO et al., 2006; WENG et al., 2004), em *FBXW7* (O'NEIL et al., 2007), *INK4* (SHERBORNE et al., 2010) e *IKZF1* (MULLIGHAN et al., 2007). Em menores proporções, são encontradas mutações em receptores de citocinas e suas moléculas sinalizadoras, como *IL7R*, *CRLF2*, *FLT3*, *JAK1*, *JAK2* (LIU et al., 2017; ROBERTS et al., 2012; ZHANG et al., 2012). As fusões gênicas provindas de translocações cromossômicas mais frequentes envolvem os genes *MLL* (ARMSTRONG et al., 2002) e *ABL1* (LAURENT et al., 2001), tanto em LLA-T quanto em LLA-B.

1.3 IL-7 na hematopoese

A interleucina-7 (IL-7) é membro de uma família de peptídeos sinalizadores que serve de ligante a receptores formados por uma cadeia α específica juntamente com a cadeia comum gama (γ c ou CD132) (ROCHMAN et al., 2009). IL-7 participa ativamente da hematopoese, onde foi descoberta como fator de crescimento de células progenitoras (NAMEN et al., 1988). Células epiteliais de tecidos linfopoéticos, como medula óssea, timo e baço, são as principais secretoras de IL-7 no organismo (OOSTERWEGEL et al., 1997; WILES et al., 1992), mas níveis menores de IL-7 podem ser obtidos de queratinócitos (HEUFLER et al., 1993), hepatócitos (GOLDEN-MASON et al., 2001), células epiteliais do intestino (MADRIGAL-ESTEBAS et al., 1997), células endoteliais, monócitos, linfócitos-B e células dendríticas do sistema imune (KRONCKE et al., 1996; SORG et al., 1998).

Em condições fisiológicas normais, os níveis de IL-7 circulante em humanos variam de 2 a 8 pg/mL. Essa quantidade é relativamente baixa em comparação ao número de linfócitos do sangue, o que previne estimulação excessiva e garante que cada célula refine sua responsividade ao estímulo aumentando ou diminuindo a expressão do receptor (MAZZUCHELLI, DURUM, 2007). Em humanos, a deficiência na sinalização de IL-7 compromete a maturação de células-T, enquanto os níveis de células-B e *natural killers* (NK) circulantes se mantêm quase normais nas condições de baixa de IL-7 (PUEL et al., 1998). Contudo, defeitos genéticos que comprometem a sinalização dessa citocina geram síndrome de imunodeficiência combinada severa (SCID) ainda na fase infantil (MACCHI et al., 1995; PUCK et al., 1993; PUEL et al., 1998).

O estímulo de IL-7 influencia o rearranjo das cadeias específicas de células linfoides em desenvolvimento, promovendo rearranjo das cadeias γ através da acetilação de histonas em células-T do tipo $\gamma\delta$ (SCHLISSEL et al., 2000), e inibindo rearranjo prematuro de cadeias leves das imunoglobulinas em células pró-B (NODLAND et al., 2011). Além de estimular o desenvolvimento de progenitores linfoides, IL-7 é essencial para a homeostase de células-T, promovendo saída de células maduras do timo para o sangue (CHU et al., 2004) e propiciando sinais de sobrevivência para quase todos os tipos de células-T circulantes, desde as típicas $\alpha\beta$ até as incomuns $\gamma\delta$ (MARASKOVSKY et al., 1996), células-NK (YU et al., 1998), células inatas (JACOBS et al., 2010) e células-T regulatórias (Treg)

(MAZZUCHELLI et al., 2008). IL-7 mantém células-T *naïve* em interfase juntamente com os estímulos de peptídeos do complexo principal de histocompatibilidade (pMHC) e estimula ocasionais divisões de células-T *memory* juntamente com IL-15 (SCHLUNS et al., 2000; TOUGH et al., 1994). A organogênese de linfonodos e desenvolvimento de órgãos linfáticos secundários também depende de IL-7, que regula a sobrevivência de células indutoras de tecido linfoide (LTi) (KANG, COLES, 2012). Dessa forma, IL-7 é a principal citocina reguladora do equilíbrio populacional de linfócitos-T no sangue.

1.4 Receptor de IL-7 e sua sinalização

IL-7 serve de ligante a um receptor heterodimérico formado pelas cadeias γ_c e IL-7R α (CD127), que também pode heterodimerizar com TSLPR (CRLF2) para servir de receptor à citocina TSLP (PARK et al., 2000; SIMS et al., 2000). IL-7R α é uma proteína pertencente à família dos receptores de citocina tipo I (hematopoetinas), codificada pelo gene *IL7R*, que está no locus 5p13.2 do genoma humano e tem 22728 bp e 8 exons (RIBEIRO, BARATA, 2014). O transcrito regular possui 4619 nucleotídeos e produz uma forma peptídica transmembrana com 459 aa e cerca de 50 kDa. *Splicing* alternativo com exclusão do exon 6 gera uma forma solúvel de IL-7R α (GOODWIN et al., 1990).

Os domínios de interação importantes para as funções de sinalização em IL-7R α incluem um motivo WSXWS e regiões de fibronectina tipo III com resíduos de cisteína em sua parte ectópica, para interação com o ligante, assim como um domínio BOX1 e resíduos de tirosina em sua cauda citosólica, onde interage com moléculas sinalizadoras intracelulares (LIN et al., 1995, VENKITARAMAN, COWLING, 1994).

A subunidade γ_c é amplamente expressa em células hematopoéticas, enquanto a expressão de IL-7R α é cuidadosamente regulada nos tipos celulares que necessitam sua sinalização. Progenitores linfoides comuns da medula óssea expressam níveis substanciais de IL-7R α , mas os progenitores linfoides do timo não expressam (JIANG et al., 2005). Durante a linfopoese-T, células pró-T DN2 (duplo negativas) expressam os maiores níveis de IL-7R α , que diminuem consideravelmente na fase pré-T DN4 e cessam durante o estágio DP (duplo positivo). Os linfócitos-T SP (positivo imaturo) emigrantes do timo voltam a expressar

IL-7R α para garantir sobrevivência nos nichos de atuação. Linfócitos-T *naïve* expressam IL-7R α constantemente, mas perdem a expressão quando ativados, permitindo que mais IL-7 fique disponível para linfócitos ainda inativados. Caso torne-se um linfócito-T *memory*, voltará a expressar níveis regulares de IL-7R α (GAO et al., 2015; MAZZUCHELLI, DURUM, 2007). Células-T dos tipos LTi e Treg expressam IL-7R α em níveis menores que os linfócitos *naïve* e *memory* (CRELLIN et al., 2010). Na linfopoiese-B, apenas o estágio inicial de célula pró-B expressa IL-7R α (LUNDSTRÖM et al., 2012; PARRISH et al., 2009). Algumas células mieloides residentes do timo, como macrófagos e neutrófilos, expressam baixos níveis de IL-7R α (SCHLENNER et al., 2010).

A forma solúvel de IL-7R α circula pelo sangue e compete por ligante com as formas ancoradas à membrana, porém com menor afinidade. Este fato, juntamente com as baixas concentrações de IL-7 circulante, garantem maior bioatividade de IL-7 ao prevenir estímulo excessivo das células-alvo (LUNDSTRÖM et al., 2013).

Heterodímeros de IL-7R α e γ c são constantemente feitos e desfeitos na membrana, com suas porções citosólicas a uma distância de aproximadamente 110 Å. IL-7R α pode ser glicosilado, o que aumenta seu potencial eletrostático e promove aumento da afinidade por IL-7. Quando o ligante é associado aos receptores e o complexo ternário IL-7R α – γ c–IL-7 é formado (figura 1), os receptores sofrem uma torção de cerca de 90° da superfície da membrana, o que traz suas cadeias citosólicas para menos de 30 Å de proximidade e permite início das etapas de transdução de sinal (MCELROY et al., 2009, MCELROY et al., 2012).

Figura 1. Modelo computacional do posicionamento das cadeias IL-7R α (azul) e γ c (marrom) ao interagir com o ligante IL-7 (cor-de-rosa). Fonte: NCBI *database*.

O motivo BOX1 é conservado em todos os receptores de citocinas tipo I e seus oito resíduos de aminoácidos servem de ancoragem para Janus-quinases (JAKs) através de interações não-covalentes. No caso de IL-7R α , esse motivo está na região intracelular proximal a membrana e retém uma JAK1 (LIN et al., 1995; YAMAOKA et al., 2004). Através da interação de IL-7 com IL-7R α e γ_c na região extracelular, JAK1 é aproximada de uma JAK3, contida na porção citosólica de γ_c . JAK1 e JAK3 se fosforilam mutuamente (FOXWELL et al., 1995) e fosforilam o resíduo Y449 de IL-7R α , que por sua vez, serve como sítio de ancoragem temporária para proteínas contendo domínios SH2, como as proteínas STAT (*signal transducer and activator of transcription*) (LIN et al., 1995).

STAT1, STAT3 e STAT5 são responsivas à sinalização de IL-7R α , mas somente a atividade de STAT5 é perdida com o bloqueio do sítio Y449 de IL-7R α , sugerindo um papel de destaque para este sinalizador (JIANG et al., 2004). STAT5 funciona como um dímero composto por STAT5A e STAT5B, que é recrutado para a região citosólica de IL-7R α e fosforilado por JAK1, seguindo então para o núcleo onde vai promover transcrição de seus genes-alvo (ABRAHAM et al., 2005; QIN et al., 2001). A sinalização de IL-7 através da via JAK-STAT promove resistência a apoptose, ativando transcrição de genes antiapoptóticos e aumento das proteínas Bcl-2 (BAO et al., 1999), Bcl-xL (SOCOLOVSKY et al., 2001) e Mcl-1 (NOSAKA et al., 1999). Supressão de genes pró-apoptóticos, como BAX e BAD, e diminuição da atividade de Bim em promover poros mitocondriais também são estimuladas como resultado da ativação de STAT5 (CHETOUI et al., 2010, GAO et al., 2015) (figura 2).

Outra proteína que é recrutada ao sítio Y449 fosforilado de IL-7R α é a subunidade p85 α da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), que também sofre fosforilação pela ação das JAKs. Após fosforilada, p85 α se une à outra subunidade de PI3K, p110 γ , que permanece ancorada na membrana celular. A partir de então, PI3K está ativada e modifica os domínios lipídicos da parte interna da membrana a partir de fosforilações de PIP2, criando sítios de ancoragem lipídica PIP3 para outras proteínas (FRUMAN et al., 1999). Uma das proteínas mais responsivas nessa via de sinalização é AKT, também conhecida como proteína quinase B (DADI, ROIFMAN, 1993; DATTA et al., 1999), que promove progressão de ciclo celular, pela diminuição dos níveis de p27^{kip1}, e induz sobrevivência, pela inativação de proteínas pró-apoptóticas (BARATA et al., 2001, FUJITA et al., 2002) (figura 2).

Figura 2. Representação esquemática das principais vias de sinalização de sobrevivência ativadas pelo estímulo de IL-7.

As vias de sinalização JAK-STAT e PI3K-AKT apresentam certa sobreposição. Contudo, estudos utilizando células tumorais (SILVA et al., 2011) ou linhagens imortalizadas (DIBIRDIK et al., 1991) em comparação com estudos *in vivo* (OSBORNE et al., 2007) ou envolvendo culturas primárias (LALI et al., 2004) indicam que a sinalização de PI3K-AKT é favorecida quando o estímulo de IL-7 é prolongado ou a célula-alvo expressa altos níveis do receptor. Em vista disso, há uma certa inclinação a distinguir uma importância maior de JAK-STAT para desenvolvimento e homeostase de linfócitos normais e maior destaque para PI3K-AKT nas condições neoplásicas (CARRETE, SURH, 2012; CRAWLEY et al., 2014).

1.5 Mutações de *IL7R* em leucemias

Tendo em vista a grande importância da sinalização de IL-7Rα na hematopoese e homeostase de linfócitos-T, a presença de mutações em *IL7R*, ou em genes que codifiquem e regulem moléculas relacionadas às suas vias de sinalização, está relacionada a emergência e manutenção de doenças hematológicas. Enquanto as mutações inativadoras podem causar quadros de imunodeficiência, as mutações ativadoras ou de ganho-de-função geralmente ocasionam neoplasias, incluindo as leucemias. Mutações ativadoras em *IL7R* são mais frequentes em LLA-T e menos recorrentes em LLA-B (KIM et al., 2013).

Diferentes estudos descreveram mutações do tipo inserção ou deleção-inserção que afetam o exon 6 de *IL7R* e resultam em uma proteína com 3-7 aminoácidos adicionais na região extracelular-justamembrana (EJM) de IL-7R α . Essas mutações foram encontradas em 9-10,5% dos pacientes com LLA-T infantil (SHOCHAT et al., 2011; ZENATTI et al., 2011) e em 3,75% dos pacientes com LLA-pré-B (SHOCHAT et al., 2011). Embora a combinação de aminoácidos não-naturais fosse variável entre os pacientes, havia presença de cisteína na grande maioria. Nestes casos, duas cadeias IL-7R α mutadas interagem através da formação de pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína (figura 3B), formando um homodímero que ativa constitutivamente as vias de sinalização *downstream* através da aproximação de suas caudas citosólicas e trans-fosforilação das JAK1 (ZENATTI et al., 2011). Ademais, determinadas combinações de aminoácidos, como um resíduo de prolina em sequência à cisteína (figura 3C), afetam também a conformação das caudas citosólicas e a frequência de interação das JAK1, resultando em fenótipos oncogênicos mais pronunciados (DURUM, 2014).

Outros tipos de mutações encontradas no exon 6 de *IL7R* geram fenótipos que não incluem adição de resíduos de cisteína. Entre estes exemplos, algumas mutações causam uma alteração na conformação de hélice da região transmembrana (TM) de IL-7R α (figura 3D), favorecendo a homodimerização de duas cadeias mutadas e sinalização constitutiva através da aproximação de suas porções citosólicas (SHOCHAT et al., 2014). Um terceiro tipo de mutações descritas para *IL7R* gera adição de resíduos de aminoácidos básicos, como arginina ou histidina, na região EJM de IL-7R α (figura 3E). Esses resíduos carregados positivamente engajam em interações eletrostáticas com a cadeia γ_c , o que aumenta em até dez vezes a sensibilidade do receptor ao ligante e estabiliza mais rapidamente a formação do complexo terciário IL-7R α – γ_c –IL-7, acelerando a ativação das vias *downstream* (CAMPOS et al., 2019).

Figura 3. Comparação dos mecanismos de ativação de IL-7Rα selvagem (A) e contendo diferentes tipos de mutações (B-E); EJM=extracelular-justamembrana; TM=transmembrana.

Por fim, mutações menos recorrentes, presentes em 3% dos pacientes com LLA-pré-B, afetam o exon 5 de *IL7R* (SHOCHAT et al., 2011). Essas mutações geram a troca de um resíduo de serina por cisteína na região extracelular (EC) da proteína, o que resulta na formação de homodímeros e ativação das vias de forma semelhante àquela descrita para as mutações de cisteína na região EJM.

Para este estudo, foram escolhidas três mutações de *IL7R* representativas de casos descritos na literatura: G2-1, P2 e RRI (figura 4), todas afetando a região EJM de IL-7Rα. A mutação artificial G2-1 simula o fenótipo mais comumente encontrado nos casos de mutações de *IL7R* em LLA: substituição de um resíduo de leucina por cisteína na posição 242 da cadeia de aminoácidos. A mutação P2 mimetiza uma

alteração genética encontrada em um paciente com LLA-T, considerada de alto potencial oncogênico por apresentar inserção de resíduos de cisteína-prolina-treonina após o aminoácido de posição 244. A mutação RRI consiste em deleção do resíduo de leucina na posição 243 e inserção de resíduos de arginina-arginina-isoleucina, sendo essa a mutação encontrada no paciente com LMA de subtipo FAB-M2 (*French-American-British classification*; BENNETT et al., 1976) descrita por Kim e colaboradores (KIM et al., 2013). Outra alteração genética encontrada no mesmo paciente com LMA foi a presença de *RUNX1-RUNX1T1*.

Figura 4. Posicionamento das mutações G2-1 (del.L-ins.C), RRI (del.L-ins.RRI) e P2 (ins.CPT) na cadeia proteica de IL-7R α . Fonte: adaptado de Zenatti et al., 2011.

O gene de fusão *RUNX1-RUNX1T1* (inicialmente conhecido como *AML1-ETO*), resultante da translocação cromossômica t(8;21)(q22;22), codifica uma proteína quimérica que serve como competidor dominante-negativo aos genes-alvo do fator de transcrição hematopoético RUNX1, desregulando a hematopoese de linhagens mieloides (NUCIFORA, ROWLEY, 1995). A presença de *RUNX1-RUNX1T1* define um subgrupo próprio de LMA com anormalidades genéticas recorrentes na classificação WHO, e é encontrada comumente em LMAs do subtipo FAB-M2, e com menos frequência nos subtipos FAB-M1 e -M4 (KROES, STEVENS-KROEF, 2016).

Embora a presença da proteína quimérica *RUNX1-RUNX1T1* seja recorrente em pacientes com LMA, sua presença parece não ser suficiente para gerar um quadro leucêmico, pois diferentes estudos mostraram que a introdução artificial somente de *RUNX1-RUNX1T1* não é suficiente para causar leucemia em modelos animais (DE GUZMAN et al., 2002; SCHWIEGER et al., 2002). De forma

semelhante, a superexpressão de *IL7R* ou inserção de mutações nesse gene somente induzem leucemia *in vivo* mediante condições específicas, como o uso de transgene com promotor induzível (SILVA et al., 2012) ou mediante presença de outras mutações, em *NOTCH1* (YOKOYAMA et al., 2013) por exemplo.

Com base nestas informações e na observação da coocorrência de uma mutação em *IL7R* e presença do gene de fusão *RUNX1-RUNX1T1* em um paciente diagnosticado com LMA e histórico de LLA (KIM et al., 2013), nós hipotetizamos que a proteína de fusão RUNX1-RUNX1T1 e IL-7R α mutado podem ter efeitos oncogênicos aditivos, e assim levar à transformação de precursores hematopoéticos.

2 OBJETIVO GERAL

Para testar nossa hipótese, o objetivo deste trabalho foi buscar verificar um possível papel oncogênico cooperativo entre *IL7R* mutado e *RUNX1-RUNX1T1* na transformação de células linfoides.

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1 Avaliar a capacidade proliferativa autônoma de células Ba/F3 abrigando mutações em *IL7R*.

3.2 Construir vetor retroviral contendo o gene de fusão *RUNX1-RUNX1T1* e o marcador dTOMATO (MIG-R1-HA-AML1ETO-IRES-dTOMATO).

3.3 Gerar linhagens estáveis de células Ba/F3 superexpressando *IL7R* mutado (G2-1, P2, RRI) em conjunto com o gene de fusão *RUNX1-RUNX1T1*.

3.4 Avaliar o efeito da expressão combinada de mutações em *IL7R* e *RUNX1-RUNX1T1* na proliferação autônoma de células Ba/F3.

4 MATERIAIS

4.1 Vetores e Construções Plasmidiais

- MSCV-IRES-GFP (pMIG): vetor retroviral bicistrônico de alta eficiência replicativa; contém um sítio de clonagem, um sítio de entrada interna de ribossomo (IRES) e região codificadora da proteína fluorescente verde (GFP); addgene plasmid #20672 (REYA, 2009 – *unpublished*).
- CMV-LXSN-Ectotropic (pCL-Eco): vetor de empacotamento retroviral direcionado a células murinas; contém antígenos de grupo (gag), transcriptase reversa (pol) e proteínas de envelope (env); addgene plasmid #12371 (NAVIAUX et al., 1996).
- Construções do gene *IL7R* em sua forma selvagem (pMIG-IL7R-WT) e em três formas mutadas (pMIG-IL7R-G2-1, pMIG-IL7R-P2, pMIG-IL7R-RRI) clonados em pMIG (CAMPOS et al., 2019; ZENATTI et al., 2011); cedidas pelo pesquisador José Andres Yunes (Centro Infantil Boldrini, Campinas).
- MIG-R1-HA-AML1ETO-IRES-eGFP (pMIG-AEfl-GFP): vetor retroviral modificado de pMIG, contém sequência codificadora da proteína de fusão RUNX1-RUNX1T1 com *tag* HA e o gene de eGFP (YAN et al., 2004); cedido pelo pesquisador Christian Wichmann (Universidade de Munique, Alemanha).
- MIG-R1-HA-AML1ETOtruncated-IRES-dTOMATO (pMIG-AEtr-TOM): vetor retroviral modificado de pMIG, contém sequência codificadora de RUNX1-RUNX1T1 truncado com *tag* HA e o marcador dTOMATO (YAN et al., 2004); cedido pelo pesquisador Christian Wichmann.

4.2 Linhagens Celulares Parentais

- Ba/F3: linhagem de pró-linfócitos-B murinos dependentes de interleucina-3 (IL-3) para crescimento em cultura (PALACIOS et al., 1984); linhagem cedida pelo pesquisador José Andres Yunes (Centro Infantil Boldrini, Campinas).
- WEHI-3B: linhagem derivada de sangue periférico murino, produtora estável de IL-3 em cultura (LEE et al., 1982); linhagem cedida pela pesquisadora Fabíola Traina (Departamento de Clínica Médica – FMRP-USP).

- 293T: linhagem derivada de epitélio renal embrionário humano (HEK293) com alta susceptibilidade para transfecção e montagem transiente de vírus (PEAR et al., 1993).
- HeLa: linhagem originada de câncer de colo do útero.

4.3 Linhagens Celulares Estabelecidas

- E86-MIG: células empacotadoras de retrovírus, que produzem constantemente meio condicionado viral (VCM) contendo o cassete do vetor pMIG vazio.

As linhagens abaixo descritas foram cedidas pelo pesquisador José Andres Yunes (Centro Infantil Boldrini, Campinas):

- Ba/F3-IL7R-WT: células Ba/F3 transduzidas com partículas retrovirais que carregam em seu genoma o cassete do vetor pMIG-IL7R-WT e superexpressam o gene *IL7R* em sua forma selvagem.
- Ba/F3-IL7R-G2-1: células Ba/F3 transduzidas com partículas retrovirais que carregam em seu genoma o cassete do vetor pMIG-IL7R-G2-1 e superexpressam o gene *IL7R* com a mutação G2-1.
- Ba/F3-IL7R-P2: células Ba/F3 transduzidas com partículas retrovirais que carregam em seu genoma o cassete do vetor pMIG-IL7R-P2 e superexpressam o gene *IL7R* com a mutação P2.

4.4 Oligonucleotídeos

Primers utilizados para estratégia de clonagem:

- AML1ETO FW: 5'-ATCTCTCACCGTACTAAGGC-3'.
- AML1ETO REV: 5'-TTTGCGGCCGCTTAGCGAGGGGTTGTCTCTATG-3' (inclui códon artificial de parada de tradução e sítio para reconhecimento da enzima de restrição NotI).

Primers utilizados para sequenciamento:

- AML1ETO SeqFW: 5'-AGAGTGGAAACATCTTGACC-3'.
- IRES SeqREV: 5'-AACATATAGACAAACGCACAC-3'.

4.5 Citocinas

- IL-3 recombinante (PeproTech - #213-13).

4.6 Anticorpos

Anticorpos primários:

- *Mouse* anti-STAT5 (Santa Cruz Biotechnologies - SC74442); diluição 1:1000.
- *Rabbit* anti-p-STAT5 (Cell Signaling - #9359S); diluição 1:1000.
- *Rabbit* anti-AKT (Santa Cruz Biotechnologies - SC8312); diluição 1:1000.
- *Rabbit* anti-p-AKT (Santa Cruz Biotechnologies - SC7985-R); diluição 1:1000.
- *Rabbit* anti-BAD (Santa Cruz Biotechnologies - SC943); diluição 1:1000.
- *Goat* anti-p-BAD (Santa Cruz Biotechnologies - SC7999); diluição 1:1000.
- *Rabbit* anti-HA (Cell Signaling - #3724S); diluição 1:2000.
- *Goat* anti- β -actina IgG (Santa Cruz Biotechnologies - SC1616); diluição 1:4000.

Anticorpos secundários:

- *Goat* anti-*mouse* IgG (Santa Cruz Biotechnologies - SC2005); diluição 1:4000.
- *Goat* anti-*rabbit* IgG (Cell Signaling - #7074P2); diluição 1:4000.
- *Donkey* anti-*goat* IgG (Santa Cruz Biotechnologies - SC2020); diluição 1:4000.

4.7 Enzimas de Restrição

- BamHI (*Fast Digest*[™] - #FD0054).
- BglII (*Fast Digest*[™] - #FD0083).
- EcoRI (*Fast Digest*[™] - #FD0274).
- HindIII (*Fast Digest*[™] - #FD0504).
- NotI (Anza[™] - IVGN0014).

5 MÉTODOS

5.1 Cultivo de Células

As linhagens Ba/F3 (parental e estabelecidas) foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10 ng/mL de IL-3 recombinante ou com 10% de meio condicionado contendo IL-3 (VCM). WEHI-3B foi cultivada em meio IMDM com 5×10^{-5} M de β -mercaptoetanol. Ba/F3 e WEHI-3B são linhagens hematopoiéticas e crescem em suspensão. As linhagens E86-MIG, 293T e HeLa são células aderentes e foram cultivadas em meio DMEM.

Todos os meios de cultivo foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução de antibióticos (estreptomicina/penicilina), exceto quando indicado. Todas as linhagens foram cultivadas em condições padrão (37 °C, 5% CO₂).

5.2 Produção de meio condicionado contendo IL-3

Aproximadamente 10^8 células da linhagem WEHI-3B foram divididas entre 5 frascos de cultura de 175 cm² contendo 100 mL de meio. Após 48 h, as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 15 min, o sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro Whatmann 0,2 μ m. O meio condicionado com IL-3 foi armazenado a -20 °C para uso a longo prazo.

5.3 Produção de meio condicionado contendo partículas retrovirais pMIG

Aproximadamente 10^7 células da linhagem E86-MIG foram cultivadas em placa de 100 mm contendo 10 mL de meio. Após 24 h, o meio foi coletado e filtrado em filtro PES 0,45 μ m. O meio condicionado com partículas retrovirais pMIG foi aliquotado e armazenado a -80 °C para uso a longo prazo.

5.4 Teste de viabilidade (MTT)

Para verificar a proliferação autônoma de células Ba/F3, 2×10^4 células por poço foram semeadas em placas de 96 poços e cultivadas em 100 μ L de meio com ou sem IL-3. A viabilidade das populações foi medida em 4 tempos distintos: 0, 24, 48 e 72 h, com sextuplicatas técnicas para cada tempo. Nos tempos especificados, foram adicionados 10 μ L de MTT (5 mg/mL) a cada amostra, que foram incubadas a 37 °C por 4 h. Em seguida, os cristais de formazan formados pela metabolização do MTT foram diluídos em 100 μ L de solução HCl-isopropanol (0,2 N) e submetidos a leitura espectrofotométrica em 570 nm. A viabilidade percentual de cada amostra foi calculada como a razão entre a média de absorbância do tempo indicado pela média da mesma amostra em 0 h, multiplicado por 100.

Também foi realizado teste de viabilidade para comparar a capacidade de diferentes concentrações de IL-3 recombinante (1, 2,5, 5, 7,5 e 10 ng/mL) e de meio condicionado com IL-3 (VCM) (1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15% v/v) em sustentarem o crescimento de células Ba/F3. Neste caso, foram semeadas somente células da linhagem parental a uma concentração de $1,8 \times 10^4$ células por poço.

5.5 Transfecção e produção transiente de partículas retrovirais

Para transfecção, 3 mL de meio contendo 2×10^5 células da linhagem HeLa ou 4×10^5 da linhagem 293T foram semeadas em placas de 6 poços. Após 24 h, as amostras foram lavadas com PBS e 1,5 mL de meio optiMEM (sem soro e sem antibióticos) foi adicionado em cada poço. Em paralelo, 3 μ g de DNA e 6 μ g de PEI (polietilenimina Sigma-Aldrich®) foram incubados em 100 μ L de optiMEM por 20 min em temperatura ambiente. Em seguida, 400 μ L de optiMEM foram adicionados em cada reação, gotejadas em cada amostra celular. Após um período de 4 h de incubação a 37 °C, o meio foi trocado por 3 mL de DMEM completo.

Para produção transiente de partículas retrovirais, as construções pMIG contendo os genes de interesse foram transfectadas juntamente com o plasmídeo empacotador pCL-Eco na proporção DNA:PEI de 1:1,5 (3 μ g total de DNA e 4,5 μ g de PEI). Neste caso, o VCM produzido pelas células transfectadas, contendo as partículas retrovirais, foi coletado 24 e 48 h após a transfecção, filtrado em filtro PES 0,2 μ m e armazenado a 4 °C para uso a curto prazo.

5.6 Transdução por meio de espinoculação

A transdução por espinoculação é utilizada para infecção viral de células em suspensão. Foram misturados 2 mL de VCM produzido conforme o item anterior e 8 µg de polibreno (brometo de hexadimetrina Sigma-Aldrich®), incubados por 10 min a temperatura ambiente, e utilizados para ressuspender 10^6 células Ba/F3. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1800 rpm por 90 min em tubos de fundo redondo. Após, as células foram ressuspensas no próprio meio contendo polibrene e partículas retrovirais, onde foi adicionado 2 µL de VCM contendo IL-3, e transferidas para placas de 6 poços para incubação a 37 °C por 4 h. Após este período, o meio utilizado na espinoculação foi substituído por meio de cultivo padrão e as células cresceram por até 48 h. As células eficientemente transduzidas foram selecionadas em função da expressão positiva de GFP, TOMATO ou ambas as proteínas fluorescentes por meio de *cell sorting* no equipamento BD FACS Aria™ Fusion.

5.7 Visualização de células por microscopia de fluorescência

Aproximadamente 24 h após transfecção, células HeLa tiveram seu meio trocado por 1 mL de PBS e foram visualizadas em microscópio de fluorescência Leica DMI6000 B. Para visualização da expressão de GFP foi utilizado o canal de excitação em verde com Laser HeNe 561, e para visualização da expressão de TOMATO foi utilizado o canal de excitação em vermelho com Laser HeNe 633.

5.8 Western blot

Células em cultura foram submetidas a lise através de ressuspensão em 200 µL de tampão de extração de proteínas (tabela 1) e incubação em gelo por 120 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 xg e 4 °C por 10 min. O sobrenadante contendo o extrato proteico foi utilizado para quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford e armazenado a -20 °C por curto prazo.

A separação das cadeias proteicas de diferentes pesos moleculares foi realizada através de eletroforese em gel de acrilamida. Para tal, 50 µg de proteína total de cada amostra foram diluídos em tampão Laemmli de amostra 2x (tabela 1) e desnaturadas a 95 °C por 5 min. A eletroforese foi realizada por 15 min a 60 V em

gel de empilhamento 10% (tabela 1), seguido de 150 min a 120 V em gel de separação 10% (tabela 1) com tampão de corrida 1x (tabela 1).

Na etapa seguinte, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose em sistema de transferência *semi-dry* (Bio-Rad Trans-Blot® *Semi-Dry Transfer Cell*) por 80 min a 15 V com tampão de transferência (tabela 1). As membranas foram bloqueadas com solução de leite magro 5% em TBS-tween por 1 h sob agitação leve, seguido de incubação *overnight* a 4 °C, com os anticorpos primários diluídos em solução de leite 5% em TBS. As amostras foram lavadas três vezes com TBS-tween e o anticorpo secundário diluído em solução de leite 5% em TBS-tween foi adicionado e incubado em temperatura ambiente por 45 min. Após novas lavagens, as membranas foram reveladas com auxílio de reagente ECL (tabela 1) misturado a H₂O₂ 30% no aparelho ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences®).

Por fim, as membranas foram submetidas a *stripping* através da incubação com tampão de *stripping* comercial (Thermo Fisher®) a 37 °C por 10 min e bloqueadas novamente com solução de leite magro 5% em TBS-tween por 1 h sob agitação leve. As amostras foram então incubadas com outros anticorpos primários e secundários ou secas em temperatura ambiente e armazenadas a -20 °C.

Tabela 1. Tampões e géis utilizados no *western blot*.

Tampão para extração de proteínas (armazenado a -20 °C)	EDTA 10 mM trizma 100 mM pirofosfato de sódio 10 mM fluoreto de sódio 100 mM ortovanadato de sódio 100 mM PMSF 100 mM aprotinina 1 mg/mL triton 10% v/v
Tampão Laemmli <i>stacking</i> 2,5x (armazenado a -20 °C)	300 µL tris HCl 0,3 M pH 6,8 25 µL SDS 10% 675 µL H ₂ O deionizada
Tampão Laemmli de amostra 2x (armazenado a -20 °C)	1 mL β-mercaptoetanol 6 mL SDS 10% 2 mL glicerol azul de bromofenol 100 µL Laemmli <i>stacking</i> 2,5x 900 µL H ₂ O deionizada
Tampão para gel de separação (armazenado a temperatura ambiente)	0,1488 g EDTA 4 mM 2 g SDS 9,055 g trisma base 750 mM pH 8,9 100 mL H ₂ O deionizada
Tampão para gel de empilhamento (armazenado a temperatura ambiente)	0,1488 g EDTA 4 mM 2 g SDS 1,21 g trisma base 50 mM pH 6,7 100 mL H ₂ O deionizada
Tampão de corrida 4x (armazenado a 4 °C)	24,225 g trisma base 200 mM 114 g glicina 1,52 M 2,675 g EDTA 7,18 mM 4 g SDS 1 L H ₂ O deionizada
Tampão de transferência (armazenado a 4 °C)	3,025 g trisma base 25 mM 14,41 g glicina 192 mM 0,2 g SDS 800 mL H ₂ O deionizada 200 mL metanol
Gel de separação 10%	950 µL H ₂ O deionizada 900 µL glicerol 4,5 mL tampão para gel de separação 2,125 mL acrilamida 40% 12,5 µL TEMED 135 µL APS 10%
Gel de empilhamento 10%	2,1 mL H ₂ O deionizada 2,8 mL tampão para gel de empilhamento 625 µL acrilamida 40% 12,5 µL TEMED 135 µL APS 10%
Reagente ECL	4,75 mL H ₂ O deionizada 250 µL tris-HCl 2 M pH 8,6 11 µL ácido cumárico 25 µL luminol

5.9 Transformação de DNA plasmidial em bactérias

Os plasmídeos utilizados neste trabalho foram transformados em bactérias competentes para expansão clonal. 100 ng de DNA plasmidial, em volume de até 20 µL, foram adicionados a 100 µL de cultura de bactérias quimicamente competentes (*Escherichia coli* DH5α) e incubados em gelo por 40 min. As amostras foram incubadas a 42 °C por 90 seg e novamente em gelo por 2 min. 100 µL de meio Luria-Bertani (LB) fresco foram acrescentados e as amostras descansaram por 30 min a 37 °C sob agitação de 700 rpm. 100 µL de bactérias recuperadas foram espalhadas sobre meio LB-ágar contendo ampicilina (100 µg/mL) em placas de Petri de 100 mm, com auxílio de alça de Drigalski, e incubadas *overnight* para seleção e crescimento das colônias transformadas.

5.10 Extração de DNA plasmidial por MINI-PREP

Colônias de bactérias crescidas isoladamente foram removidas com auxílio de ponteiros, inoculadas em 2 mL de meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubadas *overnight* a 37 °C sob agitação de 170 rpm para extração de DNA plasmidial por MINI-PREP. As bactérias foram centrifugadas a 14000 rpm por 5 min e os pellets foram ressuspensos em 300 µL de tampão de ressuspensão (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNaseA, pH 8) e, em seguida, 300 µL de tampão de lise (200 mM NaOH, 1% SDS) foram adicionados e deixados reagir em temperatura ambiente por 5 min. 300 µL de tampão de neutralização (3 M CH₃CO₂K, pH 5,5) foram adicionados e as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 14000 rpm por 10 min. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos e misturados a 640 µL de isopropanol. As amostras foram incubadas a -20 °C por 10 min e centrifugadas a 14000 rpm e 4 °C por 20 min. Os pellets foram lavados em 300 µL de etanol 70% e centrifugados a 14000 rpm e 4 °C por 10 min; as amostras foram secadas em banho-seco a 50 °C por 1 h. O DNA foi ressuspenso em 50-100 µl de água e armazenado a -20 °C.

5.11 Extração de DNA plasmidial por MIDI-PREP

Culturas bacterianas de *E. coli* DH5 α transformadas foram incubadas *overnight* em 25 mL de meio LB contendo ampicilina (100 μ g/mL) sob agitação de 170 rpm para extração de plasmídeo por kit MIDI-PREP (QIAGEN®). As bactérias foram centrifugadas a 5000 xg e 4 °C por 20 min e os pellets foram ressuspensos em 4 mL de tampão P1 (contendo RNase), onde foram adicionados 4 mL de tampão P2 (lise). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 5 min. 4 mL de tampão P3 (neutralização) foram adicionados. As amostras foram incubadas em gelo por 15 min, centrifugadas a 7000 xg e 4 °C por 30 min e os sobrenadantes foram filtrados em colunas de afinidade por DNA previamente lavadas com tampão QBT. Em seguida as colunas foram lavadas com tampão QC. O DNA foi eluído em 5 mL de tampão QF, ao qual foram adicionados 3,5 mL de isopropanol. As amostras foram centrifugadas a 15000 xg e 4 °C por 60 min. Os pellets foram ressuspensos em 2 mL de etanol 70%, centrifugados a 15000 xg e 4 °C por 10 min. Os plasmídeos foram secos em temperatura ambiente e ressuspensos em 100 μ L de água miliQ para armazenamento. A concentração de DNA nas amostras foi medida por espectrofotometria (Thermo Scientific® NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis) e as mesmas foram armazenadas a -20 °C.

5.12 Amplificação de DNA por PCR

Para amplificação de um fragmento de aproximadamente 0,7 Kb de DNA plasmidial, foram encomendados os primers descritos em 4.4 (Exxtend®). A reação de PCR foi preparada com 100 ng de DNA molde, 1 μ L de *primer forward* (10 pmol/ μ L), 1 μ L de *primer reverse* (10 pmol/ μ L), 0,4 μ L de dNTPs (25 mM), 5 μ L de tampão contendo MgSO₄ concentrado, 0,5 μ L de Pfu polimerase (2,5 U/ μ L) e água deionizada autoclavada para volume final de 50 μ L, utilizando kit da Thermo Scientific®. A reação ocorreu em termociclador, completando 30 ciclos de desnaturação (95 °C por 30 seg), anelamento (55 °C por 30 seg) e extensão (72 °C por 90 seg).

5.13 Precipitação de DNA com acetato de sódio

Para recuperar DNA de soluções, foi usado um protocolo de purificação com acetato de sódio que consiste em misturar um determinado volume de amostra (DNA em reação) com 10% desse volume de acetato de sódio (3 M) e 2,5x esse volume de etanol. A mistura foi incubada a -20 °C por 10 min e centrifugada a 14000 rpm, 4 °C por 20 min. Após descarte do sobrenadante, foi adicionado 2,5x o volume de amostra inicial de etanol 70% e novamente foi feita centrifugação a 14000 rpm, 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi descartado, o pellet foi seco a temperatura ambiente e diluído em volume variável de água deionizada.

5.14 Eletroforese em gel de agarose

Fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% (agarose, tampão TAE) contendo 1,5 µL de brometo de etídio. Os fragmentos de DNA separados foram visualizados por exposição em UV no aparelho ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences®).

5.15 Extração de DNA em gel de agarose

Para recuperar DNA de géis de agarose, foi utilizado o kit *QIAquick Gel Extraction* da QIAGEN®. Para tal, as bandas de DNA submetidas a eletroforese foram rapidamente visualizadas em exposição à luz UV, excisadas do gel e pesadas. Para cada 100 mg de amostra foi usado 300 µL de tampão QG, incubados a 50 °C por 10 min ou até completa dissolução da agarose. Foi adicionado isopropanol em volume igual ao tampão e as amostras homogeneizadas foram centrifugadas em mini-colunas *QIAspin column* a 13000 rpm por 1 min. As mini-colunas foram lavadas com 700 µL de tampão PE contendo etanol, previamente incubado em temperatura ambiente por 5 min, e em seguida centrifugadas a 13000 rpm por 1 min. O tubo coletor foi descartado e trocado por um minitubo de centrifuga estéril. Foi utilizada água deionizada estéril em volume variável para eluir o DNA da coluna através de incubação a temperatura ambiente por 5 min seguida de centrifugação a 13000 rpm por 90 seg.

5.16 Digestão de DNA com enzimas de restrição

Para digerir amostras de DNA com enzimas de restrição, cerca de 100-300 ng de DNA amostral foram misturados a 2 µL de tampão concentrado e 0,5 µL de cada enzima utilizada na reação, juntamente a água deionizada para um volume final de 20 µL. As reações de digestão ocorreram a 37 °C por 30 min.

5.17 Ligação de inserto em vetor

Inserto e vetor foram preparados com extremidades coesivas pareadas a partir de reação de digestão com enzimas de restrição, conforme descrito acima. Para reação de ligação do inserto no vetor de interesse, foi utilizada a enzima T4 DNA ligase da Thermo Scientific®. A reação foi preparada com 11 µL de água deionizada, 1 µL de inserto (56 ng/µL), 5 µL de vetor (13 ng/µL), 2 µL de tampão concentrado e 1 µL de T4 DNA ligase (5 Weiss U/µL) e incubada a 22 °C por 1 h. O resultado da reação de ligação foi utilizado para transformação em bactérias competentes.

5.18 Sequenciamento de DNA

Amostras de DNA plasmidial foram enviadas para sequenciamento por método de Sanger no Hemocentro de Ribeirão Preto - USP. A reação de PCR para sequenciamento foi preparada misturando 4,5 µL de água deionizada autoclavada, 0,5 µL de DNA (400 ng/µL), 1 µL de *primer forward* ou *reverse* (2,5 pmol/µL), 2 µL de tampão e 2 µL de *Big Dye* (Terminator V3.1 Thermo Fisher®). A reação ocorreu em termociclador por aproximadamente 2,5 h, completando 25 ciclos de desnaturação (95 °C por 10 seg), anelamento (50 °C por 5 seg) e extensão (60 °C por 4 min). Finalizada a reação, o DNA foi precipitado e preparado para sequenciamento pela equipe do hemocentro.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Comparação entre o crescimento de células Ba/F3 cultivadas com IL-3 recombinante e meio condicionado contendo IL-3

Para padronizar as condições de cultivo das células Ba/F3 utilizadas neste estudo, realizamos testes de viabilidade por metabolização do MTT (item 5.4). A linhagem parental foi cultivada por 72 h em meio suplementado com diferentes concentrações de IL-3 recombinante (1, 2,5, 5, 7,5 e 10 ng/mL) ou com meio condicionado contendo IL-3 (1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15% v/v) produzido por WEHI-3B (item 5.2) e a viabilidade foi medida em diferentes tempos. As curvas de crescimento obtidas nesse teste estão apresentadas na figura 5.

Figura 5. Curva de crescimento de células Ba/F3 cultivadas em meio suplementado com IL-3 recombinante ou com meio condicionado contendo IL-3 (VCM) por até 72 horas. Os gráficos representam as médias de três experimentos independentes.

A viabilidade da linhagem cultivada na ausência de IL-3 diminuiu a $43 \pm 7\%$ (linha contínua preta) ao fim do experimento, o que comprova sua dependência do estímulo proliferativo da citocina em cultura.

As concentrações de IL-3 recombinante (linhas coloridas contínuas) testadas geraram aumento de viabilidade semelhantes, com desvios padrão sobrepostos desde a menor concentração ($284 \pm 61\%$ com 1 ng/mL de IL-3; linha contínua amarela) até a maior concentração ($313 \pm 31\%$ com 10 ng/mL de IL-3; linha contínua

verde). Ou seja, o estímulo de 1 ng/μL de IL-3 em cultura gerou um crescimento igual ao estímulo de 10 ng/μL, provavelmente porque mesmo na menor concentração utilizada as moléculas de IL-3 já saturaram seus receptores em cultura, ou foram suficientes para ativar por completo as vias de sinalização *downstream* ao receptor.

Em contrapartida, a viabilidade das células cultivadas sob estímulo do VCM contendo IL-3 (linhas coloridas pontilhadas) apresentou um crescimento gradual e proporcional ao aumento da concentração utilizada, sem sobreposição de desvios padrão de algumas condições distintas, como 1% VCM ($110 \pm 19\%$; linha pontilhada amarela), 2,5% VCM ($169 \pm 19\%$; linha pontilhada vermelha) e 7,5% VCM ($234 \pm 41\%$; linha pontilhada azul). Foi atingido um *plateau* de crescimento entre as concentrações de 10% VCM ($259 \pm 31\%$ de viabilidade; linha pontilhada verde) e 15% VCM ($254 \pm 69\%$ de viabilidade; linha pontilhada marrom).

Podemos observar que as curvas de crescimento com 10% VCM (linha pontilhada verde) e 1 ng/μL de IL-3 recombinante (linha contínua amarela) se sobrepõem, o que nos leva a crer que a concentração de IL-3 contida em 10% de VCM seja equivalente a 1 ng/mL, ambos suficientes para estimular o crescimento de Ba/F3 de maneira semelhante em cultura.

6.2 Caracterização do crescimento de linhagens Ba/F3 superexpressando *IL7R* selvagem e mutado

Para realização deste projeto, linhagens estáveis de Ba/F3 superexpressando o gene *IL7R* em suas formas selvagem, com mutação G2-1 ou com mutação P2 foram cedidas pelo pesquisador José Andres Yunes. A linhagem Ba/F3 em sua forma parental necessita do estímulo proliferativo de IL-3, suplementada em meio de cultivo. A introdução de oncogenes nestas células promove sua transformação através da ativação de vias de proliferação e sobrevivência, o que resulta em crescimento autônomo, ou seja, independente do estímulo desta citocina. As mutações estudadas neste projeto conferem certo grau de autonomia proliferativa a populações de Ba/F3 transformadas e esta capacidade de crescer em ausência da citocina estaria diretamente relacionada ao potencial oncogênico da mutação presente, ou seja, mutações com fenótipo mais agressivo confeririam maior proliferação autônoma à Ba/F3.

Sendo assim, as linhagens Ba/F3-IL7R-WT, Ba/F3-IL7R-G2-1 e Ba/F3-IL7R-P2 foram submetidas a avaliação de crescimento em ausência de IL-3 através do teste de viabilidade por metabolização de MTT (item 5.4) para caracterização indireta dos seus potenciais oncogênicos. A linhagem Ba/F3 parental cultivada em ausência ou presença de IL-3 foi utilizada como controle positivo e negativo, respectivamente. Células Ba/F3 foram transduzidas com retrovírus produzido por E86-MIG (item 5.3), que carrega o cassete do vetor pMIG vazio, gerando a linhagem Ba/F3-MIG, utilizada como controle dos efeitos da integração do cassete retroviral introduzido no genoma da célula. Os resultados desse teste de viabilidade são apresentados na figura 6.

Figura 6. Curva de crescimento de linhagens Ba/F3 na ausência de IL-3, avaliadas por até 72 horas. Os gráficos representam as médias de três experimentos independentes (*exceto BA/F3-MIG, cujo $n=2$). As amostras agrupadas dentro dos mesmos colchetes (ns) não apresentaram diferença significativa de crescimento (ANOVA, Duncan's post-hoc, $p \leq 0,05$).

O crescimento da linhagem Ba/F3 parental foi novamente dependente de IL-3, pois a viabilidade não aumentou nas 72 h de cultivo sem IL-3 (controle negativo; linha azul clara), enquanto o estímulo de IL-3 elevou a viabilidade a $303 \pm 130\%$ no mesmo tempo de análise (controle positivo; linha azul escura). Como esperado, a linhagem Ba/F3-MIG (linha rosa), que não superexpressa *IL7R*, apresentou o mesmo padrão de crescimento que o controle negativo, indicando que a introdução do cassete retroviral no genoma não interferiu em seu padrão de crescimento.

A viabilidade da linhagem Ba/F3-IL7R-P2, cultivada na ausência de IL-3, aumentou para $222 \pm 52\%$ em 72 h (linha vermelha), evidenciando que a mutação confere capacidade proliferativa autônoma à linhagem. A linhagem Ba/F3-IL7R-G2-1 apresentou viabilidade de $178 \pm 57\%$ (linha amarela) ao fim do experimento, havendo uma sobreposição dos desvios padrão da sua curva de crescimento com a de

Ba/F3-IL7R-P2. A diferença na viabilidade destas duas linhagens não foi considerada estatisticamente significativa (ANOVA e Duncan's post-hoc). Isso mostrou que ambas as linhagens apresentavam a mesma taxa de crescimento autônomo, portanto o efeito fenotípico das mutações P2 e G2-1 não diferiu. Ou seja, as linhagens que tínhamos em mãos não reproduziram o padrão de crescimento autônomo (ou potencial oncogênico) previamente reportado, onde P2 proliferava mais que G2-1 (ZENATTI et al., 2011).

Por fim, a linhagem Ba/F3-IL7R-WT apresentou aumento de viabilidade, atingindo $129 \pm 33\%$ em 72 h (linha verde) e sobrepondo seu desvio padrão com o de Ba/F3-IL7R-G2-1. Esta linhagem não deveria proliferar na ausência de IL-3, pois a superexpressão do receptor de IL-7 selvagem por si só não ativa vias de proliferação nesse sistema. O crescimento dessa população sem IL-3 poderia estar ocorrendo devido à expansão de células carregando mutações adicionais adquiridas durante o cultivo prolongado da linhagem, ou pela seleção de células variantes onde mutações pré-existentes somente expressam o fenótipo proliferativo em ausência do fator de crescimento, conforme proposto por Watanabe-Smith (2017). Se tais efeitos tiverem ocorrido, podem também ter modificado o padrão de crescimento esperado das linhagens que carregam *IL7R* mutado.

Estes dados nos mostraram que, com exceção das linhagens controle Ba/F3 parental e Ba/F3-MIG, as demais linhagens obtidas para este estudo não apresentaram os padrões de proliferação esperados. Assim, houve a necessidade de gerarmos novas linhagens para continuidade do trabalho, como descrito adiante.

6.3 Clonagem de *RUNX1-RUNX1T1* em vetor retroviral

6.3.1 Amplificação de *RUNX1-RUNX1T1* e ligação em vetor retroviral

A fim de estudar os possíveis efeitos leucemogênicos cooperativos entre a proteína de fusão RUNX1-RUNX1T1 e o receptor de IL-7 mutado, precisávamos preparar linhagens estáveis de células Ba/F3 carregando simultaneamente o gene de fusão *RUNX1-RUNX1T1* e o gene *IL7R* contendo as mutações G2-1, P2 ou RRI. Como as construções do gene *IL7R* em pMIG expressam a proteína fluorescente GFP, construímos um plasmídeo que expressa RUNX1-RUNX1T1 e a proteína fluorescente dTOMATO.

Em nossa estratégia de clonagem, utilizamos as construções pMIG-AEfl-GFP (contém os genes que codificam a proteína de fusão RUNX1-RUNX1T1 fusionado a *tag* HA e a proteína fluorescente eGFP) e pMIG-AEtr-TOM (contém as sequências codificadoras de RUNX1-RUNX1T1 em sua forma truncada, também fusionado a *tag* HA, e da proteína fluorescente dTOMATO). Com a finalidade de construir um plasmídeo expressando RUNX1-RUNX1T1 em sua forma inteira com marcador dTOMATO, a construção pMIG-AEfl-GFP foi utilizada como molde em reação de PCR (item 5.12) para amplificação da porção final do gene de fusão *RUNX1-RUNX1T1*, sendo este fragmento introduzido na região 3' da região codificadora de RUNX1-RUNX1T1 truncado presente na construção pMIG-AEtr-TOM. A figura 7 traz essa estratégia em forma de esquema.

Figura 7. Esquema de clonagem da porção final do gene fusionante *RUNX1-RUNX1T1* em vetor retroviral contendo o marcador dTOMATO para gerar a construção pMIG-R1-HA-AML1ETO-IRES-dTOMATO.

A porção final amplificada do gene *RUNX1-RUNX1T1* originou um fragmento de cerca de 700 bp, contendo um sítio de reconhecimento para enzima de restrição BamHI (presente originalmente na região amplificada) e um sítio para reconhecimento da enzima NotI (adicionado artificialmente na reação de amplificação por PCR). Uma pequena parte da amostra resultante do PCR foi submetida a eletroforese em gel de agarose (item 5.14) para verificar a presença da banda relativa ao fragmento de ~700 bp (Figura 8A), enquanto o restante da amostra foi purificado a partir de precipitação com acetato de sódio (item 5.13) para recuperação do fragmento amplificado.

Em seguida, o fragmento recuperado e o vetor pMIG-AEtr-TOM foram submetidos a digestões (item 5.16) sucessivas com as enzimas de restrição BamHI e NotI. Ambas as enzimas usadas geram extremidades coesivas. Inseto (693 bp) e vetor linearizado (~9 Kb) foram separados por eletroforese (Figura 8B), purificados do gel de agarose e submetidos à reação de ligação (item 5.17). Ao utilizar duas enzimas distintas, garantimos que o fragmento de *RUNX1-RUNX1T1* fosse inserido em um único sentido no vetor.

Figura 8. Géis de agarose contendo (A) o produto da amplificação de *RUNX1-RUNX1T1* por PCR e (B) inseto e vetor digeridos com BamHI e NotI para ligação.

6.3.2 Transformação e seleção dos clones pMIG-AEfl-TOM

O resultado da ligação do fragmento de *RUNX1-RUNX1T1* em vetor contendo dTOMATO foi transformado em bactérias *E. coli* DH5 α (item 5.9) e 12 clones foram obtidos. O DNA plasmidial de cada clone foi extraído por MINI-PREP (item 5.10) e submetido à digestão com a enzima de restrição BglII, a fim de verificar qual (is) amostra (s) tinha (m) o vetor clonado corretamente. Como o vetor resultante da clonagem teria um sítio BglII dentro da sequência do inseto e outro no vetor, aquelas amostras que tivessem ligado corretamente o inseto apresentariam duas bandas, de 1829 bp e 7946 bp, após separação por eletroforese. Na figura 9A é possível verificar que o vetor foi clonado com sucesso em todos os clones.

O clone 10 foi selecionado para sequenciamento pelo método de Sanger (item 5.18) e o resultado mostrou que a clonagem foi bem-sucedida, não havendo erros na sequência gênica de *RUNX1-RUNX1T1*. A figura 9B mostra o mapa esquemático da construção pMIG-R1-HA-AML1ETO-IRES-dTOMATO (pMIG-AEfl-TOM) obtida ao fim da clonagem. O clone 10 foi utilizado para extração

plasmidial por MIDI-PREP (5.11), garantindo material em maior quantidade e pureza para posteriores transfecções.

Figura 9. Resultados da clonagem de *RUNX1-RUNX1T1*: (A) gel de agarose contendo os fragmentos de plasmídeo digeridos por BglII dos 12 clones transformados; (B) mapa do vetor contendo *RUNX1-RUNX1T1* completo e dTOMATO (após sequência IRES), com indicações nas porções iniciais e finais do gene clonado, nos sítios de restrição usados na clonagem (BamHI e NotI) e digestão-teste (BglII) e em IRES (Internal Ribosome Entry Site).

6.4 Testes de expressão da construção pMIG-AEfl-TOM

6.4.1 Fluorescência de dTOMATO

Células HeLa foram transfectadas (item 5.5) com os plasmídeos pMIG-AEfl-GFP, pMIG-AEtr-TOM e pMIG-AEfl-TOM, a fim de verificar em microscopia de fluorescência (item 5.8) a taxa de transfecção e presença do marcador correto no novo plasmídeo. Conforme evidenciado na figura 10, a construção gerada é capaz de transfectar células *in vitro*, mesmo que a eficiência de transfecção tenha sido baixa, e a fluorescência emitida por dTOMATO é comparável com a emissão dos marcadores dos vetores utilizados para clonagem.

Figura 10. Visualização da fluorescência dos marcadores eGFP e dTOMATO em células HeLa após 24 h de transfecção com pMIG-AEfl-GFP, pMIG-AEtr-TOM ou pMIG-AEfl-TOM.

6.4.2 Expressão proteica de RUNX1-RUNX1T1

Células 293T foram transfectadas com os plasmídeos pMIG-AEfl-TOM e pMIG-AEtr-TOM. A expressão da proteína de fusão RUNX1-RUNX1T1 em suas formas completa (83 KDa) e truncada (62 KDa), ambas fusionadas a *tag* HA, foi avaliada por *western blot* (item 5.8) através da imunomarcagem do *tag*. É possível verificar na figura 11 que o plasmídeo resultante da nossa clonagem expressa grandes quantidades de RUNX1-RUNX1T1 em sua forma íntegra.

Figura 11. *Western blot* retratando a expressão da proteína de fusão RUNX1-RUNX1T1 em suas formas truncada (62 KDa) e íntegra (83 KDa) por células 293T transfectadas com vetor pMIG-AEtr-TOM e pMIG-AEfl-TOM, respectivamente.

Em conjunto, os dados de expressão proteica e visualização de fluorescência demonstram que a clonagem de *RUNX1-RUNX1T1* em vetor retroviral com marcador dTOMATO foi efetiva, pois a construção gerada, quando transfectada, induz superexpressão de RUNX1-RUNX1T1 pelas células e gera fluorescência detectável para marcação.

6.5 Estabelecimento de linhagens Ba/F3 superexpressando *IL7R* e *RUNX1-RUNX1T1*

6.5.1 Preparo dos plasmídeos contendo *IL7R* selvagem e mutado

Conforme evidenciado pelos testes de viabilidade (item 6.2, figura 6), as linhagens Ba/F3 (Ba/F3-IL7R-WT, Ba/F3-IL7R-G2-1 e Ba/F3-IL7R-P2) disponíveis para o estudo não reproduziram o fenótipo proliferativo esperado. Por esse motivo, novas linhagens estáveis de células Ba/F3 carregando as mutações de *IL7R* foram estabelecidas em nosso laboratório. Adicionamos a mutação RRI de *IL7R* ao nosso *pool* de estudo, pois foi essa a mutação encontrada no paciente com LMA que apresentava o gene de fusão *RUNX1-RUNX1T1* (KIM et al., 2013).

Para tal, transformamos os plasmídeos pMIG-IL7R-WT, pMIG-IL7R-G2-1, pMIG-IL7R-P2 e pMIG-IL7R-RRI em *E. coli* DH5 α e recuperamos o DNA plasmidial por MIDI-PREP. As amostras foram submetidas à digestão com a enzima de restrição HindIII, seguida de eletroforese em gel de agarose para confirmação da integridade pelo padrão de bandas, bastante semelhante nos quatro plasmídeos. Na figura 12 é possível verificar que os padrões de bandas apresentam os tamanhos de fragmentos esperados (~6,2 Kb, 1,2 Kb e 0,5 Kb) em todas as amostras.

Figura 12. Gel de agarose contendo as bandas resultantes da digestão de pMIG-IL7R-WT, pMIG-IL7R-G2-1, pMIG-IL7R-P2 e pMIG-IL7R-RR1 por HindIII.

Os plasmídeos purificados foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis e as concentrações obtidas estão organizadas na tabela 2.

Tabela 2. Quantificação dos plasmídeos pMIG-IL7R-WT, pMIG-IL7R-G2-1, pMIG-IL7R-P2 e pMIG-IL7R-RR1 extraídos por MIDI-PREP.

Amostra	Concentração	Volume total	Razão $^{260}_{280}$ nm
pMIG-IL7R-WT	1850 ng/ μ L	100 μ L	1,88
pMIG-IL7R-G2-1	1000 ng/ μ L	100 μ L	1,86
pMIG-IL7R-P2	1200 ng/ μ L	100 μ L	1,84
pMIG-IL7R-RR1	1550 ng/ μ L	100 μ L	1,86

6.5.2 Transdução de Ba/F3 por meio de espinoculação

Em um primeiro momento, os vetores pMIG-IL7R-WT, pMIG-IL7R-G2-1 e pMIG-IL7R-P2 foram cotransfectados com plasmídeos empacotadores pCL-Eco em células 293T para montagem transiente de partículas retrovirais (item 5.5). Após coleta dos VCMs, as células transfectadas foram ressuspensas em PBS e submetidas a análise por citometria de fluxo (Guava EasyCyte Mini™) para avaliar de forma indireta, através do número de células que expressam o marcador GFP, a eficiência obtida na transfecção (tabela 3).

Tabela 3. Quantificação do percentual de células 293T GFP+ após transfecção com pMIG-IL7R-WT, pMIG-IL7R-G2-1 e pMIG-IL7R-P2 por citometria de fluxo.

Amostra	%fluorescência
293T	0,92 %
293T-IL7R-WT	42,6 %
293T-IL7R-G2-1	46,46 %
293T-IL7R-P2	35 %

Os VCMs contendo as partículas retrovirais produzidas em cada transfecção foram utilizados para transdução de células Ba/F3 (item 5.6). As populações efetivamente transduzidas foram selecionadas pela fluorescência de GFP através de *cell sorting* em citômetro de fluxo FACS Aria™ Fusion (BD Biosciences). A tabela 4 traz informações do *cell sorting* das populações Ba/F3 produzidas nesta etapa da pesquisa. A eficácia de transdução ao final do processo foi baixa para todas as amostras e poucas células foram coletadas. Contudo, mesmo em número reduzido, essas células foram mantidas em cultura nas condições padrão para expansão das populações.

Tabela 4. *Cell sorting* de linhagens Ba/F3 transduzidas com IL7R-WT, IL7R-G2-1 e IL7R-P2, indicando o percentual de transdução e a quantidade de células GFP+ em cada população.

Amostra	%fluorescência	Nº células transduzidas
Ba/F3-MIG	1,8 %	67,051 x10 ³
Ba/F3-IL7R-WT	0,1 %	1,938 x10 ³
Ba/F3-IL7R-G2-1	0,2 %	4,809 x10 ³
Ba/F3-IL7R-P2	0,1 %	2,443 x10 ³

Com o intuito de verificar a sinalização constitutiva gerada pela presença das mutações em IL7R, as linhagens produzidas (Ba/F3-IL7R-WT, Ba/F3-IL7R-G2-1 e Ba/F3-IL7R-P2) foram lisadas para extração de proteínas, após retirada da citocina em cultura, e imunomarcadas por *western blot* (item 5.8). Foram utilizados anticorpos para reconhecimento de moléculas sinalizadoras na via *downstream* ao IL-7R α e suas versões fosforiladas, que indicam a atividade da via. A Figura 13 traz os resultados desse *western blot*.

Figura 13. *Western blot* retratando a expressão de STAT5, AKT e BAD em suas formas nativas e fosforiladas nas linhagens Ba/F3 crescidas com ou sem IL-3.

A proteína STAT5 (o primeiro sinalizador *downstream* ao IL-7R α) está altamente fosforilada nas amostras que expressam *IL7R* mutado (Ba/F3-IL7R-G2-1 e Ba/F3-IL7R-P2), assim como no controle positivo (Ba/F3 parental cultivada com IL-3). Esta fosforilação exacerbada de STAT5 não é observada nas amostras que superexpressam pMIG vazio (Ba/F3-MIG) ou *IL7R* selvagem (Ba/F3-IL7R-WT), tal qual no controle negativo (Ba/F3 parental sem estímulo de IL-3). A fosforilação de AKT, outra proteína *downstream* na via de IL-7R α , também foi detectada mais fortemente nas amostras expressando *IL7R* mutado em relação ao selvagem ou aos controles negativos. Neste caso é possível verificar, inclusive, maior atividade da mutação P2 em relação à mutação G2-1. Estes resultados são indicativos da capacidade oncogênica diferencial das mutações inseridas em Ba/F3 e estão de acordo com o padrão esperado, no qual a mutação P2 deve apresentar um fenótipo oncogênico mais acentuado que a mutação G2-1. A fosforilação de BAD não foi detectada em nenhuma amostra devido, provavelmente, a problemas metodológicos.

Em um segundo momento, os plasmídeos pMIG-IL7R-RRI e pMIG-AEfl-TOM também foram utilizados para produção de partículas retrovirais (os plasmídeos contendo *IL7R* selvagem e com as mutações G2-1 e P2 foram novamente usados).

O plasmídeo contendo *RUNX1-RUNX1T1* foi transfectado em duplicata para produção de maior volume de VCM. A tabela 5 traz a quantidade de células 293T GFP+ ou TOMATO+ ao fim da transfecção, medidas por citometria de fluxo (FACS Aria™ Fusion).

Tabela 5. Quantificação do percentual de células 293T GFP+ ou TOMATO+ após transfecção com pMIG-IL7R-WT, pMIG-IL7R-G2-1, pMIG-IL7R-P2, pMIG-IL7R-RRI ou pMIG-AEfl-TOM por citometria de fluxo.

Amostra	%fluorescência
293T	0,36 %
293T-IL7R-WT	49,12 %
293T-IL7R-G2-1	53,1 %
293T-IL7R-P2	48,6 %
293T-IL7R-RRI	41,9 %
293T-RUNX1-RUNX1T1 (I)	22 %
293T-RUNX1-RUNX1T1 (II)	20,4 %

Células Ba/F3 foram transduzidas com os VCMs produzidos. Além de transduzir Ba/F3 parental com cada uma das mutações isoladamente, também preparamos misturas 1:1 entre os VCMs contendo *RUNX1-RUNX1T1* e cada uma das condições de *IL7R*, para gerar populações Ba/F3 que expressassem ambas as proteínas em conjunto. As células foram selecionadas por *cell sorting* (FACS Aria™ Fusion) em função da fluorescência de GFP, de dTOMATO ou da combinação dos dois marcadores. A tabela 6 mostra a quantidade de células eficientemente transduzidas em cada condição e o percentual que elas representavam no *pool* da amostra.

Tabela 6. *Cell sorting* de linhagens Ba/F3 transduzidas com *IL7R*-WT, *IL7R*-G2-1, *IL7R*-P2, *IL7R*-RRI ou *RUNX1-RUNX1T1*, isoladamente ou em conjunto, indicando o percentual de transdução e a quantidade de células GFP+, dTOMATO+ ou duplo+ em cada população.

Amostra	%fluorescência	Nº células transduzidas
Ba/F3-MIG	89,9 %	110,1356 x10 ⁴
Ba/F3-IL7R-WT	71,5 %	46,2692 x10 ⁴
Ba/F3-IL7R-G2-1	71,9 %	50,1276 x10 ⁴
Ba/F3-IL7R-P2	0 %	0 x10 ⁴
Ba/F3-IL7R-RRI	66,1 %	65,1329 x10 ⁴
Ba/F3-RUNX1-RUNX1T1	1,6 %	2,9917 x10 ⁴
Ba/F3-IL7R-WT-RUNX1-RUNX1T1	0 %	0 x10 ⁴
Ba/F3-IL7R-G2-1-RUNX1-RUNX1T1	2,7 %	3,6811 x10 ⁴
Ba/F3-IL7R-P2-RUNX1-RUNX1T1	0 %	0 x10 ⁴
Ba/F3-IL7R-RRI-RUNX1-RUNX1T1	2,8 %	0,6038 x10 ⁴

As células Ba/F3 que foram selecionadas, carregando *IL7R* mutado, *RUNX1-RUNX1T1*, ou combinações dos oncogenes, foram postas em cultura para expansão das populações. Infelizmente, não foi possível recuperar células em todas as condições, e mesmo as populações de células transduzidas que foram recuperadas no *sorting* acabaram morrendo após algumas passagens em cultura. Novas tentativas de transdução das células Ba/F3 foram realizadas, mas sem sucesso. Acreditamos que algum passo do processo de transdução seguido de *cell sorting* foi demasiado severo à integridade celular. O objetivo final deste projeto seria avaliar a proliferação autônoma das populações expressando combinadamente os oncogenes, a fim de verificar um possível efeito aditivo das mutações em *IL7R* com *RUNX1-RUNX1T1*. Tal passo não pôde ser dado devido ao insucesso em expandir as populações celulares. Contudo, as condições de cultivo e os testes de viabilidade para essas células foram padronizados, bem como foram geradas as construções capazes de transfectar e induzir expressão de *IL-7Rα* mutado e *RUNX1-RUNX1T1*, o que possibilitará a continuidade do trabalho, uma vez que ajustes finos sejam introduzidos nos protocolos utilizados e novas transduções possam ser realizadas por nosso grupo de pesquisa.

7 CONCLUSÃO

No início deste projeto, obtivemos linhagens estáveis de células Ba/F3 superexpressando *IL7R* selvagem e mutado para que pudéssemos iniciar os estudos de cooperação oncogênica. No entanto, as linhagens não apresentaram os padrões indicativos dos potenciais oncogênicos previamente descritos na literatura, o que poderia desviar resultados obtidos. Para contornar tal problema, transduzimos Ba/F3 parental com vetores retrovirais carregando *IL7R* selvagem e com as mutações definidas (G2-1 e P2), além de adicionarmos outra mutação de interesse (RRI) ao conjunto de dados do estudo.

A presença de *IL7R* mutado, característico de LLAs, em um paciente com LMA nos serviu de inspiração para verificar um possível papel oncogênico cooperativo entre *IL7R* mutado e o gene de fusão *RUNX1-RUNX1T1*, presente também no paciente com LMA. Para isso, construímos um plasmídeo expressando a proteína de fusão RUNX1-RUNX1T1 e a proteína fluorescente dTOMATO. A construção gerada foi eficaz em transfectar diferentes tipos celulares e induzir expressão das proteínas de interesse.

Com o intuito de verificar os efeitos da presença mútua de IL-7R α mutado e RUNX1-RUNX1T1, transduzimos Ba/F3 com os plasmídeos contendo sequência de *IL7R* e GFP em conjunto com o plasmídeo contendo sequência de *RUNX1-RUNX1T1* e dTOMATO. O protocolo para produção destas linhagens foi estabelecido no laboratório, embora em condições ainda não ideais, o que levou à perda de viabilidade das células produzidas. Novos ensaios devem ser realizados em diferentes condições, a fim de otimizar o protocolo, e assim poder gerar populações Ba/F3 transduzidas para posterior estudo dos efeitos cooperativos dos oncogenes introduzidos.

8 REFERÊNCIAS

Abraham N, Ma M C, Snow J W, Miners M J, Herndier B G, Goldsmith M A. Haploinsufficiency identifies STAT5 as a modifier of IL-7-induced lymphomas. *Oncogene*. 2005; 24: 5252-5257.

Allenspach E J, Maillard I, Aster J C, Pear W S. Notch signaling in cancer. *Cancer Biology and Therapy*. 2002; 1(5): 466-476.

Aplan P D, Lombardi D P, Reaman G H, Sather H N, Hammond G D, Kirsch I R. Involvement of the putative hematopoietic transcription factor SCL in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1992; 79: 1327-1333.

Arber D A, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz M J, Le Beau M M, Bloomfield C D, Cazzola M, Vardiman J W. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127(20): 2391-2405.

Armstrong S A, Staunton J E, Silverman L B, Pieters R, den Boer M L, Minden M D, Sallan S E, Lander E S, Golub T R, Korsmeyer S J. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nature Genetics*. 2002; 30: 41-47.

Bao H, Jacobs-Helber S M, Lawson A E, Penta K, Wickrema A, Sawyer S T. Protein kinase B (c-Akt), phosphatidylinositol 3-kinase, and STAT5 are activated by erythropoietin (EPO) in HCD57 erythroid cells but are constitutively active in an EPO-independent, apoptosis-resistant subclone (HCD57-SREI cells). *Blood* 1999; 93: 3757–3773.

Barata J T, Cardoso A A, Nadler L M, Boussiotis V A. Interleukin-7 promotes survival and cell cycle progression of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by down-regulating the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1. *Blood*. 2001; 98: 1524-1531.

Belver L, Ferrando A. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Reviews Cancer*. 2016; 16(8): 494-507.

Bennett J M, Catovsky D, Daniel M T, Flandrin G, Galton D A, Gralnick H R, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British Journal of Haematology*. 1976; 33(4): 451-458.

Campos L W, Zenatti P P, Pissinato L G, Rodrigues G O L, Artico L L, Guimarães T R, Archangelo L F, Martínez L, Brooks A J, Yunes J A. Oncogenic basic amino acid insertions at the extracellular juxtamembrane region of IL7R α cause receptor hypersensitivity. *Blood*, 2019; 133(11): 1259-1263.

Carrette F, Surh C D. IL-7 signaling and CD127 receptor regulation in the control of T cell homeostasis. *Seminars in Immunology*. 2012; 24(3): 209-217.

Chen B, Jiang L, Zhong M L, Li J F, Li B S, Peng L J, Dai Y T, Cui B W, Yan T Q, Zhang W N, Weng X Q, Xie Y Y, Lu J, Ren R B, Chen S N, Hu J D, Wu D P, Chen Z, Tang J Y, Huang J Y, Mi J Q, Chen S J. Identification of fusion genes and characterization of transcriptome features in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018; 115(2): 373-378.

Chetoui N, Boisvert M, Gendron S, Aoudjit F. Interleukin-7 promotes the survival of human CD4⁺ effector/memory T cells by up-regulating Bcl-2 proteins and activating the JAK/STAT signalling pathway. *Immunology*. 2010; 130: 418-426.

Chu Y W, Memon S A, Sharrow S O, Hakim F T, Eckhaus M, Lucas P J, Gress R E. Exogenous IL-7 increases recent thymic emigrants in peripheral lymphoid tissue without enhanced thymic function. *Blood*. 2004; 104: 1110-1119.

Crawley A M, Vranjkovic A, Faller E, McGuinty M, Busca A, Burke S C, Cousineau S, Kumar A, MacPherson P A, Angel J B. Jak/STAT and PI3K signaling pathways have both common and distinct roles in IL-7-mediated activities in human CD8⁺ T cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2014; 95: 117-127.

Crellin N K, Trifari S, Kaplan C D, Cupedo T, Spits H. Human NKp44+IL-22⁺ cells and LTI-like cells constitute a stable RORC⁺ lineage distinct from conventional natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2010; 207: 281-90.

Dadi H K, Roifman C M. Activation of phosphatidylinositol-3 kinase by ligation of the interleukin-7 receptor on human thymocytes. *Journal of Clinical Investigation*. 1993; 92: 1559-1563.

Datta S R, Brunet A, Greenberg M E. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes and Development*. 1999; 13: 2905–2927.

Dibirdik I, Langlie M C, Ledbetter J A, Tuel-Ahlgren L, Obuz V, Waddick K G, Gajl-Peczalska K, Schieven G L, Uckun F M. Engagement of interleukin-7 receptor stimulates tyrosine phosphorylation, phosphoinositide turnover, and clonal proliferation of human T-lineage acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood*. 1991; 78: 564-570.

Durum S K. IL-7 and TSLP receptors: twisted sisters. *Blood*. 2014; 124(1): 4-5.

Ellisen L W, Bird J, West D C, Soreng A L, Reynolds T C, Smith S D, Sklar J. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*. 1991; 66(4): 649-661.

Foxwell B M, Beadling C, Guschin D, Kerr I, Cantrell D. Interleukin-7 can induce the activation of Jak 1, Jak 3 and STAT 5 proteins in murine T cells. *European Journal of Immunology*. 1995; 25: 3041–3046.

Fruman D A, Snapper S B, Yballe C M, Davidson L, Yu J Y, Alt F W, Cantley L C. Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85alpha. *Science*. 1999; 283: 393–397.

Fujita N, Sato S, Katayama K, Tsuruo T. Akt-dependent phosphorylation of p27kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277: 28706–28713.

Gao J, Zhao L, Wan Y Y, Zhu B. Mechanism of action of IL-7 and its potential applications and limitations in cancer immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16: 10267-10280.

Golden-Mason L, Kelly A M, Traynor O, McEntee G, Kelly J, Hegarty J E, O'Farrelly, C. Expression of interleukin 7 (IL-7) mRNA and protein in the normal adult human liver: implications for extrathymic T cell development. *Cytokine*. 2001; 14: 143–151.

Goodwin R G, Friend D, Ziegler S F, Jerzy R, Falk B A, Gimpel S, Cosman D, Dower S K, March C J, Namen A E, Park L S. Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell*. 1990; 60(6): 941-951.

Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nature Reviews Cancer*. 2006. 6(3): 193-203.

de Guzman C G, Warren A J, Zhang Z, Gartland L, Erickson P, Drabkin H, Hiebert S W, Klug C A. Hematopoietic stem cell expansion and distinct myeloid developmental abnormalities in a murine model of the AML1-ETO translocation. *Molecular and Cellular Biology*. 2002; 22: 5506-5517.

Hatano M, Roberts C W, Minden M, Crist W M, Korsmeyer S J. Deregulation of a homeobox gene, HOX11, by the t(10;14) in T cell leukemia. *Science*. 1991; 253: 79-82.

Heufler C, Topar G, Grasseger A, Stanzl U, Koch F, Romani N, Name A E, Schuler G. Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes. *The journal of experimental medicine*. 1993; 178: 1109–1114.

Hoffbrand A V, Moss P A H. *Fundamentos em Hematologia*. 6ª ed. Porto Alegre, Artmed: 2013.

Jacobs S R, Michalek R D, Rathmell J C. IL-7 is essential for homeostatic control of T cell metabolism in vivo. *Journal of Immunology*. 2010; 184: 3461–3469.

Jiang Q, Li W Q, Hofmeister R R, Young H A, Hodge D R, Keller J R, Khaled A R, Durum S K. Distinct regions of the interleukin-7 receptor regulate different Bcl2 family members. *Molecular and Cellular Biology*. 2004; 24: 6501-6513.

Jiang Q, Li W Q, Aiello F B, Mazzucchelli R, Asefa B, Khaled A R, Durum S K. Cell biology of IL-7, a key lymphotropin. *Cytokine & Growth Factors Reviews*. 2005; 16: 513-533.

Kang J, Coles. M. IL-7: The global builder of the innate lymphoid network and beyond, one niche at a time. *Seminars in Immunology*. 2012; 24: 190–197.

Kim M S, Chung N G, Kim M S, Yoo N J, Lee S H. Somatic mutation of IL7R exon 6 in acute leukemias and solid cancers. *Human Pathology*. 2013; 44(4): 551-555.

Kroes W, Stevens-Kroef M. t(8;21)(q22;q22) RUNX1/RUNX1T1. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 2017; 21(2): 52-55.

Kroncke R, Loppnow H, Flad H D, Gerdes J. Human follicular dendritic cells and vascular cells produce interleukin-7: a potential role for interleukin-7 in the germinal center reaction. *European Journal of Immunology*. 1996; 26: 2541–2544.

Lali F V, Crawley J, McCulloch D A, Foxwell B M. A late, prolonged activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway is required for T cell proliferation. *Journal of Immunology*. 2004; 172: 3527–3534.

Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Research*. 2001; 61(6): 2343-2355.

Lee J C, Hapel A J, Ihle J N. Constitutive production of a unique lymphokine (IL-3) by the WEHI-3 cell line. *Journal of Immunology*. 1982; 128: 2393-2398.

Lin J X, Migone T S, Tsang M, Friedmann M, Weatherbee J A, Zhou L, Yamauchi A, Bloom E T, Mietz J, John S, Leonard W J. The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity*. 1995; 2(4): 331-339.

Liu Y, Easton J, Shao Y, Maciaszek J, Wang Z, Wilkinson M R, McCastlain K, Edmonson M, Pounds S B, Shi L, Zhou X, Ma X, Sioson E, Li Y, Rusch M, Gupta P, Pei D, Cheng C, Smith M A, Auviel J G, Gerhard D S, Relling M V, Winick N J, Carroll A J, Heerema N A, Raetz E, Devidas M, Willman C L, Harvey R C, Carroll W L, Dunsmore K P, Winter S S, Wood B L, Sorrentino B P, Downing J R, Loh M L, Hunger S P, Zhang J, Mullighan C G. The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*. 2017; 49(8): 1211-1218.

Lundström W, Fewkes N M, Mackall C L. IL-7 in human health and disease. *Seminars in Immunology*. 2012; 24: 218-224.

Lundström W, Highfill S, Walsh S T R, Beq S, Morse E, Kockum I, Alfredsson L, Olsson T, Hillert J, Mackall C L. Soluble IL7R α potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013; 110: E1761-E1770.

Macchi P, Villa A, Giliani S, Sacco M G, Frattini A, Porta F, Ugazio A G, Johnston J A, Candotti F, O'Shea J J, Vezzoni P, Notarangelo L D. Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature*. 1995; 377: 65–68.

Madrigal-Estebas L, McManus R, Byrne B, Lynch S, Doherty D G, Kelleher D, O'Donoghue D P, Feighery C, O'Farrelly C. Human small intestinal epithelial cells secrete interleukin-7 and differentially express two different interleukin-7 mRNA transcripts: implications for extrathymic T-cell differentiation. *Human Immunology*. 1997; 58: 83–90.

Maraskovsky E, Teepe M, Morrissey P J, Braddy S, Miller R E, Lynch D H, Peschon J J. Impaired survival and proliferation in IL-7 receptor-deficient peripheral T cells. *Journal of Immunology*. 1996; 157: 5315–5323.

Mazzucchelli R, Durum S K. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nature Immunology*. 2007; 7: 144-154.

Mazzucchelli R, Hixon J A, Spolski R, Chen X, Li W Q, Hall V L, Willette-Brown J, Hurwitz A A, Leonard W J, Durum S K. Development of regulatory T cells requires IL-7R alpha stimulation by IL-7 or TSLP. *Blood*. 2008; 112: 3283–3292.

McElroy C A, Dohm J A, Walsh S T R. Structural and biophysical studies of the human IL-7/IL-7R α complex. *Structure*. 2009; 17(1): 54-65.

McElroy C A, Holland P J, Zhao P, Lim J M, Wells L, Eisenstein E, Walsh S T R. Structural reorganization of the interleukin-7 signaling complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; 109(7): 2503-2508.

Mellentin J D, Smith S D, Cleary M L. *l*yl-1, a novel gene altered by chromosomal translocation in T cell leukemia, codes for a protein with a helix-loop-helix DNA binding motif. *Cell*. 1989; 58(1): 77-83.

Mullighan C G, Goorha S, Radtke I, Miller C B, Coustan-Smith E, Dalton J D, Girtman K, Mathew S, Ma J, Pounds S B, Su X, Pui C H, Relling M V, Evans W E, Shurtleff S A, Downing J R. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007; 446: 758-764.

Namen A E, Lupton S, Hjerrild K, Wignall J, Mochizuki D Y, Schmierer A, Mosley B, March C J, Urdal D, Gillis S. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature*. 1988; 333: 571–573.

Naviaux R K, Costanzi E, Haas M, Verma I M. The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *Journal of Virology*. 1996; 70(8): 5701-5705.

Neumann M, Vosberg S, Schlee C, Heesch S, Schwartz S, Gökbüget N, Hoelzer D, Graf A, Krebs S, Bartram I, Blum H, Brüggemann M, Hecht J, Bohlander S K, Greif P A, Baldus C D. Mutational spectrum of adult T-ALL. *Oncotarget*. 2015; 6: 2754-2766.

Nodland S E, Berkowska M A, Bajer A A, Shah N, de Ridder D, van Dongen J J, LeBien T W, van Zelm M C. IL-7R expression and IL-7 signaling confer a distinct phenotype on developing human B-lineage cells. *Blood*. 2011; 118(8): 2116-2127.

Nosaka T, Kawashima T, Misawa K, Ikuta K, Mui A L, Kitamura T. STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 1999; 18: 4754–4765.

Nucifora G, Rowley J D. AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1995; 86: 1-14.

O'Neil J, Grim J, Strack P, Rao S, Tibbitts D, Winter C, Hardwick J, Welcker M, Meijerink J P, Pieters R, Draetta G, Sears R, Clurman B E, Look A T. FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *The Journal of Experimental Medicine*. 2007; 204(8): 1813-1824.

Oosterwegel M A, Haks M C, Jeffry U, Murray R, Kruisbeek A M. Induction of TCR rearrangements in uncommitted stem cells by a subset of IL-7 producing, MHC-class II-expressing thymic stromal cells. *Immunity*. 1997; 6: 351-360.

Osborne L C, Dhanji S, Snow J W, Priatel J J, Ma M C, Miners M J, Teh H S, Goldsmith M A, Abraham N. Impaired CD8 T cell memory and CD4 T cell primary responses in IL-7R alpha mutant mice. *The Journal of Experimental Medicine*. 2007; 204: 619-631.

Palacios R, Henson G, Steinmetz M, McKearn J P. Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro. *Nature*. 1984; 309: 126-131.

Palomero T, Lim W K, Odom D T, Sulis M L, Real P J, Margolin A, Barnes K C, O'Neil J, Neuberg D, Weng A P, Aster J C, Sigaux F, Soulier J, Look A T, Young R A, Califano A, Ferrando A A. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103(48): 18261-18266.

Park L S, Martin U, Garka K, Gliniak B, di Santo J P, Muller W, Largaespada D A, Copeland N G, Jenkins N A, Farr A G, Ziegler S F, Morrissey P J, Paxton R, Sims J E. Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *The Journal of experimental medicine* 2000; 192: 659-70.

Parrish Y K, Baez I, Milford T A, Benitez A, Galloway N, Rogerio J W, Sahakian E, Kagoda M, Huang G, Hao Q L, Sevilla Y, Barsky L W, Zielinska E, Price M A, Wall N R, Dovat S, Payne K J. IL- 7 dependence in human B lymphopoiesis increases during progression of ontogeny from cord blood to bone marrow. *Journal of Immunology*. 2009; 182: 4255-4266.

Pear W S, Nolan G P, Scott M L, Baltimore D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993; 90: 8392-8396.

Puck J M, Deschênes S M, Porter J C, Dutra A S, Brown C J, Willard H F, Henthorn P S. The interleukin-2 receptor gamma chain maps to Xq13.1 and is mutated in X-linked severe combined immunodeficiency, SCIDX1. *Human Molecular Genetics*. 1993; 2: 1099-1104.

Puel A, Ziegler S F, Buckley R H, Leonard W J. Defective IL7R expression in T-B+NK+ severe combined immunodeficiency. *Nature Genetics*. 1998; 20: 394-397.

Pui C H, Evans W E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 2006; 354(2): 166-178.

Pui C H, Robison L L, Look A T. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008; 371: 1030-1043.

Qin J Z, Zhang C L, Kamarashev J, Dummer R, Burg G, Döbbeling U. Interleukin-7 and interleukin-15 regulate the expression of the bcl-2 and c-myc genes in cutaneous T-cell lymphoma cells. *Blood*. 2001; 98: 2778-2783.

Ribeiro D, Barata J T. IL7R (interleukin 7 receptor). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 2014; 18(4): 229-235.

Rochman Y, Spolski R, Leonard W J. New insights into the regulation of T cells by gamma (c) family cytokines. *Nature Reviews Immunology*. 2009; 9:480–490.

Roberts K G, Morin R D, Zhang J, Hirst M, Zhao Y, Su X, Chen S C, Payne-Turner D, Churchman M L, Harvey R C, Chen X, Kasap C, Yan C, Becksfort J, Finney R P, Teachey D T, Maude S L, Tse K, Moore R, Jones S, Mungall K, Birol I, Edmonson M N, Hu Y, Buetow K E, Chen I M, Carroll W L, Wei L, Ma J, Kleppe M, Levine R L, Garcia-Manero G, Larsen E, Shah N P, Devidas M, Reaman G, Smith M, Paugh S W, Evans W E, Grupp S A, Jeha S, Pui C H, Gerhard D S, Downing J R, Willman C L, Loh M, Hunger S P, Marra M A, Mullighan C G. Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2012; 22(2): 153-166.

Sherborne A L, Hosking F J, Prasad R B, Kumar R, Koehler R, Vijayakrishnan J, Papaemmanuil E, Bartram C R, Stanulla M, Schrappe M, Gast A, Dobbins S E, Ma Y, Sheridan E, Taylor M, Kinsey S E, Lightfoot T, Roman E, Irving J A, Allan J M, Moorman A V, Harrison C J, Tomlinson I P, Richards S, Zimmermann M, Szalai C, Semsei A F, Erdelyi D J, Krajcinovic M, Sinnott D, Healy J, Gonzalez-Neira A, Kawamata N, Ogawa S, Koeffler H P, Hemminki K, Greaves M, Houlston R S. Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk. *Nature Genetics*. 2010; 42(6): 492-494.

Schlenner S M, Madan V, Busch K, Tietz A, Läubli C, Costa C, Blum C, Fehling H J, Rodewald H R. Fate mapping reveals separate origins of T cells and myeloid lineages in the thymus. *Immunity*. 2010; 32: 426-436.

Schlissel M S, Durum S D, Muegge K. The interleukin 7 receptor is required for T cell receptor gamma locus accessibility to the V(D)J recombinase. *The Journal of Experimental Medicine*. 2000; 191: 1045–1050.

Schluns K S, Kieper W C, Jameson S C, Lefrançois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nature Immunology*. 2000; 1: 426–432.

Schwieger M, Löhler J, Friel J, Scheller M, Horak I, Stocking C. AML1-ETO inhibits maturation of multiple lymphohematopoietic lineages and induces myeloblast transformation in synergy with ICSP deficiency. *The Journal of Experimental Medicine*. 2002; 196: 1227-1240.

Shochat C, Tal N, Bandapalli O R, Palmi C, Ganmore I, te Kronnie G, Cario G, Cazzaniga G, Kulozik A E, Stanulla M, Schrappe M, Biondi A, Basso G, Bercovich D, Muckenthaler M U, Izraeli S. Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- α

(IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. *The Journal of Experimental Medicine*. 2011; 205(5): 901-908.

Shochat C, Tal N, Gryshkova V, Birger Y, Bandapalli O R, Cazzaniga G, Gershman N, Kulozik A E, Biondi A, Mansour M R, Twizere J C, Muckenthaler M U, Ben-Tal N, Constantinescu S N, Bercovich D, Izraeli S. Novel activating mutations lacking cysteine in type I cytokine receptors in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014; 124(1): 106-10.

Silva A, Laranjeira A B A, Martins L R, Cardoso B A, Demengeot J, Yunes J A, Seddon B, Barata J T. IL-7 contributes to the progression of human T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Cancer Research*. 2011; 71(14): 4780-4789.

Silva A, Barata J T, Seddon B. The Role of IL7R in the Induction and Maintenance of T-Cell Leukemia/Lymphoma in Vivo. *Blood*. 2012; 120: 116.

Sims J E, Williams D E, Morrissey P J, Garka K, Foxworthe D, Price V, Friend S L, Farr A, Bedell M A, Jenkins N A, Copeland N G, Grabstein K, Paxton R J. Molecular cloning and biological characterization of a novel murine lymphoid growth factor. *The Journal of Experimental Medicine*. 2000; 192: 671-80.

Socolovsky M, Nam H, Fleming M D, Haase V H, Brugnara C, Lodish H F. Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood*. 2001; 98: 3261-3273.

Sorg RV, McLellan A D, Hock B D, Fearnley D B, Hart D N. Human dendritic cells express functional interleukin-7. *Immunobiology*. 1998; 198: 514-526.

Teitell M A, Pandolfi P P. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Annual Review of Pathology*. 2009; 4: 175-198.

Tough D F, Sprent J. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 1994; 179: 1127-1135.

Valge-Archer V E, Osada H, Warren A J, Forster A, Li J, Baer R, Rabbitts T H. The LIM protein RBTN2 and the basic helix-loop-helix protein TAL1 are present in a complex in erythroid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994; 91(18): 8617-8621.

van Vlierberghe P, van Grotel M, Beverloo H B, Lee C, Helgason T, Buijs-Gladdines J, Passier M, van Wering E R, Veerman A J, Kamps W A, Meijerink J P, Pieters R. The cryptic chromosomal deletion del(11)(p12p13) as a new activation mechanism of LMO2 in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2006; 108(10): 3520-3529.

Venkitaraman A R, Cowling R J. Interleukin-7 induces the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the alpha chain of the interleukin-7 receptor. *European Journal of Immunology*. 1994. 24(9): 2168-2174.

Vitale A, Guarini A, Chiaretti A, Foà R. The changing scene of adult acute lymphoblastic leukemia. *Current Opinion in Oncology*. 2006; 18(6): 652-659.

Watanabe-Smith, K. Godil J, Agarwal A, Tognon C, Druker B. Analysis of acquired mutations in transgenes arising in BA/F3 transformation assays: findings and recommendations. *Oncotarget*. 2017; 8: 12596-12606.

Weng A P, Ferrando A A, Lee W, Morris J P 4th, Silverman L B, Sanchez-Irizarry C, Blacklow S C, Look A T, Aster J C. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2004; 306(5694): 269-271.

Wiles M V, Ruiz P, Imhof B A. Interleukin-7 expression during mouse thymus development. *European Journal of Immunology*. 1992; 22: 1037–1042.

Xia Y, Brown L, Yang C Y, Tsan J T, Siciliano M J, Espinosa R 3rd, Le Beau M M, Baer R J. TAL2, a helix-loop-helix gene activated by the (7;9)(q34;q32) translocation in human T cell leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991; 88: 11416-11420.

Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt III V E T, Silvennoinen O, O'Shea J J. The Janus kinases (Jaks). *Genome Biology*. 2004. 5(12): 253.

Yokoyama K, Yokoyama N, Izawa K, Kotani A, Harashima A, Hozumi K, Tojo A. In vivo leukemogenic potential of an interleukin 7 receptor α chain mutant in hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2013; 122: 4259-4263.

Yu C R, Young H A, Ortaldo J R. Characterization of cytokine differential induction of STAT complexes in primary human T and NK cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 1998; 64: 245–258.

Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley S L, Payne-Turner D, Easton J, Chen X, Wang J, Rusch M, Lu C, Chen S C, Wei L, Collins-Underwood J R, Ma J, Roberts K G, Pounds S B, Ulyanov A, Becksfort J, Gupta P, Huether R, Kriwacki R W, Parker M, McGoldrick D J, Zhao D, Alford D, Espy S, Bobba K C, Song G, Pei D, Cheng C, Roberts S, Barbato M I, Campana D, Coustan-Smith E, Shurtleff S A, Raimondi S C, Kleppe M, Cools J, Shimano K A, Hermiston M L, Doulatov S, Eppert K, Laurenti E, Notta F, Dick J E, Basso G, Hunger S P, Loh M L, Devidas M, Wood B, Winter S, Dunsmore K P, Fulton R S, Fulton L L, Hong X, Harris C C, Dooling D J, Ochoa K, Johnson K J, Obenauer J C, Evans W E, Pui C H, Naeve C W, Ley T J, Mardis E R, Wilson R K, Downing J R, Mullighan C G. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2012; 481: 157-163.

Zenatti P P, Ribeiro D, Li W, Zuurbier L, Silva M C, Paganin M, Tritapoe J, Hixon J A, Silveira A B, Cardoso B A, Sarmiento L M, Correia N, Toribio M L, Kobarg J, Horstmann M, Pieters R, Brandalise S R, Ferrando A A, Meijerink J P, Durum S K, Yunes J A, Barata J T. Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*. 2011; 43(10): 932-939.