ANA MARIA FRAGA

**ESTUDO DE FUNÇÃO DE HIPK2 DURANTE O
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências, na área de Biologia/Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira
Carramaschi

SÃO PAULO
2007

Fraga, Ana Maria

Estudo de função de Hipk2 durante o desenvolvimento embrionário /

Ana Maria Fraga. – São Paulo, 2007.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Área de concentração: Biologia/Genética.

Orientadora: Lygia da Veiga Pereira Carramaschi.

Descritores: 1. HIPK2. 2. DESENVOLVIMENTO. 3. RNAi. 4. EXPRESSÃO GÊNICA.

Comissão Julgadora

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dra. Orientadora

À minha família, meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira Carramaschi, por estar sempre pronta a ajudar, pelos conselhos sempre pertinentes e pelo ânimo nos momentos complicados.

Aos meus pais, por me garantirem que era possível. Ao meu pai, pelo “não esquentar a cuca...”, procurei fazer disso meu mantra, não sei se consegui. À minha mãe, por saber exatamente qual era o problema sem eu precisar dizer.

Às minhas irmãs, por estarem comigo sempre, por ouvirem minhas reclamações, por tentarem me alegrar (tarefa árdua nas horas de “urubu”) nos momentos tristes, e me acompanharem na “alienação necessária”. Sem vocês, eu não conseguiria.

Ao Prof. Dr. José Xavier-Neto, meu co-orientador “extra-oficial”, pela enorme ajuda durante o tempo em que trabalhei sob sua supervisão, pelo aprendizado diário e pelas frutíferas discussões científicas.

À CAPES e USP pelo apoio financeiro durante o mestrado.

Aos meus amigos de laboratório, de agora e de antes, Bruno, Christian, Clarisse, Cynthia, Débora, Denilce, Enrico, Gaëlle, Gustavo, Joana, Karla, Lys, Mariana, Raquel, Roberto, por todas as alegrias e tristezas compartilhadas. Em especial à Joana e Raquel, pela revisão, pelos conselhos e pela amizade.

Aos amigos que já passaram ou trabalham no laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Incor-USP, Allysson, Ana Paula, Camila, Hozana, Marcos, Marilene, Michelle, Priscila, Roberta, Rodrigo, Tatiana, Vânia. Foi ótimo trabalhar com vocês! Em especial à Ana pelo excelente trabalho no Corel, ao Allysson pela revisão, à Roberta, Hozana e Priscila pelos conselhos sobre as imagens.

Aos laboratórios coordenados pelos Drs. Ângela Morgante, Eduardo Gorab, Luis Eduardo Soares Netto, Maria Rita Santos Passos Bueno, Mayana Zatz e Regina Célia Mingroni Netto, pelos equipamentos emprestados e ajuda científica.

Aos amigos dos laboratórios das Profas. Dras. Ângela Morgante, Luciana Haddad e Regina Célia, em especial à Fátima, Fernando, Jacaré, Juliana, Larissa, Ligia, Lílian, Mara e Rafaella, pela ajuda e amizade neste tempo de iniciação e mestrado.

À Profa. Dra. Luciana Vasques, pela imensa colaboração e amizade.

À Profa. Dra. Silvia Massironi e sua equipe, por disponibilizar os camundongos para os experimentos e pela ajuda nunca negada.

À Dra. Marina Soukoian, pela ajuda incondicional e pela amizade que supera a distância.

Às secretárias do Depto. de Genética e Biologia Evolutiva, Deisy e Helenice, minhas “co-orientadoras”.

À Profa. Dra. Sabine Eggers, pela amizade desenvolvida no tempo das monitorias de Genética Humana.

Aos Coiros da Silva, as primeiras pessoas em que penso na hora do desespero, sempre dispostos a mimar esta peregrina que sofre com a tecnologia... À Fernanda, Bruno e Danilo, meus irmãos também.

Aos amigos de turma da Bio, José, Marisa, Melissa, Tiago. A gente fica sem se ver um tempão, mas quando se encontra é sempre uma festa!

À Leila e Quéren, minhas amigas-irmãs, pela amizade que perdura o tempo.

Lista de Figuras.....	IV
Lista de Tabelas.....	VI
Lista de Abreviaturas.....	VII
Resumo.....	IX
Summary.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Os novos desafios da era pós-genômica.....	1
1.2. As homeoproteínas.....	2
1.3. Regulação de homeoproteínas – as HIPKs.....	4
1.4. A família NK.....	6
1.5. Estudos de função de Hipk2 durante o desenvolvimento embrionário.....	7
1.6. Atuação de HIPK2 em outras vias.....	8
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Estudo da expressão de <i>Hipk2</i> durante o desenvolvimento.....	12
3.1.1. Escolha e obtenção da sonda de RNA (ribossonda) para hibridação <i>in situ</i>	12
3.1.1.1. Extração de RNA.....	12
3.1.1.2. <i>Reverse Transcriptase</i> - PCR (RT-PCR).....	13
3.1.1.3. Clonagem dos fragmentos em pGEM.....	14

3.1.1.4. Transformação da ligação em bactérias.....	14
3.1.1.5. Preparação do plasmídeo em pequena escala (<i>miniprep</i>).....	14
3.1.1.6. Digestão com enzimas de restrição.....	15
3.1.1.7. Clonagem em <i>pBluescript</i>	15
3.1.1.8. Seqüenciamento de plasmídeos.....	16
3.1.1.9. Preparação de plasmídeo em média escala (<i>midiprep</i>) e purificação do plasmídeo.....	16
3.1.1.10. Transcrição <i>in vitro</i> - síntese da ribossonda.....	17
3.1.2. Obtenção de embriões de camundongos.....	18
3.1.3. Processamento dos embriões.....	18
3.1.4. Hibridação <i>in situ</i> em cortes de embriões.....	18
3.2. Efeito do silenciamento (<i>knockdown</i>) de <i>HIPK2</i> por shRNA (<i>short hairpin RNA</i>) em cultura celular.....	20
3.2.1. Desenhos dos oligonucleotídeos e clonagem em <i>pSuper</i>	20
3.2.2. Preparação de plasmídeo em larga escala (<i>Maxiprep</i>).....	22
3.2.3. Transfecção de células 293 EBNA.....	23
3.2.4. Descongelamento das células.....	24
3.2.5. Congelamento das células.....	24
3.2.6. Extração de DNA das células.....	25
3.2.7. Verificação de clones celulares positivos.....	25
3.2.8. Análise da expressão gênica nas células transfectadas.....	26
3.2.8.1. RT- PCR em tempo real (<i>Real Time-PCR</i>).....	26
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Perfil de expressão de <i>Hipk2</i> durante o desenvolvimento embrionário.....	29

4.1.1. Síntese da ribossonda para as reações de hibridação <i>in situ</i>	29
4.1.2. Hibridação <i>in situ</i> em cortes histológicos de embriões de camundongos.....	30
4.2. Regulação por <i>HIPK2</i> da expressão de genes <i>homeobox</i> e <i>HIPKs</i>	39
4.2.1. Construção dos vetores para silenciamento de <i>HIPK2</i>	39
4.2.2. Análise da funcionalidade dos <i>shRNAs</i>	41
4.2.3. Efeito da inativação de <i>HIPK2</i> na expressão de genes <i>homeobox</i> e <i>HIPKs</i>	46
5. DISCUSSÃO.....	49
5.1. Perfil de expressão de <i>Hipk2</i> durante o desenvolvimento embrionário de camundongos.....	49
5.2. Regulação de expressão gênica por <i>HIPK2</i>	53
5.2.1. Regulação de expressão de <i>HIPK1</i> e <i>HIPK3</i> por <i>HIPK2</i>	54
5.2.2. Controle da expressão de genes <i>homeobox</i> por <i>HIPK2</i>	56
6. CONCLUSÃO.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vista esquemática do complexo homeodomínio-DNA.....	3
Figura 2. Diagrama esquemático das proteínas HIPK1, HIPK2 e HIPK3.....	5
Figura 3. Ativação de p53 em resposta a danos ao DNA.....	10
Figura 4: Diagrama esquemático da seqüência de cDNA de <i>Hipk2</i> murina e a localização das regiões selecionadas para ribossondas nas hibridações <i>in situ</i>	30
Figura 5: Expressão de <i>Hipk2</i> em embrião de 9.5 dpc.....	31
Figura 6: Expressão de <i>Hipk2</i> em cortes sagitais de embriões de 11.5 dpc.....	32
Figura 7: Expressão de <i>Hipk2</i> em embriões de 12.5 dpc.....	33
Figura 8: Expressão de <i>Hipk2</i> em embriões de 13.5 dpc.....	34
Figura 9: Perfil de expressão de <i>Hipk2</i> em embriões de 14.5 dpc.....	35
Figura 10: Expressão de <i>Hipk2</i> por hibridação <i>in situ</i> em cortes parassagitais de embriões de 15.5 dpc.....	36
Figura 11: Expressão de <i>Hipk2</i> em embriões de 17.5 dpc.....	37
Figura 12: Características das seqüências-alvo e sua localização no transcrito de <i>HIPK2</i>	39-40
Figura 13: PCR para confirmação da presença do vetor <i>pSuper</i> nas células transfectadas.....	41
Figura 14: Expressão de <i>HIPK2</i> em clones transfectados com vetores para silenciamento do gene por RT-PCR semi-quantitativa	42
Figura 15: Quantificação da expressão de <i>HIPK2</i> em clones transfectados com vetores para silenciamento do gene por RT-PCR em tempo real.....	43

Figura 16: Expressão de <i>HIPK2</i> em clones transfectados com vetores para silenciamento do gene por RT-PCR em tempo real, em relação a diferentes controles endógenos.....	44
Figura 17: Análise por RT-PCR em tempo real da expressão de <i>HIPK2</i> em diferentes clones transfectados com pS4.....	45
Figura 18: Efeito do silenciamento de <i>HIPK2</i> nos níveis de expressão dos genes <i>HIPKs</i>	47
Figura 19: Efeito do silenciamento de <i>HIPK2</i> nos níveis de expressão de genes <i>homeobox</i>	48
Figura 20: Representação esquemática da expressão de <i>Hipk2</i> durante o desenvolvimento embrionário de camundongos.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados na obtenção de ribossondas para hibridação <i>in situ</i>	13
Tabela 2: Oligonucleotídeos desenhados e sintetizados a partir da sequência de <i>HIPK2</i> para expressão de shRNA	21
Tabela 3: Iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real (<i>Real Time-PCR</i>)..	27
Tabela 4: Expressão de <i>Hipk2</i> ao longo do desenvolvimento embrionário de camundongos.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA – DNA complementar

dpc – dias pós-coito

EST – do inglês *Expressed Sequence Tag*

FISH – do inglês *Fluorescent in situ hybridization*

GAPDH – gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

HID – do inglês *Homeoproteins Interaction Domain*

HIPK – *Homeodomain-Interacting Protein Kinase*

HPRT1 – gene da hipoxantina ribosiltransferase 1

HMBS – gene da hidroximetilbilano sintase

Kb – kilobases

nt – nucleotídeos

ORESTES – do inglês *Open Reading Frame EST Sequences*

pb – pares de base

PCR – reação em cadeia de polimerase

PEST – domínio rico em prolina (P), ácido glutâmico (E), serina (S) e treonina (T)

RanBPM – do inglês *RAN binding protein M*

RI – radiação ionizante

RNAi – RNA de interferência

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa

shRNA – do inglês *short hairpin-RNA*

siRNA – do inglês *small interfering RNA*

TA – temperatura ambiente

TGF β – do inglês *transforming growth factor β*

TRADD – do inglês *TNF-RI associated death domain*

UTR – do inglês *untranslated region*

UV – radiação ultravioleta

YH – domínio rico em histidina (Y) e tirosina (H)

HIPK2 (*homeodomain interacting protein kinase 2*) é uma proteína quinase nuclear, originalmente identificada por interagir com homeoproteínas. Sua atividade quinase contribui para a regulação de diversas vias, ativando o programa de morte celular em resposta a estímulos externos ou promovendo diferenciação celular por atuar como co-fator de homeoproteínas. A extensa similaridade estrutural com as outras proteínas da mesma família, HIPK1 e HIPK3, sugere que as três HIPKs possuem funções redundantes.

Este trabalho pretendeu contribuir para a elucidação das funções de Hipk2 avaliando a expressão desta durante o desenvolvimento em camundongo. Observou-se ampla distribuição do transcrito desde o dia 9.5 pós-coito (dpc). Com o progresso do desenvolvimento, a expressão passou a se concentrar principalmente em tecidos nervosos, sugerindo uma participação de Hipk2 na morfogênese destes.

Além disso, foi desenvolvido um sistema *in vitro* para se avaliar as funções de HIPK2 humana. A inibição de *HIPK2* por RNAi em cultura celular humana levou ao aumento de expressão de genes *HIPKs*, indicando que possa haver um mecanismo de controle transcricional que ajuste os níveis de proteínas *HIPKs* na célula. O silenciamento de *HIPK2* também provocou aumento de expressão de alguns genes *homeobox* avaliados, sugerindo que HIPK2 possa reprimir a expressão destes genes em humanos. A análise global de expressão gênica e proteômica nas células deficientes para *HIPK2* poderá indicar as diferentes vias de atuação desta proteína.

HIPK2 is a nuclear protein kinase, originally identified because of its interaction with homeoproteins. Its kinase activity can regulate several pathways, triggering the apoptotic program in response to external stimuli or promoting differentiation by acting as a cofactor for homeoproteins. The extensive similarity with the other two proteins from the same family, HIPK1 and HIPK3, suggests that HIPKs have redundant functions.

This work tried to contribute to the body of knowledge regarding the functions of Hipk2 addressing its expression during the mouse development. The transcript is broadly expressed in mouse embryos from day 9.5 post-coitum. As development progresses, its expression concentrates mainly in neural tissues, suggesting a role of Hipk2 in its morphogenesis.

In addition, an *in vitro* system was developed to study HIPK2 functions in human cells. The *HIPK2* silencing by RNAi in human cell culture led to a raise in expression of the other *HIPKs* genes, indicating that there might be a transcriptional mechanism controlling HIPKs proteins levels in the cell. *HIPK2* inhibition also caused an increase in expression of some *homeobox* genes, suggesting that HIPK2 can negatively regulate their expression in humans. A global approach of gene expression and proteomics analysis in the *HIPK2* deficient cells will help to identify different pathways in which HIPK2 participates.

1.1. Os novos desafios da era pós-genômica

Com a publicação da primeira versão da sequência do genoma humano no início de 2001 (LANDER *et al.*, 2001; VENTER *et al.*, 2001), o desafio que se seguiu foi o de identificar genes, suas regiões regulatórias e perfis de expressão em diferentes tecidos. Mais ainda, tornou-se imprescindível relacioná-los a funções celulares e avaliar o impacto de polimorfismos e mutações em investigação clínica.

Estudos complementares aos do seqüenciamento do genoma humano foram realizados, como o do projeto Genoma Humano do Câncer desenvolvido no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer. O objetivo deste projeto foi determinar seqüências parciais de genes expressos principalmente em neoplasias utilizando uma nova metodologia, patenteada pelo Instituto Ludwig, conhecida como ORESTES (do inglês *Open Reading Frame EST Sequences* – DIAS NETO *et al.*, 2000; CAMARGO *et al.*, 2001). A técnica permite seqüenciar a região central dos cDNAs, o que complementa dados obtidos a partir de métodos tradicionais de seqüenciamento, que exploram apenas as extremidades das seqüências (DIAS NETO *et al.*, 2000).

A partir de dados do projeto Genoma Humano do Câncer, foi identificada uma nova EST humana (do inglês *Expressed Sequence Tag*, “etiqueta” de seqüência expressa) que apresentava 89% de identidade com a seqüência codificadora da proteína Hipk2 (*Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2*), descrita em camundongos por Kim e colaboradores (1998). Estes autores pretendiam identificar parceiros de interação de homeoproteínas. Usando como isca uma homeoproteína da família NK em ensaios de duplo-híbrido, foram identificadas três proteínas muito semelhantes, agrupadas numa classe denominada HIPK.

Para melhor compreensão do trabalho que se desenvolveu, é necessário fazer um breve histórico sobre as homeoproteínas, suas funções e as consequências da associação das HIPKs a elas.

1.2. As homeoproteínas

As homeoproteínas são fatores de transcrição de fundamental importância durante o desenvolvimento embrionário, que possuem um domínio muito conservado entre eles, de 60-61 aminoácidos (homeodomínio – QIAN *et al.*, 1989), sugerindo uma provável relação funcional e evolutiva entre os vários membros da família (revisto por DUBOULE, 1992). Essa região corresponde à parte da proteína que reconhece seqüências específicas de DNA. O homeodomínio é codificado por uma seqüência de 180-183 nucleotídeos denominada *homeobox* e, por esta razão, os genes que possuem essa seqüência são chamados genes *homeobox* (MCGINNIS *et al.*, 1984; SCOTT & WEINER, 1984).

A análise da estrutura tridimensional do homeodomínio revelou que ele é composto de três α -hélices, sendo que a segunda e a terceira hélices se organizam no motivo hélice-volta-hélice, comum a várias proteínas regulatórias de procariotos (BRENNAN & MATTHEWS, 1989). A hélice 3 é a que efetivamente reconhece e faz contato com o DNA de seqüência específica (revisto por BILLETER, 1996; Fig.1).

Figura 1. Vista esquemática do complexo homeodomínio-DNA. A dupla-fita de DNA é representada em azul e amarelo. Os retângulos em rosa representam as hélices 1, 2 e 3 do homeodomínio. A hélice 3 é a que reconhece a sequência de DNA. Adaptado de Billeter, 1996.

O primeiro relato sobre homeoproteínas foi feito por Bateson em 1894. Trabalhando com drosófilas, esse autor descreveu mutações que provocavam alterações dramáticas de fenótipo. O termo *homeo* significa “similar”, e Bateson denominou de homeóticas aquelas mutações em que estruturas características de determinados segmentos estavam presentes em outras regiões do corpo. É o caso da mutação *Antennapedia*, em que um par de pernas substitui um par de antenas na cabeça das moscas (revisto por GEHRING, 1987).

Hoje sabemos que as alterações de fenótipo descritas por Bateson são causadas por mutações ou mudanças no padrão de expressão de um grupo de genes *homeobox*, os chamados genes homeóticos. Estudos genéticos de Lewis (1978) e Kaufman e

colaboradores (1980) indicaram que esses genes se encontravam agrupados (em *cluster*) no cromossomo 3 (complexo homeótico ou HOM-C) de drosófila.

Proteínas que apresentam homeodomínio foram descritas em todos os metazoários, além de fungos e plantas, indicando sua origem remota no curso na evolução dos eucariotos (KAPPEN *et al.*, 1993). Vale ressaltar ainda que muitos genes possuem o *homeobox*, mas nem todos são homeóticos, ou seja, nem todas as homeoproteínas têm função na determinação de identidade segmentar nos estágios iniciais do desenvolvimento.

Em vertebrados, a família dos genes *homeobox* foi dividida em duas categorias: o grupo Hox e o grupo órfão. O grupo Hox é o ortólogo do complexo homeótico (HOM-C) em drosófila; os genes pertencentes a esta classe encontram-se em quatro *clusters* e são responsáveis por definir identidade ao longo do eixo antero-posterior do embrião (MCGINNIS & KRUMLAUF, 1992; FAVIER & DOLLÉ, 1997). O grupo órfão contém diversos genes dispersos no genoma, envolvidos principalmente com a organogênese (PATTERSON *et al.*, 1998).

1.3. Regulação de homeoproteínas – as HIPKs

Com a constatação de que o homeodomínio é uma região altamente conservada entre as homeoproteínas de diversos filos, surgiu a questão: como as homeoproteínas exercem sua alta especificidade *in vivo* e que regras governam suas habilidades de ativar ou reprimir genes alvo? A especificidade de atuação das homeoproteínas pode ser alcançada por (1) interação com outras proteínas (co-fatores); (2) divergências nas porções amino e carboxi-terminais, que poderiam auxiliar no reconhecimento de genes alvo; ou por (3) modificações pós-traducionais como fosforilação e acetilação. Particularmente, a

atividade de fatores de transcrição pode ser regulada de forma rápida e reversível por eventos de fosforilação sítio-específica, promovidos por quinases que agem em cascatas de sinalização ativadas por estímulos extracelulares (KARIN & HUNTER, 1995).

No trabalho inicial sobre as HIPKs, Kim e colaboradores (1998) descreveram três proteínas, Hipk1, Hipk2 e Hipk3, que possuem em comum o domínio quinase (PK), o de interação com homeoproteínas (HID), a sequência PEST (uma região de maior susceptibilidade à proteólise – ROGERS *et al.*, 1986), e um domínio rico em histidina e tirosina (YH), localizado na porção carboxi-terminal, de função desconhecida, como esquematizado na figura 2 (KIM *et al.*, 1998).

Figura 2. Diagrama esquemático das proteínas *Hipk1*, *Hipk2* e *Hipk3*. PK, domínio quinase; HID, domínio de interação com homeoproteínas; PEST, sequência rica em prolina, ácido glutâmico, serina e treonina; e YH, domínio rico em histidina e tirosina. A percentagem de similaridade entre as diferentes regiões conservadas está indicada. Adaptado de Kim e colaboradores (1998).

Além de interagir com homeoproteínas, Hipk2 é capaz de fosforilar *in vitro* homeoproteínas NK, sugerindo que as HIPKs poderiam regular a atividade de homeoproteínas *in vivo*. De fato, a fosforilação de NK3 por Hipk2 provoca aumento na atividade de repressor transcricional daquela proteína (Kim *et al.*, 1998).

1.4. A família NK

As proteínas NKs foram descritas por Kim e Niremborg (1989). Com o propósito de identificar no genoma de drosófila outros genes *homeobox*, os autores realizaram uma varredura em biblioteca de DNA genômico usando como alvo oligonucleotídeos degenerados do *homeobox*. Quatro genes foram encontrados e nomeados *NK1* a *NK4* (NK de Niremborg e Kim).

Os genes *NK* isolados em drosófila se tornaram mais conhecidos pela denominação de seus fenótipos mutantes: *ventral nervous system defective* (*vnd*) para *NK2*, *bagpipe* para *NK3*, *tinman* para *NK4* (revisto por HARVEY, 1996; revisto por STANFEL *et al.*, 2005).

Inúmeras evidências indicam que as NKs são reguladores críticos da organogênese. Assim como os genes do HOM-C em drosófila, as NKs são muito conservadas nos diversos filos e seus ortólogos em vertebrados já foram descritos (revisto por STANFEL *et al.*, 2005).

O ortólogo de *tinman* (*NK4*) em camundongos é *Nkx2-5* (KOMURO & IZUMO, 1993; LINTS *et al.*, 1993), e seu papel na morfogênese cardíaca é bem estabelecido. Mutantes *Nkx2.5* em camundongos chegam a formar o tubo cardíaco, mas o *looping*, um evento crucial para a morfologia cardíaca, não progride, e o coração destes indivíduos permanece no estágio linear (LYONS *et al.*, 1995). Em humanos, mutações em heterozigose de *NKX2-5* foram associadas a malformações cardíacas, como defeitos na formação dos septos atriais e ventriculares (SCHOTT *et al.*, 1998; BENSON *et al.*, 1999).

O gene *NK3* (*bagpipe*) é expresso no mesoderma dorsal, em células destinadas a formarem o mesoderma visceral em drosófila (AZPIAZU & FRASCH, 1993). Mutações neste gene causam transformação do mesoderme visceral em mesoderme somático e gonadal. De fato, *bagpipe* regula a expressão de genes necessários para a formação de musculatura visceral (ZAFFRAN & FRASCH, 2002).

Hipk2 interage com Nkx2.5 (camundongo) e NK3 (drosófila) *in vitro*, além de ser capaz de regular, por fosforilação, a atuação de NK3. Por este motivo, suspeita-se que Hipk2 seja importante durante o desenvolvimento embrionário.

1.5. Estudos de função de Hipk2 durante o desenvolvimento embrionário

Uma estratégia para avaliar se certa proteína possui função no desenvolvimento é determinar o padrão de expressão espacial e temporal do gene que a codifica em embriões. Assim, em 2002, Pierantoni e colaboradores analisaram a expressão de *Hipk2* em embriões de camundongos pela técnica de hibridação *in situ*. Os resultados mostraram sinais do transcrito somente nas fases mais tardias do desenvolvimento, a partir do 15º dia pós-coito (dpc), preferencialmente em células da retina, e em tecidos musculares e nervosos. Em adultos, a análise por RT-PCR revelou um padrão amplo de expressão de *Hipk2*.

A geração de camundongos *knockout*, ou seja, que não possuem cópias funcionais de genes de interesse, tem sido uma técnica amplamente utilizada para o estudo da função gênica *in vivo*. Camundongos *knockout* para os genes *Hipk1* e *Hipk2* isoladamente são normais e férteis (KONDO *et al.*, 2003; WIGGINS *et al.*, 2004). No entanto, os duplo-*knockouts* (*Hipk1*^{-/-} /*Hipk2*^{-/-}) morrem entre o 9º e o 12º dia de gestação, apresentando exencefalia e falha no fechamento do neuróporo anterior (ISONO *et al.*, 2006). A hipótese levantada pelos autores é que Hipk1 e Hipk2 são proteínas de funções muito semelhantes, mutuamente compensatórias.

Além disso, as análises dos camundongos *Hipk1*^{-/-} /*Hipk2*^{+/-} revelaram que metade dos embriões apresenta costelas ectópicas associadas à sétima vértebra cervical, e não exibem o processo espinhoso da segunda vértebra torácica, um sinal claro de transformação

posterior, fenômeno comum quando existe alteração na expressão de genes homeóticos. De fato, foram observadas mudanças na expressão de alguns genes *Hox* e *Pax* nos mutantes, sugerindo que, direta ou indiretamente, as Hipks além de modular a função de homeoproteínas podem regular a expressão de genes *homeobox*.

1.6. Atuação de HIPK2 em outras vias

Desde sua primeira descrição por Kim e colaboradores (1998), vários estudos vêm identificando diferentes funções para as proteínas HIPKs. Até o momento, sabe-se que as três proteínas possuem características e funções bem parecidas (revisto por CALZADO *et al.*, 2007). No entanto, HIPK2 têm sido a proteína mais bem estudada da família.

A análise por FISH (*fluorescent in situ hybridization*) mostrou que *HIPK2* se localiza na posição 7q32-q34, e esta região está amplificada em tumores do sistema nervoso central, pele e olho, além de estar envolvida em rearranjos cromossômicos de várias neoplasias, como leucemia mielóide aguda, síndrome mielodisplástica, carcinomas de seio, ovário e próstata (HOFMANN *et al.*, 2000).

Outros trabalhos demonstram que, além de interagir com homeoproteínas, HIPK2 pode se associar a várias outras proteínas, principalmente relacionadas ao controle do ciclo celular e apoptose. Entre essas proteínas, citamos TRADD, uma proteína citoplasmática relacionada a respostas apoptóticas (LI *et al.*, 2000); e RanBPM (*Ran-binding protein*), uma proteína G nuclear envolvida na formação dos microtúbulos durante a mitose (WANG *et al.*, 2002). As funções *in vivo* dessas associações ainda não foram bem esclarecidas, mas os trabalhos sugerem que HIPK2 pode estabilizar interações entre proteínas e seus co-fatores, eventos estes que podem ser dependentes ou não de sua atividade de quinase.

HIPK2 fosforila p53, uma proteína supressora de tumor, em resposta à radiação ultravioleta, ionizante ou à exposição a agentes quimioterápicos (WANG *et al.*, 2001; D’ORAZI *et al.*, 2002; DI STEFANO *et al.*, 2004; DAUTH *et al.*, 2007). A fosforilação ocorre na serina 46 (Ser46) de p53, evento que é considerado fundamental para acionar o programa de apoptose regulado por esta proteína (ODA *et al.*, 2000; OKAMURA *et al.*, 2001). O mecanismo de ativação de p53 por HIPK2 é ilustrado na figura 3.

Dados que apontam a participação de outras proteínas na via de p53 são de extremo interesse clínico. Sendo HIPK2 uma proteína ativadora do programa de apoptose, tanto dependente quanto independente de p53, ela pode se tornar um alvo promissor da terapia do câncer.

Figura 3. Ativação de *p53* em resposta a danos ao DNA. Radiação ultra-violeta (UV), radiação ionizante (RI) e quimioterápicos causam danos ao DNA, ativando vias de sinalização que culminam na fosforilação da Ser15 e Ser20 de *p53*. Caso o dano à molécula de DNA seja maior do que a capacidade de reparo, ocorrerá ativação de quinases que fosforilam Ser46, o que provoca mudança de conformação da proteína *p53*, aumento sua afinidade por promotores específicos de genes apoptóticos, como *p53AIP1*. Adaptado de Oda e colaboradores (2000) e Dauth e colaboradores (2007).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é contribuir para a elucidação das funções da proteína Hipk2 durante o desenvolvimento embrionário.

Especificamente, pretende-se:

(1) determinar o padrão temporal e espacial de expressão de *Hipk2* durante o desenvolvimento embrionário. Pierantoni e colaboradores (2002) afirmaram que o gene se expressava tardiamente em camundongos, somente a partir do 15º dpc. No entanto, como Hipk2 é capaz de interagir e fosforilar homeoproteínas *in vitro*, é possível que seu transcrito seja encontrado em fases mais precoces da embriogênese. Assim, uma análise aprofundada se faz necessária;

(2) estabelecer um modelo experimental para se estudar as diferentes vias de atuação de HIPK2 em humanos. Através do silenciamento de *HIPK2* por RNAi (RNA de interferência) em cultura de células humanas, pode-se avaliar o papel deste na regulação (direta ou indireta) de diferentes genes e proteínas, em particular de genes *homeobox*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Estudo da expressão de *Hipk2* durante o desenvolvimento

3.1.1. Escolha e obtenção da sonda de RNA (ribossonda) para hibridação *in situ*

Quatro regiões do transcrito de *Hipk2* foram escolhidas como locais para ribossondas. Como critérios para seleção da região foram levados em consideração o tamanho do fragmento gerado (até 500pb) e a exclusividade da sequência de *Hipk2*, que não deveria apresentar homologia com nenhum outro transcrito de camundongo.

As ribossondas utilizadas nas reações de hibridação *in situ* foram obtidas por RT-PCR (reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa) a partir do RNA total de tecidos embrionários de camundongos (17.5 dpc). O protocolo para extração de RNA e a síntese do cDNA utilizado como molde para as RT-PCRs se encontram nos itens a seguir.

3.1.1.1. Extração de RNA

O RNA foi extraído de 50-100 mg de tecido com *TRIzol*® *Reagent* (Invitrogen), de acordo com protocolo do fabricante. O RNA foi ressuspendido em 50 µl de água DEPC (H₂O *Deionizada* tratada com 0,1% dietilpirocarbonato – DEPC - USB), quantificado no espectrofotômetro *Gene Quant Pro* (GE Healthcare) e armazenado a -70°C.

3.1.1.2. Reverse Transcriptase - PCR (RT-PCR)

A síntese de cDNA (DNA complementar) foi feita a partir de 2µg de RNA total dos tecidos fetais de camundongos, utilizando o *kit Superscript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen), com 0,5µg do iniciador d(T) ou 0,2µg d(N), segundo instruções do fabricante.

Para a reação de amplificação, o cDNA foi diluído em uma proporção de 1:10 e 1µl foi usado na PCR, juntamente com 2,5µmol dos iniciadores senso e antisenso, tampão 1X, 1 unidade de *Taq Polymerase* (GE Healthcare) e 1,25mM de dNTPs.

A tabela 1 mostra a sequência de cada iniciador testado, as temperaturas de anelamento das reações, e o tamanho dos fragmentos gerados. A amplificação foi realizada no termociclador *Peltier Thermal Cycler* (MJ Research), e o programa de ciclagem utilizado foi 94°C por três minutos, 34 ciclos de (94°C por 45 segundos, as temperaturas de anelamento especificadas na tabela 1 durante 1 minuto, e 72°C por um minuto) e um tempo adicional de extensão (a 72°C) de cinco minutos. Os resultados das amplificações foram visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio 0,5 µg/ml.

Iniciadores	Seqüência 5' - 3'	F (pb)	T (°C)
D T	TGCAAGCGCCGGGTGAATA GCTGTACAGATGTGTGGGT	550	60
S R	AGGGGCTGCTGCTGCTGGAA TCCACGACTCTCCCTACT	356	60
I SO	CATGGCAGGCACTCAGC GCTGCAAGCTGGGCTG	334	58
3' UTR F 3' UTR R	AGTCAGTATCCAGCCCAGTT ATAGATTTCCTCCTTACC	331	55

Tabela 1: Iniciadores utilizados na obtenção de ribossondas para hibridação in situ. Para cada par de iniciadores, à direita se encontram o tamanho do fragmento gerado (F) e a temperatura de anelamento (T °C) das reações de PCR.

3.1.1.3. Clonagem dos fragmentos em pGEM

Cada fragmento gerado foi clonado no vetor *pGEM T-Easy* (Promega), conforme instrução do fabricante. O plasmídeo resultante foi usado na transformação de bactérias competentes.

3.1.1.4. Transformação da ligação em bactérias

Alíquotas de 100µl de bactérias competentes (DH10B) foram descongeladas e a cada uma delas foi adicionado o volume total da ligação. As misturas foram mantidas em gelo por 30 minutos. Em seguida, as bactérias foram colocadas a 37°C por 1 minuto e novamente no gelo por 2 minutos. Após adicionar 0,5ml de meio de cultura LB (10g de peptona, 5g de extrato de levedura e 10g de NaCl para um volume de 1litro), as bactérias foram incubadas a 37°C por 45 minutos e então plaqueadas em LB-Ágar com 100µg/ml de ampicilina. As placas foram incubadas por 14-16h a 37°C.

3.1.1.5. Preparação do plasmídeo em pequena escala (miniprep)

Colônias isoladas de bactérias contendo os plasmídeos de interesse foram inoculadas em 3ml de LB contendo 100µg/ml de ampicilina, e incubadas a 37°C durante 14-16h sob agitação. O plasmídeo foi isolado utilizando o *Fast Plasmid Kit* (Eppendorf), conforme orientação do fabricante. O DNA plasmídeo foi ressuspenso em 50µl de água deionizada contendo 20ng/µl de RNase.

3.1.1.6. Digestão com enzimas de restrição

Os plasmídeos contendo os insertos de interesse foram digeridos com a enzima de restrição *Eco RI* (GE Healthcare), na proporção de 2 unidades por 1µg de DNA por 2 horas. O produto da digestão foi visualizado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. A banda correspondente ao fragmento foi purificada do gel com o kit *Perfectprep Gel Cleanup* (Eppendorf) e quantificada em gel de agarose 1% com o marcador de peso molecular *low mass ladder* (Invitrogen).

3.1.1.7. Clonagem em pBluescript

Os fragmentos foram subclonados em *pBluescript* (Stratagene) previamente digerido com *EcoRI* (GE Healthcare). Para a ligação entre o produto de interesse e o vetor em questão utilizou-se 10ng do último e uma proporção molar de 3 e 6 vezes mais do fragmento de interesse.

A ligação foi feita utilizando *T4 ligase* (New England Biolabs) a 15°C por 16 horas, segundo instruções do fabricante. Em seguida, ela foi transformada em bactérias competentes; o plasmídeo foi purificado e sua orientação foi confirmada por digestão com as enzimas de restrição, conforme os protocolos exibidos nos tópicos 3.1.1.4., 3.1.1.5. e 3.1.1.6., respectivamente. Além das digestões com enzimas de restrição, foram feitas reações de seqüenciamento para conferir a integridade dos fragmentos.

3.1.1.8. Seqüenciamento de plasmídeos

Para as reações de seqüenciamento dos clones utilizou-se o *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (GE Healthcare), específico para o aparelho MegaBACETM1000 (GE Healthcare). Foram utilizados 4µl do *mix* do *kit* de seqüenciamento, 0,5µg de plasmídeo e 0,25µM do iniciador específico (T3 -5' ATTAACCCTCACTAAAGGGA 3' ou T7 - 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') em um volume final de 10µl. A reação foi precipitada com 1µl de acetato de amônia e 30µl de etanol 95%. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 12000 rpm e o sobrenadante foi aspirado. Aos tubos foram adicionados 100µl de etanol 70%, seguido de nova centrifugação de 12000rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi removido. O precipitado foi seco por 1 minuto a 95°C e ressuspendido em tampão fornecido pelo *kit*.

3.1.1.9. Preparação de plasmídeo em média escala (midiprep) e purificação do plasmídeo

Foi feita preparação em média escala (*midiprep*), utilizando o *kit Perfect Plasmid Midi* (Eppendorf), segundo instruções do mesmo. Em seguida, o plasmídeo foi quantificado em espectrofotômetro e 6µg foram linearizados com as enzimas de restrição *NotI* (New England Biolabs) ou *XhoI* (GE Healthcare). Os produtos desta digestão foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5µg/ml.

O plasmídeo linearizado foi submetido a um tratamento com proteinase K (100µg/ml) para eliminar atividades de RNAses durante 2 horas a 65°C. A reação foi interrompida por extrações fenol:clorofórmio (1:1) e clorofórmio 100%, e o DNA

linearizado foi precipitado pela adição de 10% do volume de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 4X volume de etanol 100%. A mistura foi deixada por pelo menos trinta minutos a -80°C e em seguida centrifugada a 14000rpm por meia hora a 4°C . O precipitado foi seco e ressuspendido em água tratada com dietilpirocarbonato (H_2O DEPC), numa concentração final de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

3.1.1.10. Transcrição in vitro - síntese da ribossonda

A síntese de RNA foi feita utilizando o *kit* *Maxiscript* (Ambion). Para cada $1\mu\text{l}$ do plasmídeo linearizado foram adicionados 1X tampão de transcrição, $2\mu\text{l}$ de *mix* de nucleotídeos marcados com digoxigenina (Roche), $1\mu\text{l}$ de inibidor de RNase (RNAsin-Promega), $2\mu\text{l}$ DTT 100mM, 10 unidades de RNA polimerase e $10\mu\text{l}$ de H_2O DEPC, num volume final de $20\mu\text{l}$. Essa reação foi incubada a 37°C por duas horas. Em seguida, foram adicionadas 2 unidades de DNase I (Promega), e a reação prosseguiu a 37°C por mais quinze minutos. A síntese foi interrompida acrescentando-se $2\mu\text{l}$ de EDTA 0,2M pH 8.0.

Para precipitação do RNA, foram adicionados $5\mu\text{l}$ de acetato de sódio 3M pH 5.2 e $150\mu\text{l}$ de etanol 100%, e estes foram mantidos a -80°C por 30 minutos. Em seguida, foi feita uma centrifugação de 14000rpm por 30 minutos a 4°C . O precipitado contendo o RNA foi seco e ressuspendido em $90\mu\text{l}$ de H_2O DEPC (aproximadamente $0,1\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Uma alíquota de cada tubo foi usada para checagem em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, e o restante foi guardado a -70°C .

3.1.2. Obtenção de embriões de camundongos

Embriões de camundongos da linhagem C57/Bl6 foram coletados entre os dias 9.5 e 17.5 após a fertilização (dpc), contados a partir da 0 hora do dia em que se observou a presença de *plug* vaginal (tampão mucoso na abertura da vagina) nas fêmeas.

3.1.3. Processamento dos embriões

Os embriões foram coletados em solução PBS-DEPC 2.7mM (KCl, 1.4mM KH₂PO₄, 4.3mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 137mM NaCl pH 7,4, tratado com 0,1% de DEPC) e desidratados em solução de 30% sacarose em PBS-DEPC. Em seguida, os espécimes foram fixados em 4% paraformaldeído (PFA) durante 12 horas.

Cada embrião foi emblocado em Tissue Tek (*O.C.T. Compound* - Sakura) e cortes sagitais, parassagitais e transversais de 12µm de espessura foram feitos em criostato. Os cortes foram organizados em lâminas (*Superfrost Plus Slides* - Fisher Scientific) e armazenados em freezer -80°C até sua utilização nas hibridações *in situ*.

3.1.4. Hibridação in situ em cortes de embriões

As lâminas foram descongeladas a 55°C por 15 minutos. Após completa secagem, elas foram fixadas com PFA 4% e glutaraldeído/PBS 0,2%, a temperatura ambiente (TA) por 10 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados por três vezes de cinco minutos cada com PBT (PBS + 0,1% Tween 20); acrescentou-se então H₂O₂ / PBT por 10 minutos para

clareamento dos cortes. Após o tratamento, as lâminas foram lavadas por três vezes de cinco minutos a TA com PBT. As lâminas foram então tratadas com 10µg/ml de proteinase K em PBT por 2 minutos, e a reação foi interrompida com 2mg/ml de glicina/PBT por 10 minutos a TA. As lâminas foram novamente fixadas com PFA 4% e 0,2% de glutaraldeído/PBS a TA por 10 minutos, e lavadas três vezes com PBT por cinco minutos a TA. Os cortes foram incubados a 65°C com solução de pré-hibridação (formamida 50%, 5X SSC, heparina 50µg/ml, RNAt 50µg/ml - Invitrogen - e SDS 1%) por uma hora. Posteriormente, foi adicionada aos cortes a solução de hibridação (solução de pré-hibridação + ribossonda); as lâminas foram cobertas com *parafilm* e colocadas em por aproximadamente 16 horas a 65°C.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas por três vezes com a Solução 1 (formamida 50%, SSC 6% e SDS 1%), por 15 minutos cada, a 65°C. Em seguida, foram lavadas três vezes de 15 minutos a 65°C com a Solução 2 (formamida 50%, SSC 2,4%). Os cortes foram lavados por três vezes de cinco minutos a TA com a solução de MAB_{Lev,Tw} (100mM ácido maléico, 15mM NaCl, 2mM Levamisole e 0,1%Tween 20, pH7,5). As lâminas foram então incubadas por 2 horas com solução de alta concentração protéica (10% soro de ovelha inativado e 2% BMB *blocking solution* – Boehringer - em tampão MAB_{Lev,Tw}) a TA, a fim de bloquear ligações inespecíficas do anticorpo. Finalmente, os cortes foram tratados com anticorpo anti-digoxigenina 1:2000 em MAB_{Lev,Tw} com soro de ovelha 10% a 4°C por 16 horas.

No terceiro dia, as lâminas foram lavadas seis vezes com MAB_{Lev,Tw}, três vezes por cinco minutos a TA e três vezes de 30 minutos, e deixados por 16 horas em MAB_{Lev,Tw} a 4°C.

As lâminas foram tratadas com a solução de NTMT (100mM NaCl, 100mM Tris pH9.5, 50mM MgCl₂, 0,1% Tween 20, 2mM Levamisole) por três vezes de dez minutos a

TA. Em seguida, foram incubadas em recipiente protegido da luz com substrato para a fosfatase alcalina, BCIP/NBT (117µg/ml BCIP, 225µg/ml NBT em NTMT), ou *BM Purple* (2mM Levamisole, 0,1% Tween 20 em *BM Purple* - Boehringer). A reação foi interrompida com lavagens de PBS por 1 hora e em seguida os cortes foram fixados em 4% PFA a 4°C. As lâminas foram cobertas com lamínulas em solução de glicerol 50% em PBS e analisadas e fotografadas no microscópio (Nikon Eclipse E600 – *Image Pro Plus*).

3.2. Efeito do silenciamento (*knockdown*) de *HIPK2* por shRNA (*short hairpin RNA*) em cultura celular

3.2.1. Desenhos dos oligonucleotídeos e clonagem em pSuper

Para desenho dos oligonucleotídeos de 19pb a serem utilizados no silenciamento de *HIPK2* foram consultados programas disponíveis na Internet: *RNAi Design 3.6* (<http://www.changbioscience.com/stat/sirna.html>), *Genescript siRNA design* (<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai>) e *Wistar Institute siRNA selector* (<http://hydra1.wistar.upenn.edu/Projects/siRNA/siRNAindex.htm>). As seqüências obtidas foram analisadas pelo programa BLAST, a fim de excluir aquelas que apresentassem homologia com outros genes ou EST humanos. Os oligonucleotídeos com as seqüências alvo para silenciamento de *HIPK2* estão listados na tabela 2. A seqüência OLIGO S já havia sido utilizada com êxito no trabalho de Di Stefano e colaboradores (2004), e por esta razão foi incluída nos experimentos subseqüentes.

O anelamento dos oligonucleotídeos chamados *For* e *Rev* foi feito utilizando 50 ng de cada, tampão de anelamento (100mM tris pH8.0, 50mM MgCl₂) para um volume final

de 50µl, e as seguintes condições: 88°C por dois minutos, 65°C por 10 minutos, 37°C por 10 minutos, temperatura ambiente por 1 hora.

OLIGO 3	<p>For</p> <p>5'gateccccGACACCAGATGACCATGAAttcaagagaTTCATGGTCATCTGGTGTCtttttgaaa3'</p> <p>Rev</p> <p>5'agcttttccaaaaGACACCAGATGACCATGAAtctcttgaaTTCATGGTCATCTGGTGTCggg3'</p>
OLIGO 4	<p>For</p> <p>5'gateccccGCACCAGTCATCTGTGAGAttcaagagaTCTCACAGATGACTGGTGTCtttttgaaa3'</p> <p>Rev</p> <p>5'agcttttccaaaaGCACCAGTCATCTGTGAGAtctcttgaaTCTCACAGATGACTGGTGTCggg3'</p>
OLIGO 5	<p>For</p> <p>5'gateccccGAAAGTACATTTTCAACTGttcaagagaCAGTTGAAAATGTACTTTCtttttgaaa3'</p> <p>Rev</p> <p>5'agcttttccaaaaGAAAGTACATTTTCAACTGtctcttgaaCAGTTGAAAATGTACTTTCggg3'</p>

Tabela 2: Oligonucleotídeos desenhados e sintetizados a partir da sequência de HIPK2 para expressão de shRNA. Em vermelho, as sequências específicas do transcrito de HIPK2, e entre elas se encontra uma região espaçadora para formar o loop do hairpin. As extremidades possuem sítios de restrição para as enzimas Bgl II e Hind III.

Os oligonucleotídeos anelados foram ligados ao vetor de supressão de expressão em mamíferos *pSuper* (OligoEngine), previamente digerido com 30 unidades das enzimas *Bgl II* (New England Biolabs) e *Hind III* (GE Healthcare), gerando extremidades coesivas para ligação com os oligonucleotídeos. Cinquenta nanogramas do vetor foram ligados a

1ng de cada par dos oligonucleotídeos anelados, e à mistura foi adicionada a enzima *T4 ligase* (New England Biolabs), juntamente com o tampão próprio. Os tubos foram mantidos a 16°C por aproximadamente 16 horas. Os procedimentos para inserção dos plasmídeos resultantes em bactérias competentes e sua posterior extração por *kit* para *minipreps* encontram-se nos itens 3.1.1.4. e 3.1.1.5., respectivamente.

Os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição *BamHI* (GE Healthcare) e *Hind III* (GE Healthcare). O produto da digestão foi visualizado em gel de agarose 2%, e os clones positivos foram seqüenciados. Como o vetor em questão (*pSuper*) também possui as regiões promotoras T3 e T7, o protocolo de sequenciamento dos plasmídeos foi realizado exatamente como descrito no tópico 3.1.1.8.

3.2.2. Preparação de plasmídeo em larga escala (Maxiprep)

Uma colônia isolada de cada construção e também de bactérias transformadas com *pSuper* original (usado com controle negativo nos experimentos subseqüentes) foi inoculada em meio LB contendo 100µg/ml de ampicilina, e incubada a 37°C durante aproximadamente 8 horas sob agitação. Uma alíquota desses pré-inóculos foi re-inoculada em 100ml de LB contendo 100µg/ml de ampicilina e incubada durante 14-16 horas sob agitação a 37°C. A partir dessas culturas, o DNA plasmideal foi obtido em larga escala utilizando o *EndoFree Plasmid Maxi Kit* (Qiagen), conforme orientações do fabricante.

3.2.3. Transfecção de células 293 EBNA

Células embrionárias de rim humano (293 EBNA) foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS - Cultilab), 1% de L-glutamina 200mM (Invitrogen) e 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma), e mantidos em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Quando atingiram confluência, as células foram lavadas com DPBS (Dulbecco's PBS – Gibco/Invitrogen) e tripsinizadas (0,25% tripsina-0,02% EDTA – Invitrogen) por 2 minutos a 37°C e 5% CO₂. A digestão foi interrompida com a adição de meio de cultura com soro e as células foram transferidas para um tubo plástico de 15ml, de onde uma alíquota foi retirada para contagem das células em câmara de Neubauer (Knittel Gläser).

Cerca de $2,5 \cdot 10^5$ células foram transferidas para placas isoladas. No dia seguinte, cada grupo de células foi transfectado com uma das três construções para suprimir *HIPK2* endógena por RNAi, mais um vetor de resistência à puromicina pBabe-PURO gentilmente cedido pela Profª. Dra. Luciana Vasques (28µg de cada construção ou de *pSuper* sem oligo, e 0,2µg de pBabe PURO), utilizando lipofectamina (*kit LipofectAMINE PLUS*– Gibco/Invitrogen), conforme orientações do fabricante.

Durante um período de seleção de 10 dias (adicionando 250ng/ml de puromicina ao meio de cultura), os clones celulares foram coletados e transferidos para placas de 6 poços até atingirem uma confluência onde fosse possível extrair o DNA genômico e o RNA.

3.2.4. Descongelamento das células

A ampola criogênica contendo as células foi retirada do nitrogênio líquido e descongelada por 2 minutos a 37°C. O conteúdo foi misturado cuidadosamente num tubo plástico de 15ml juntamente com 5ml de meio de cultura, e a mistura foi centrifugada durante 5 minutos a TA a 1000rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em meio de cultura (especificado acima) e plaqueado em garrafa de área específica para a quantidade de células congeladas. A garrafa foi colocada em estufa de CO₂ a 37°C e, após 5 minutos, o conteúdo foi levemente agitado para que as células aderissem por igual por toda a área da garrafa. A garrafa foi então devolvida à estufa.

3.2.5. Congelamento das células

As células cultivadas foram lavadas com DPBS (Gibco/Invitrogen) e tripsinizadas a 37°C e 5% CO₂. Após 2 minutos, o conteúdo foi centrifugado a 1000rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em meio de congelamento (10% DMSO, 20% soro fetal bovino e 70% DMEM), em volume final de 1ml. As células foram transferidas para tubos criogênicos e estes foram colocados a -70°C por até um mês. Por fim, os tubos com as células foram armazenados em nitrogênio líquido.

3.2.6. Extração de DNA das células

Quando o poço da placa de seis poços apresentava mais de 70% de confluência, $\frac{1}{10}$ das células era separado em um tubo de 1,7ml e centrifugado por 5 minutos a 10.000rpm. O sobrenadante foi descartado, e ao pellet de células foi adicionado 700µl de tampão de lise (100mM Tris-HCl pH8,5; 5mM EDTA; 0,2% SDS; 200mM NaCl; 100µg/ml Proteinase K - Invitrogen). A amostra foi então incubada por 16 horas à 37°C. Em seguida, 700µl de isopropanol foram adicionados ao tubo, que foi então deixado a -20°C por pelo menos 30 minutos para precipitação do DNA. Após uma centrifugação de 15 minutos a 13000rpm, o pellet de DNA foi lavado com 500µl de etanol 70%. Depois de uma nova centrifugação, retirou-se o etanol, o precipitado foi seco a temperatura ambiente e o DNA foi ressuscitado em 50µl de H₂O.

3.2.7. Verificação de clones celulares positivos

Dois microlitros de DNA genômico extraído das células transfectadas foram usados numa PCR, utilizando 2,5µmol de cada um dos iniciadores T3 e T7, juntamente com o tampão específico, 1 unidade de *Taq Polimerase* e 1,25mM de dNTP. As condições de ciclagem foram: 94°C por 3 minutos, 34 ciclos de (94°C por 45 segundos, 55°C por 1 minuto, 72°C por 45 segundos), mais um tempo de extensão adicional de 3 minutos a 72°C. Os resultados foram visualizados em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio 0,5µg/ml.

3.2.8. Análise da expressão gênica nas células transfectadas

Quando os clones celulares confluíram num poço de placa de 6 poços, metade das células foi transferida para um tubo de 1,7ml, das quais se extraiu o RNA utilizando o *RNeasy mini kit*, conforme protocolo do fabricante (Qiagen). A síntese de cDNA foi realizada conforme detalhado no item 3.1.1.2.

Duas abordagens foram realizadas para conferirmos o silenciamento de *HIPK2* e os níveis de expressão de outros genes: RT-PCR semi-quantitativa e RT-PCR em tempo real (*Real Time PCR*). Nas reações de RT-PCR semi-quantitativas, utilizamos as seguintes condições de ciclagem: 94°C por 3 minutos, mais (94°C por 45 segundos, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto) pelo número de ciclos mínimo onde era possível observar amplificação sem saturar a reação, e um tempo de extensão adicional de 3 minutos a 72°C. Os iniciadores utilizados nestas reações foram: *HIPK2* (For 5'-TGCAAGCGCCGGGTGAATA-3' e Rev 5'-GCTGTACAGATGTGTGGGT-3') e *GAPDH* (For 5'-CTGCACCACCAACTGCTTA-3' e Rev 5'-CTAGACGGCAGGTCAGGTC-3').

3.2.8.1. RT- PCR em tempo real (Real Time-PCR)

A lista com as seqüências dos iniciadores utilizados nas RT-PCRs em tempo real encontra-se na tabela 3.

Antes da análise de expressão gênica nos clones, foram feitos testes de validação, para determinar se as eficiências de amplificação dos genes alvo e controle endógeno eram aproximadamente iguais. Para análise dos resultados, foi utilizado como referência o guia

disponibilizado pela empresa do equipamento (*User Bulletin #2: Relative Quantification of Gene Expression*, da Applied Biosystems).

Iniciador	Sequência 5' - 3'
<i>GAPD For</i>	CTCTCTGCTCCTCCTGTTCGAC
<i>GAPD Rev</i>	TGAGCGATGTGGCTCGGCT
<i>HPRT1 For</i>	TTCCTTGGTCAGGCAGTATAATCC
<i>HPRT1 Rev</i>	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
<i>HMBS For</i>	CTGGAAGGAGGCTGCAGTGT
<i>HMBS Rev</i>	TACAGTTGCCCATCCTTCATAGC
<i>HIPK1 For</i>	CAGTCACGTTACTACAGAGCTCCTGA
<i>HIPK1 Rev</i>	AGCACCATAAAGAGGCCAT
<i>HIPK2 For</i>	CCCGGCTTCCAAGGCTT
<i>HIPK2 Rev</i>	TTCCATTTCGCACCGAGTAGC
<i>HIPK3 For</i>	GAGACCGAATAGTATGTCAGATGAAGAG
<i>HIPK3 Rev</i>	ATGCCCGGAAGAGTCAGATG
<i>PAX6 For</i>	GAAAGGATGCCTCATAAAGGGG
<i>PAX6 Rev</i>	GGGCTCTGAAATCTCGGATGTC
<i>NKX 2.5 For</i>	GCCGAAAAGAAAGAGCTGTG
<i>NKX 2.5 Rev</i>	AGGTACCGCTGCTGCTTG
<i>NKX 3.1 For</i>	CAGAGACCGAGCCAGAAAGG
<i>NKX 3.1 Rev</i>	CTCGATCACCTGAGTGTGGGA
<i>NKX 6.1 For</i>	CCTGTACCCCTCATCAAGGA
<i>NKX 6.1 Rev</i>	CAACGAATAGGCCAAACGAG

Tabela 3: Iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real (Real Time-PCR).

Nos experimentos de validação, foi utilizada a concentração de iniciadores recomendada pelo guia de referência do aparelho (50 η mol). Foram submetidas às reações diferentes concentrações do cDNA (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 η g) obtido das células, para que pudéssemos definir uma concentração ótima para reação. No caso, 25 η g foram suficientes, e essa concentração foi utilizada nos experimentos posteriores.

Nos experimentos de RT-PCR em tempo real usamos o intercalador *SyBR Green* e a plataforma *ABIPRISM® 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems). A amplificação foi realizada em placas ópticas de 96 poços (Applied Biosystems), e todas as reações foram feitas em triplicatas. A reação foi feita com 12,5 μ l de *SyBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 0,1 μ mol de cada iniciador e 25 η g de cDNA, em um volume final de 25 μ l. As condições de ciclagem foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de (95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minutos). A análise dos dados foi feita pelo programa do equipamento (*7500 System SDS Software* – Applied Biosystems). Foram utilizados como controles endógenos das amplificações os genes *HPRT1*, *HMBS* e *GAPD*.

Ao final de cada reação, sempre era realizada uma curva de dissociação, como controle da presença de contaminações e/ou *primer-dimers*.

4.1. Perfil de expressão de *Hipk2* durante o desenvolvimento embrionário

4.1.1. Síntese da ribossonda para as reações de hibridação *in situ*

Quatro regiões do transcrito de *Hipk2* foram selecionadas como potenciais locais de ribossondas de hibridações *in situ*. A figura 4 mostra um esquema da sequência de *Hipk2* murina e os locais escolhidos para desenho das ribossondas. As regiões não possuem homologia com outros transcritos de camundongos, e uma delas (sonda ISO) já havia sido utilizada no trabalho de Pierantoni e colaboradores (2002). Além disso, as quatro ribossondas foram desenhadas de modo a não incluírem a região codificadora do domínio quinase, pois este é muito conservado entre as proteínas Hipks (KIM *et al.*, 1998; revisto por CALZADO *et al.*, 2007), o que poderia dificultar as análises de expressão.

Assim, quatro pares de iniciadores foram desenhados para amplificação de cada uma dessas regiões, a partir de cDNA de cérebro de camundongos de 17.5 dpc. O produto das amplificações foi clonado em *pGEM-T Easy*, e subclonado em *pBluescript*, um vetor que possui as regiões promotoras T3 e T7, a partir das quais foram transcritas as sondas de RNA senso e antisenso. A presença dos insertos de interesse e sua orientação no plasmídeo *pBluescript* foram confirmadas por digestão com enzimas de restrição e seqüenciamento.

Figura 4: Diagrama esquemático da sequência de cDNA de Hipk2 murina e a localização das regiões selecionadas para ribossondas nas hibridações *in situ*. PK: sequência codificadora do domínio quinase; HID: sequência codificadora do domínio de interação com homeoproteínas; PEST: sequência que codifica domínio rico em prolina, ácido glutâmico, serina e treonina; YH: sequência que codifica domínio rico em histidina e tirosina. Em vermelho, o códon iniciador ATG. As linhas pretas abaixo do diagrama representam a localização das ribossondas no transcrito de *Hipk2*.

4.1.2. Hibridação *in situ* em cortes histológicos de embriões de camundongos

Esta parte do trabalho foi realizada no laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração (InCor-HC), sob co-orientação do Prof. Dr. José Xavier-Neto.

Inicialmente, as hibridações *in situ* foram feitas com cada uma das ribossondas para *Hipk2* isoladamente, sempre utilizando como controle positivo uma ribossonda para o gene da *Raldh2*, cuja funcionalidade já havia sido testada pelo grupo do Prof. Dr. José Xavier-Neto (HOCHGREB *et al.*, 2003). Como nenhuma das ribossondas para *Hipk2* geraram sinal significativo quando utilizadas isoladamente, as quatro foram adicionadas em conjunto na solução de hibridação, o que resultou em distinta marcação, com *background* desprezível. Cortes de embriões expostos à sonda senso, controles negativos da hibridação, não apresentaram marcação.

As figuras abaixo exibem o perfil de expressão de *Hipk2* ao longo do desenvolvimento de camundongos obtidos por esta estratégia. Com 9.5dpc, é possível observar uma expressão ampla em diversos tecidos (Fig. 5).

Figura 5: *Expressão de Hipk2 em embrião de 9.5dpc.* Acima, à esquerda, a ampla expressão de *Hipk2* é observada no corte incubado com a sonda antisense. Acima, à direita, embrião incubado com a sonda senso, utilizado como controle negativo da hibridação *in situ*. Abaixo, ampliação do embrião incubado com a sonda antisense.

De forma geral, com 11.5dpc (Fig. 6) e 12.5dpc (Fig. 7), ainda pode-se observar uma ampla distribuição de *Hipk2*, com maior marcação no tubo neural, na zona ventricular

do córtex cerebral em desenvolvimento, no músculo da língua e em gânglios nervosos dorsais.

Figura 6: *Expressão de Hipk2 em cortes sagitais de embriões de 11.5dpc.* Acima, representação esquemática do corte realizado (retirado de KAUFMAN, 1992). Abaixo, à esquerda, vista da região cranial do embrião. À direita, em maior aumento, regiões onde detectou-se maior expressão de *Hipk2*. PN: primórdio de cartilagem do septo nasal; TN: tubo neural; ZV: zona ventricular do córtex.

Figura 7: *Expressão de Hipk2 em embriões de 12.5dpc.* Em A, à esquerda, corte parassagital de embrião de 12.5dpc, mostrando ampla expressão de *Hipk2* (L: língua; MO: medula oblonga; ME: medula espinhal). À direita, detalhe de expressão de *Hipk2* em dutos mesonéfricos (DM). Em B, o transcrito de *Hipk2* é encontrado nos gânglios da raiz dorsal (GD).

A expressão de *Hipk2* no embrião entre o 13º e o 14º dia pós-coito não se altera (Fig. 8 e 9). Porém, cortes transversais da região cranial de embriões com 14. dpc foram submetidos à hibridação *in situ*, revelando regiões do sistema nervoso central em desenvolvimento com expressão diferencial de *Hipk2*, principalmente no gânglio trigeminal e vestibulococlear, na medula espinhal e no olho (Fig. 9C).

Figura 8: Expressão de *Hipk2* em embriões de 13.5dpc. Em A, região dorsal do embrião (ver representação acima, retirado de KAUFMAN, 1992) mostrando expressão do gene na medula espinhal (ME). Em B, ampliação mostrando expressão de *Hipk2* nos gânglios nervosos dorsais (GD). Em C, região cranial, onde a expressão de *Hipk2* é observada no cérebro em desenvolvimento (MO: medula oblonga; MS: mesencéfalo; PT: ponte).

Figura 9: Perfil de expressão de *Hipk2* em embriões de 14.5dpc. Em A, cortes parasagittais de embriões mostrando tecidos com maior expressão de *Hipk2* (Co: plexo coróide; EO: epitélio olfativo; GD: gânglios nervosos dorsais; Mck: cartilagem de Merckel; ME: medula espinhal; N: cavidade nasal; P: ponte). Em B, à esquerda, representação dos cortes transversais da região cranial realizados (retirado de KAUFMAN, 1992). À direita, regiões com maior expressão de *Hipk2*. EP - epitélio pigmentar da retina; GT - gânglio trigeminal; GV - gânglio vestibulococlear; L - lente; ME: medula espinhal; RN - retina neural.

A partir do 14.5dpc, a expressão de *Hipk2* passa a ser menos ubíqua, e em embriões de 15.5dpc e 17.5dpc, ela se restringe a tecidos nervosos e epitélios de tecidos (Figs. 10 e 11).

Figura 10: Expressão de *Hipk2* por hibridação in situ em cortes parassagittais de embriões de 15.5dpc. Acima, representação do corte feito no embrião (retirado de KAUFMAN, 1992). O transcrito de *Hipk2* é observado no córtex cerebral (CE), no ventrículo cardíaco (V), no fígado (F), nos epitélios do estômago (E) e do intestino (I) e no rim (R). À direita, em detalhe, a expressão de *Hipk2* é observada nos dutos mesonéfricos renais.

Figura 11: *Expressão de Hipk2 em embriões de 17.5dpc.* Em A, à esquerda, cortes incubados com sonda antisenso (as). À direita, cortes incubados com sonda senso (s - controle negativo). Em B, à direita, detalhe da marcação em gânglios dorsais (GD). C: coração; L: língua; M: músculo; ME: medula; P: pulmão; T: timo. O corte realizado está representado (retirado de KAUFMAN, 1992).

A tabela 4 relaciona as etapas do desenvolvimento embrionário e os tecidos onde foi detectada maior expressão de *Hipk2*. Pode-se observar uma prevalência de expressão de *Hipk2* em tecidos nervosos, desde os estágios mais precoces avaliados.

Estágio do desenvolvimento embrionário (dias pós-coito – dpc)	Expressão de <i>Hipk2</i>
9.5	Ampla expressão
11.5	Expressão ubíqua Tubo neural Zona ventricular do córtex Primórdio de cartilagem nasal
12.5	Expressão ubíqua Tubo neural Gânglios nervosos dorsais Dutos mesonéfricos
13.5	Expressão ubíqua Cérebro e medula espinhal Gânglios nervosos dorsais
14.5	Expressão ubíqua Cérebro e medula espinhal Gânglio trigeminal e vestibulococlear Epitélio olfativo Olho (lente, retina neural) Cartilagem de Merckel Língua
15.5	Cérebro Rim (dutos mesonéfricos) Fígado Epitélio intestinal e estomacal
17.5	Cérebro e medula espinhal Gânglios nervosos dorsais Ventrículo cardíaco Músculos Timo Pulmão

Tabela 4: Expressão de *Hipk2* ao longo do desenvolvimento embrionário de camundongos. A presença do transcrito de *Hipk2* foi avaliada por hibridação *in situ* em cortes histológicos de embriões.

4.2. Regulação por *HIPK2* da expressão de genes *homeobox* e *HIPKs*

4.2.1. Construção dos vetores para silenciamento de *HIPK2*

Segundo Naito e colaboradores (2004), para maior eficiência do siRNA em mamíferos, alguns critérios devem ser obedecidos: ausência de repetição das bases C e G em mais de 9pb; presença de A ou U na extremidade 5' da fita antisense; enriquecimento das bases A e U na extremidade 5' antisense; e presença na extremidade 5' senso das bases G ou C (Fig. 12A). No total, três regiões do transcrito de *HIPK2* foram selecionadas como alvo para o silenciamento: duas seqüências foram escolhidas pelos programas disponíveis na rede e uma terceira utilizada com sucesso por Di Stefano e colaboradores (2004). É interessante notar que não houve consenso entre as seqüências obtidas pelos programas. A figura 12B mostra as seqüências-alvo de 19nt para silenciamento de *HIPK2* humana. A partir destas seqüências, foram desenhados e sintetizados três pares de oligonucleotídeos (OLIGO 3, OLIGO 4 e OLIGO S, Tab. 2).

A

B

1	ttacagggcc	cctgagatca	tccttggttt	accatthttgt	gaggcaattg	acatgtggtc	
61	cctgggctgt	gttattgcag	aattgttcc	gggttgccg	ttatatccag	gagcttcgga	
121	gtatgatcag	attcgtata	ttcacaaac	acagggttg	cctgctgaat	atttattaag	
181	cgccgggaca	aagacaacta	ggtttttcaa	ccgtgacacg	gactcaccat	atcctttgtg	
241	gagactgaag	acaccagatg	accatgaagc	agagacaggg	attaagtcaa	aagaagcaag	siRNA3
301	aaagtacatt	ttcaactgtt	tagatgatat	ggcccagggtg	aacatgacga	cagatttgga	siRNAS
361	agggagcgac	atgttggtag	aaaaggctga	ccggcgggag	ttcattgacc	tgttgaagaa	
421	gatgctgacc	attgatgctg	acaagagaat	cactccaatc	gaaaccctga	accatccctt	
481	tgtcaccatg	acacacttac	tcgattttcc	ccacagcaca	cacgtcaa	catgtttcca	
541	gaacatggag	atctgcaagc	gtcgggtgaa	tatgtatgac	acggtgaacc	agagcaaaac	
601	cccttttcac	acgcacgtgg	ccccacgac	gtccaccaac	ctgaccatga	cctttaacaa	
661	ccagctgacc	actgtccaca	accaggctcc	ctcctctacc	agtgccacta	tttccttagc	
721	caatcccgaa	gtctccatac	taaactaccc	atctacactc	taccagccct	cagcggcatc	
781	catggctgca	gtggcccagc	ggagcatgcc	cctgcagaca	ggaacagccc	agatttgtgc	
841	ccggcctgac	ccgttccagc	aagctctcat	cgtgtgtccc	cccggcttcc	aaggcttgca	
901	ggcctctccc	tctaagcacg	ctggctactc	ggtgcgaatg	gaaaatgcag	ttcccatcgt	
961	cactcaagcc	ccaggagctc	agcctcttca	gatccaacca	ggtctgcttg	cccagcaggc	
1021	ttggccaagt	gggacccagc	agatcctgct	tccccagca	tggcagcaac	tgactggagt	
1081	ggccacccac	acatcagtgc	agcatgccac	cgtgattccc	gagaccatgg	caggcaccac	
1141	gcagctggcg	gactggagaa	atacgcatgc	tcacggaagc	cattataatc	ccatcatgca	
1201	gcagcctgca	ctattgaccg	gtcatgtgac	ccttccagca	gcacagccct	taaatgtggg	
1261	tgtggccac	gtgatgcggc	agcagccaac	cagcaccacc	tcctcccggg	agagtaagca	
1321	gcaccagtca	tctgtgagaa	atgtctccac	ctgtgagggtg	tcctcctctc	aggccatcag	siRNA4
1381	ctccccacag	cgatccaagc	gtgtcaagga	gaacacacct	ccccgctgtg	ccatgggtga	
1441	cagtagcccg	gcctgcagca	cctcgggtcac	ctgtgggtgg	ggcgacgtgg	cctccagcac	
1501	caccggggaa	cggcagcggc	agacaattgt	cattcccagc	actcccagcc	ccacgggtcag	
1561	cgtcatcacc	atcagcagtg	acacggacga	ggaggaggaa	cagaaacacg	ccccaccag	
1621	cactgtctcc	aagcaaagaa	aaaacgtcat	cagctgtgtc	acagtccacg	actcccccta	
1681	ctccgactcc	tccagcaaca	ccagccccta	ctccgtgcag	cagcgtgctg	ggcacaacaa	
1741	tgccaatgcc	tttgacacca	aggggagcct	ggagaatcac	tgacggggga	accccgaac	
1801	catcatcgtg	ccacccctga	aaacccaggc	cagcgaagta	ttggtggagt	gtgatagcct	
1861	ggtgccagtc	aacaccagtc	accactcgtc	ctcctacaag	tccaagtctt	ccagcaacgt	
1921	gacctccacc	agcggtcact	cttcaggag	ctcatctgga	gccatcacct	accggcagca	
1981	gcggccgggc	cccacttcc	agcagcagca	gccactcaat	ctcagccagg	ctcagcagca	
2041	catcaccacg	gaccgcactg	ggagccaccg	aaggcagcag	gcctacatca	ctcccaccat	
2101	ggcccaggct	ccgtactcct	tcccgacaa	cagccccagc	cacggcactg	tgaccccgca	
2161	tctggctgca	gccgctgccg	ctgcccacct	ccccacccag	ccccacctct	acacctacac	
2221	tgcgcggcg	gccctgggct	ccaccggcac	cgtggcccac	ctggtggcct	cgcaaggctc	
2281	tgcgcgccac	accgtgcagc	acactgccta	cccagccagc	atcgtccacc	aggtccccgt	
2341	gagcatgggc	ccccgggtcc	tgccctcgcc	caccatccac	ccgagtcagt	atccagccca	
2401	atttgccac	cagacctaca	tcagcgctcc	gccagcctcc	accgtctaca	ctggataccc	
2461	actgagcccc	gccaaggtca	accagtaccc	ttacatataa	acactggagg	ggagggaggg	
2521	agggagggag	ggagagaatg	gcccagggga	ggagggagag	aaggagggag	gcgctcctgg	
2581	gaccgtgggc	gctggccttt	tatactgaag	atgccgcaca	caaacaatgc	aaacggggca	
2641	ggggcggggg	gggggggggc	agagggcag	gggacgggtc	gggacaccag	tgaaacttga	
2701	accgggaagt	gggaggacgt	agagcagaga	agagaacatt	tttaaaagga	agggattaaa	
2761	gaggggtggga	aatctatggt	ttttatttta	aaaaaaaaa	a		

Figura 12: Características das seqüências-alvo e sua localização no transcrito de HIPK2.

(A) Esquema ilustrativo das características de moléculas de siRNA apontadas por Naito e colaboradores (2004). Em verde, bases A, C, G ou T; azul claro e branco, bases A ou U; em vermelho, bases C ou G. Em (B) cDNA de *HIPK2*, e em amarelo localização das seqüências-alvo dos *siRNAs* utilizadas neste trabalho (GI:46852175 no *GeneBank*). À direita, em vermelho, os nomes dados às referidas seqüências.

4.2.2. Análise da funcionalidade dos shRNAs

Cada par de oligonucleotídeos foi anelado e clonado em *pSuper* (BRUMMELKAMP *et al.*, 2002), um vetor de expressão de shRNA comumente empregado em mamíferos. Após 60 *minipreps* de cada construção, foram obtidos 2 clones da construção *pSuper*+oligo3 (pS3), 4 clones da construção *pSuper*+oligo4 (pS4) e 1 clone *pSuper*+oligoS (pSS), indicando uma baixa eficiência de clonagem. Contudo, o seqüenciamento destes clones confirmou sua integridade.

Células 293 EBNA foram co-transfectadas com cada vetor de shRNA e pBabe, este último para seleção com puromicina. O vetor *pSuper* original (sem inserto) foi utilizado como controle negativo. Após dez dias de seleção com puromicina, colônias resistentes foram isoladas de cada construção, e a presença do respectivo vetor de expressão de shRNA confirmada por PCR a partir de DNA genômico das mesmas (Fig. 13). Cerca de 40% a 70% das colônias resistentes a puromicina continham o vetor de expressão de shRNA.

Figura 13: PCR para confirmação da presença do vetor pSuper nas células transfectadas. pS3, pS4 e pSS correspondem a células transfectadas com pS3, pS4 e pSS, respectivamente. pS refere-se a células transfectadas com o vetor original *pSuper*. C-: controle negativo sem DNA; M: marcador de peso molecular (1Kb *ladder*, Invitrogen). A seta indica o tamanho de 300pb.

Para avaliar a expressão de *HIPK2* por RT-PCR nestas células, foi feita a padronização do número mínimo de ciclos onde fosse possível visualizar o nível do transcrito de *HIPK2* sem saturar a reação (RT-PCR semi-quantitativa), utilizando-se *GAPDH* como gene normalizador da quantidade de cDNA das amostras (dados não mostrados). Definidos o número de ciclos (29 para *HIPK2* e 19 para *GAPDH*), foi realizada a RT-PCR semi-quantitativa das células transfectadas com as construções pS, pS3, pS4 e pSS (Fig. 14). Os iniciadores de *HIPK2* utilizados amplificam dois fragmentos, que se referem as duas isoformas de *HIPK2* originadas por *splicing* alternativo (STUKART, 2001).

Figura 14: Expressão de *HIPK2* em clones transfectados com vetores para silenciamento do gene por RT-PCR semi-quantitativa. Os respectivos vetores estão indicados acima de cada amostra. Os números 1 e 2 correspondem a dois clones de cada construção. *GAPDH* foi utilizado com normalizador.

Foi possível observar com clareza uma menor expressão do transcrito de *HIPK2* nos dois clones transfectados com o vetor pS4, indicando a eficácia desta construção na inativação de *HIPK2*. Embora não quantificada, pode-se verificar também diminuição de expressão de *HIPK2* nos clones obtidos após transfecção com as construções pS3 e pSS.

Para uma avaliação quantitativa definitiva da expressão de *HIPK2* após transfecção com vetores de silenciamento gênico, foram realizadas RT-PCRs em tempo real. A figura 15 mostra um gráfico de quantificação da expressão de *HIPK2*, tendo como normalizador o gene constitutivo *GAPDH*. Como não foi observada variação nos níveis dos transcritos de *HIPK2* entre os clones transfectados com *pSuper* por RT-PCR semi-quantitativa, utilizou-se como calibradora das reações de RT-PCR em tempo real uma amostra denominada *pSpool*, contendo cDNA dos diferentes clones resultantes da transfecção com o vetor *pSuper* original.

Figura 15: Quantificação da expressão de *HIPK2* em clones transfectados com vetores para silenciamento do gene por RT-PCR em tempo real. *GAPDH* foi usado com gene normalizador. A amostra calibradora da expressão dos genes foi denominada *pSpool*, e refere-se a um conjunto de quatro clones resultantes da transfecção com o vetor *pSuper* original. A expressão de dois clones de cada construção (pS3, pS4 e pSS) foi avaliada. Os experimentos foram feitos em triplicatas. As barras representam o erro padrão.

Alguns trabalhos apontam para possíveis erros decorrentes do uso de um único gene como normalizador nas RT-PCRs em tempo real (VANDESOMPELE *et al.*, 2002;

ZHANG *et al.*, 2005; DE KOK *et al.*, 2005). Assim, dois outros genes foram utilizados como normalizadores nas reações de RT-PCR em tempo real, *HMBS* e *HPRT1*. A figura 16 mostra os resultados destas reações feitas com os outros genes normalizadores, além de um gráfico com a média dos perfis de expressão de *HIPK2* entre os três genes endógenos testados.

Figura 16: Expressão de *HIPK2* em clones transfectados com vetores para silenciamento do gene por RT-PCR em tempo real, em relação a diferentes controles endógenos. Em A, o gene normalizador usado foi *HPRT1*, e em B, *HMBS*. Em C, gráfico composto pela média dos valores obtidos para os três genes normalizadores (*GAPDH*, *HPRT1* e *HMBS*). As barras representam o erro padrão.

Os resultados das RT-PCR em tempo real confirmaram que o vetor mais eficiente para inativação de *HIPK2* endógeno foi pS4. Independente do gene usado como controle endógeno, os dois clones obtidos após transfecção com pS4 tiveram menor expressão de *HIPK2*, se comparados com a amostra calibradora (*pSpool*). Este vetor foi utilizado nos experimentos seguintes de inativação de *HIPK2*.

A figura 17 mostra o resultado de uma RT-PCR em tempo real de outros clones obtidos da transfecção com o vetor pS4, usando como normalizadores os genes *HPRT1* e *GAPDH*.

Figura 17: Análise por RT-PCR em tempo real da expressão de *HIPK2* em diferentes clones transfectados com pS4. Os resultados representam a média das quantificações utilizando *HPRT1* e *GAPDH* como normalizadores e a amostra *pSuper* como calibradora das quantificações. Os experimentos foram realizados em triplicatas. As barras representam o erro padrão.

Em seis dos oito clones analisados houve diminuição na expressão de *HIPK2*, comprovando a eficiência do vetor pS4. Os clones pS4.1, pS4.2, pS4.6, pS4.33 e pS4.34

foram utilizados para avaliação do efeito do silenciamento de *HIPK2* na expressão de genes *homeobox* e *HIPKs*.

4.2.3. Efeito da inativação de *HIPK2* na expressão de genes *homeobox* e *HIPKs*

Clones transfectados com o vetor de silenciamento pS4 foram avaliados quanto à expressão dos genes *HIPK1* e *HIPK3*, e dos genes *homeobox* *NKX2.5*, *NKX3.1*, *NKX6.1* e *PAX6*.

A expressão destes genes foi analisada por RT-PCR em tempo real (Figs. 18 e 19). Optou-se por agrupar as células silenciadas (pS4.1, pS4.2, pS4.6, pS4.33 e pS4.34) em amostras únicas (*pool* de células), com o objetivo de se eliminar variações individuais dos clones.

A figura 18 mostra o gráfico de quantificação de expressão dos genes *HIPK1*, *HIPK2* e *HIPK3*. A diminuição de 71% no nível do transcrito de *HIPK2* provocou aumento considerável na expressão de *HIPK1* (114%), e em menor grau também em *HIPK3* (43%).

Figura 18: Efeito do silenciamento de *HIPK2* nos níveis de expressão dos genes *HIPKs*. Os resultados representam a média das quantificações utilizando *HPRT1*, *HMBS* e *GAPDH* como normalizadores e a amostra *pSuper* como calibradora das quantificações. Os experimentos foram realizados em triplicatas. As barras representam o erro padrão.

A figura 19 mostra a expressão dos genes *NKX2.5*, *NKX3.1*, *NKX6.1* e *PAX6*, após silenciamento de *HIPK2* por shRNA. Pode-se observar aumento do nível de expressão de *NKX3.1* e *NKX6.1* e *PAX6* (85%, 44% e 29%, respectivamente). Não foram observadas mudanças nos níveis de expressão de *NKX2.5*.

Figura 19: Efeito do silenciamento de HIPK2 nos níveis de expressão de genes homeobox. Os resultados representam a média das quantificações utilizando *HPRT1* e *GAPDH* como normalizadores e a amostra *pSuper* como calibradora das quantificações. Os experimentos foram realizados em triplicatas. As barras representam o erro padrão.

5.1. Perfil de expressão de *Hipk2* durante o desenvolvimento embrionário de camundongos

O objetivo deste trabalho foi inferir possíveis funções do gene *Hipk2* na embriogênese, avaliando seu perfil de expressão temporal e espacial durante o desenvolvimento de camundongos por hibridação *in situ*, uma ferramenta poderosa para este tipo de investigação.

A figura 20 resume o perfil de expressão espaço-temporal determinado para o gene *Hipk2* durante o desenvolvimento de camundongos. De maneira geral, a expressão é observada em níveis ubíquos a partir do 9.5dpc. A expressão do gene passa a ser maior em tecidos nervosos a partir de 11.5dpc, e se estende até a última fase do desenvolvimento analisada, em embriões com 17.5dpc. Outros órgãos como fígado e rim também são locais de expressão de *Hipk2*, mas nestes o transcrito foi observado em estágios mais tardios.

Os resultados observados discordam daqueles de Pierantoni e colaboradores (2002), que pela mesma técnica observaram a expressão do gene somente a partir do 15.5dpc. Neste trabalho foi identificada a expressão ampla a partir do 9.5dpc. Mais recentemente, Isono e colaboradores (2006) avaliaram a expressão de *Hipk2* especificamente no 9.5dpc, e concluíram também que o transcrito era amplamente expresso com maior concentração em tecidos nervosos, na vesícula óptica e na vesícula ótica.

Figura 20: Representação esquemática da expressão de *Hipk2* durante o desenvolvimento embrionário de camundongos. A definição do padrão de expressão é um compilado dos resultados obtidos neste trabalho e dos de Isono e colaboradores (2006). Da esquerda para a direita, embrião de 9.5dpc, 11.5dpc, 13.5dpc, 15.5dpc e 17.5dpc. Maiores intensidades de lilás indicam maior nível de expressão de *Hipk2*. Embriões de 9.5dpc exibem expressão ubíqua de *Hipk2*, e maior concentração do transcrito nas vesículas óptica e ótica. A expressão do gene é maior em tecidos nervosos a partir de 11.5dpc. O fígado também é um local de expressão de *Hipk2* depois de 13.5dpc. Em embriões mais velhos (15.5dpc e 17.5dpc), a presença do transcrito é observada na medula espinhal, fígado, rim, e em menor intensidade no cérebro. Dimensões meramente ilustrativas.

Wiggins e colaboradores (2004) verificaram a presença do transcrito de *Hipk2* em 12.5dpc, em gânglios sensores (trigeminal e vestibulococlear), em gânglios da raiz dorsal e no fígado. Os resultados deste trabalho mostram que, nesta fase do desenvolvimento, o gene é amplamente expresso, mas o transcrito é principalmente observado no cérebro, em gânglios nervosos da raiz dorsal, e em dutos mesonéfricos renais.

Os resultados aqui apresentados de maior expressão de *Hipk2* em tecidos nervosos (Fig. 20) sugerem o possível envolvimento do gene durante o desenvolvimento destes. De fato, recentemente foram detectadas anormalidades psicomotoras, causadas por perda de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo por apoptose em animais *Hipk2*^{-/-} (ZHANG *et al.*, 2007). Sabe-se que TGFβ é um importante fator neurotrófico para a sobrevivência deste grupo de neurônios durante o 13.5 - 14.5dpc (FARKAS *et al.*, 2003), e que a perda deste fator causa alterações neuronais similares às aquelas observadas em mutantes *Hipk2*^{-/-}. Assim, os autores concluíram que *Hipk2* é um co-fator indispensável da via de sinalização mediada por TGFβ em neurônios dopaminérgicos.

Observou-se intensa expressão de *Hipk2* em gânglios nervosos durante a embriogênese do camundongo, especificamente nos gânglios da raiz dorsal (a partir do 12.5dpc), nos gânglios trigeminais e vestibulococleares (embriões de 14,5dpc). Doxakis e colaboradores (2004) documentaram que *Hipk2* possui um pico de expressão em gânglios no estágio que antecede a fase de apoptose normal destes. Além disso, a superexpressão de *Hipk2* em cultura de neurônios sensoriais e simpáticos induz morte celular, indicando um papel importante do gene na via de apoptose nestas células.

Em camundongos, neurônios do córtex cerebral são gerados entre 10.5dpc e 17.5dpc, por um processo proliferativo na zona ventricular do cérebro (MANUEL *et al.*, 2007). Nessa região, foi observada expressão mais pronunciada de *Hipk2*, sugerindo uma participação do gene na regulação destes eventos de proliferação celular. Estes resultados

corroboram a conclusão de Zhang (2007), que dependendo do contexto celular, Hipk2 pode induzir morte celular ou agir como fator de sobrevivência.

A expressão de *Hipk2* em tecidos nervosos ainda sugere sua participação na padronização do sistema nervoso central. Sabendo que as homeoproteínas da família NK são amplamente expressas em tecidos nervosos, e essenciais durante a diferenciação regional específica de áreas do cérebro (VOLLMER & CLERC, 1998), pode-se inferir que em camundongo Hipk2 atue também como co-fator destas homeoproteínas, como já foi relatado em drosófila (KIM *et al.*, 1998; CHOI *et al.*, 1999).

Nesse sentido, Isono e colaboradores (2006) propuseram que as proteínas Hipks podem estar envolvidas na integração dos sinais de *Sonic hedgehog* (Shh) e *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs), morfógenos que participam da determinação de identidades celulares ao longo do eixo dorso-ventral do tubo neural (BRISCOE *et al.*, 2000; revisto por CHIZHIKOV & MILLEN, 2005). Camundongos duplo-*knockouts* *Hipk1/Hipk2* exibiram mudanças no padrão de expressão de genes *Pax*, alvos de Shh e BMP. Outros trabalhos confirmam a associação de Hipks a esses fatores (AKIMARU *et al.*, 1997; DAI *et al.*, 1999; HARADA *et al.*, 2003).

Isono e colaboradores (2006) observaram que o gene é expresso na vesícula óptica e ótica de embriões de 9.5dpc. Neste trabalho também foi observada expressão de *Hipk2* no olho em desenvolvimento, em embriões de 14,5dpc. Em conjunto, estes resultados apontam para uma função de Hipk2 durante a morfogênese do olho em camundongos. De fato, Choi e colaboradores (2005) documentaram a função de DHIPK2 (ortólogo de HIPK2 em drosófila) na morfogênese do olho de drosófila. Neste trabalho, a superexpressão de DHIPK2 levou à formação de olhos ectópicos, e a proteína também foi capaz de fosforilar *eyeless*, uma proteína de fundamental importância na morfogênese do olho (revisto por CHI & EPSTEIN, 2002).

Finalmente, alguns órgãos como rins e coração exibem expressão de *Hipk2* somente nos estágios finais do desenvolvimento, após o 15º dia de gestação. Como *Hipk2* pode interagir com várias proteínas importantes não só na regulação do ciclo celular como em eventos morfogênicos, a presença do transcrito do gene neste tecidos pode indicar desde a manutenção de fenótipos já diferenciados como controle de morte celular programada. Novos estudos ajudarão no reconhecimento de funções de *Hipk2* em outros tecidos além do nervoso.

5.2. Regulação de expressão gênica por HIPK2

Estudos de função gênica em mamíferos fazem uso de diferentes estratégias de silenciamento gênico, incluindo a recombinação homóloga, ribozimas e RNA anti-senso (KHAN *et al.*, 2004; revisto por HUPPI *et al.*, 2005). Mais recentemente, o processo de interferência por RNA (RNAi), inicialmente descrito em *Caenorhabditis elegans* (FIRE *et al.*, 1998), tornou-se uma poderosa ferramenta de silenciamento gênico utilizada para estudo de função gênica *in vitro* (revisto por HANNON, 2002).

Foram testados três shRNAs para o silenciamento de *HIPK2*, dois identificados por programas disponíveis na rede, e um já descrito (DI STEFANO *et al.*, 2004). No entanto, os métodos de predição de siRNAs não são perfeitos, uma vez que cada RNA forma estruturas secundárias e terciárias próprias não completamente previstas por estes métodos, e que podem dificultar seu acesso à maquinaria de silenciamento (revisto por MCMANUS & SHARP, 2002). Assim, cada alvo deve ser testado empiricamente. Além disso, optou-se pela estratégia de expressão dos shRNAs dentro das células por transfecção estável para se

evitar a expressão transiente dos shRNAs, o que impediria experimentos de média duração.

A validação dos alvos nas células 293 mostrou um melhor desempenho da construção pS4, que chegou a inibir em até 90% a expressão de *HIPK2*. Este valor é muito alto se comparado aos 20% obtidos em células RKO (linhagem de câncer de cólon humano), o que foi suficiente para se observar consequências fenotípicas naquelas células (DI STEFANO *et al.*, 2004).

5.2.1. Regulação de expressão de *HIPK1* e *HIPK3* por *HIPK2*

O efeito da inibição de *HIPK2* na expressão de outros genes foi averiguada nas células transfectadas com pS4. Inicialmente foi investigada a possibilidade de haver efeito compensatório da diminuição de *HIPK2* pelos outros genes da família *HIPK*. As três proteínas *HIPKs* são muito conservadas e possuem mais de 90% de homologia no domínio quinase, o que sugere redundância funcional entre elas (CALZADO *et al.*, 2007). De fato, pelo menos duas linhas de evidência indicam redundância funcional entre *Hipk2* e *Hipk1*. Isono e colaboradores (2006) viram que *Hipk1* e *Hipk2* eram co-expressos amplamente em embriões de camundongos (9.5dpc), enquanto que *Hipk3* exibia um padrão de expressão diferente, mais concentrado em tecidos cardíacos. Além disso, camundongos *knockouts* para *Hipk1* ou *Hipk2* são normais (KONDO *et al.*, 2003; WIGGINS *et al.*, 2004), enquanto que os duplo-*knockouts* morrem entre o 9º e o 12º dia de gestação (ISONO *et al.*, 2006).

As células humanas deficientes em *HIPK2* foram testadas quanto à expressão de *HIPK1* e *HIPK3*. A análise por RT-PCR em tempo real mostrou que houve aumento considerável na expressão de *HIPK1* (em média 114%) após silenciamento de *HIPK2*,

sugerindo haver de fato um mecanismo de compensação, que provoca o aumento da transcrição daquele gene nas células com níveis de *HIPK2* diminuídos. Estes resultados indicam que, além da redundância funcional, existe um mecanismo de controle transcricional de *HIPK1* dependente de dosagem de *HIPK2*, possivelmente levando a uma compensação da diminuição desta última. Este efeito poderia ser investigado *in vivo* nos animais *knockout* para *Hipk1* e *Hipk2*.

É importante ressaltar que *HIPK3* também teve seus níveis aumentados (em média 43%) em células com inibição de *HIPK2*. Alguns trabalhos demonstram que *HIPK3* é uma proteína envolvida com indução de apoptose (ROCHAT-STEINER *et al.*, 2000; CURTIN & COTTER, 2004), o que também sugere sobreposição funcional entre *HIPK2* e *HIPK3*. Novos trabalhos poderão confirmar se existe redundância parcial ou total de função entre *HIPK2* e *HIPK3*, e se também existe um mecanismo dose-dependente de regulação dos níveis de genes *HIPKs*.

Famílias de genes que apresentam funções compensatórias são comuns em mamíferos (KONG *et al.*, 2007) como, por exemplo, os oito genes da família de proteínas E2F, importantes reguladoras da transcrição durante o ciclo celular (revisto por DIMOVA & DYSON, 2005). Em camundongos, a deleção de genes *E2F* isolados não é suficiente para impedir a entrada na fase S celular, mas a perda combinada das proteínas bloqueia a mudança de fase (HUMBERT *et al.*, 2000; WU *et al.*, 2001). Além da redundância funcional, Kong e colaboradores (2007) verificaram que existe também uma compensação de níveis de E2F3 em fibroblastos murinos provenientes de camundongos *knockout* para E2F1, e vice-versa, sugerindo um mecanismo dose-dependente de controle da transcrição destes genes, como foi observado neste trabalho com relação aos genes *HIPKs*.

5.2.2. Controle da expressão de genes homeobox por HIPK2.

Entre as diferentes funções já descritas para Hipk2 em modelos animais, seu papel durante a embriogênese e no controle de expressão gênica é de especial interesse. Uma vez que a proteína foi identificada por sua associação com as homeoproteínas da classe NK em modelos animais (KIM *et al.* 1998), suspeita-se que ela possa desempenhar funções semelhantes em células humanas. Assim, foi analisado o efeito do silenciamento de *HIPK2* na expressão daqueles genes *homeobox*.

Não foram observadas alterações significativas nos níveis de transcrição do gene *NKX2.5* nas células deficientes para *HIPK2*. Entretanto, não se pode excluir que *HIPK2* controle a atividade desta proteína por outro mecanismo. Em camundongos, não foi investigado se Hipk2 fosforila Nkx2.5 (KIM *et al.*, 1998), mas viu-se que essas duas proteínas interagem. A fosforilação pode causar mudanças na estabilidade deste fator de transcrição, na capacidade deste se ligar ao DNA, na sua localização subcelular ou na sua capacidade de interagir com outras proteínas. Nesse sentido, seria importante analisar modificações na proteína *NKX2.5*, assim como ampliar a análise de níveis de expressão para genes regulados diretamente por *NKX2.5* nas células interferidas.

NKX3.1 apresentou aumento de expressão (em média 85%) nas células interferidas. A proteína *NKX3.1* é o possível ortólogo de NK3 de drosófila. Como já mencionado, Kim e colaboradores (1998) descreveram a participação de Hipk2 no controle da transcrição mediada por NK3. Os autores verificaram que NK3 realiza repressão do seu próprio promotor (*feedback* negativo) e o aumento de expressão de Hipk2 potencializa o efeito auto-repressor de NK3. O aumento de expressão de *NKX3.1* nas células deficientes para *HIPK2* aqui identificado sugere que *HIPK2* humana regule negativamente a expressão de *NKX3.1*, como em drosófila.

A região 8p21, onde se localiza *NKX3.1* humano, sofre perda de heterozigose em cerca de 85% dos casos de câncer de próstata (VOCKE *et al.*, 1996). No entanto, não foram encontradas mutações na região codificadora de *NKX3.1* em tecidos de câncer de próstata humanos (VOELLER *et al.*, 1997). Contudo, a alta frequência de perda de *NKX3.1* em tumores humanos, a diminuição de expressão com a progressão tumoral e a existência de modelos animais que demonstram haploinsuficiência dominante de *Nkx3.1* indicam que o gene tem papel decisivo no câncer da próstata (revisto por GELMANN, 2003). Evidências que confirmem a regulação de *NKX3.1* por *HIPK2* podem apontar para um envolvimento desta última na carcinogênese da próstata.

Os resultados das hibridações *in situ* revelaram que *Hipk2* é expresso no tubo neural e no olho durante o desenvolvimento. Por este motivo, genes que também são expressos nestes tecidos foram avaliados nas células humanas onde *HIPK2* foi inibido. *Nkx6.1* e *Pax6* são genes *homeobox* expressos no tubo neural em desenvolvimento, onde possuem fundamental importância na determinação de subtipos neuronais (BRISCOE *et al.*, 2000; revisto por CHIZHIKOV & MILLEN, 2005). Neste tecido, eles são transcritos em resposta a um gradiente dorso-ventral de sinalização de Shh (BRISCOE *et al.*, 2000).

Além disso, *Pax6* é o ortólogo de *eyeless* de drosófila em camundongos (QUIRING *et al.*, 1994; revisto por GEHRING & IKEO, 1999; revisto por CHI & EPSTEIN, 2002). Mutação no gene *Pax6* em homozigose provoca ausência de olhos e de cavidades nasais, e morte neonatal (HOGAN *et al.*, 1986; revisto por GEHRING & IKEO, 1999). Em humanos, mutações em heterozigose em *PAX6* causam aniridia, uma malformação congênita caracterizada por perda quase total da íris (TON *et al.*, 1991; HANSON & VAN HEYNINGEN, 1995).

A expressão de *Hipk2*, uma proteína que interage com homeoproteínas, no olho em desenvolvimento sugere que esta pode interagir com *Pax6*. Esta hipótese foi testada em

células humanas, onde foi verificada se a expressão de *PAX6* humano é alterada nas células deficientes em *HIPK2*. Tanto *PAX6* quanto *NKX6.1* apresentaram aumento no nível dos seus transcritos (em média 29% e 44%, respectivamente) nas células humanas onde ocorreu inativação de *HIPK2*. Este resultado indica que *HIPK2* regula negativamente a expressão destes genes.

De fato, recentemente Kim e colaboradores (2006) observaram que *Hipk2* interage e é capaz de fosforilar *Pax6* murina, confirmando a hipótese levantada pelos resultados das hibridações *in situ*. Como já relatado, *DHIPK2* fosforila *eyeless* em *drosófila*. Assim, a associação de *DHIPK2/eyeless* e *Hipk2/Pax6* indica que esta regulação é conservada entre *drosófila* e mamíferos. Os resultados deste trabalho mostram que *HIPK2* modula a atividade de *PAX6* também no nível da transcrição.

O efeito da fosforilação de *Pax6* por *Hipk2* foi avaliado por Kim e colaboradores (2006) utilizando a região promotora do gene de proglucagon, responsiva a *Pax6*. Assim, os autores propuseram que outras homeoproteínas envolvidas na homeostase de glicose também poderiam ser alvo de *Hipk2*. *Nkx6.1* além de ser expresso em células nervosas, é expresso no pâncreas em desenvolvimento, e sua inativação em camundongos resulta em perda quase total de células-beta, produtoras de insulina (SANDER *et al.*, 2000). Como *PAX6*, nas células humanas deficientes em *HIPK2*, *NKX6.1* também teve aumento de expressão. O aumento de expressão de dois genes envolvidos na homeostase de glicose em consequência do silenciamento de *HIPK2* corroboram a hipótese de que este último pode estar envolvido nesta via.

É importante ressaltar que não foram avaliados os estados fosforilados das homeoproteínas aqui testadas. Para uma melhor compreensão do efeito molecular do silenciamento de *HIPK2*, ensaios de *Western-blot* com anticorpos que reconhecem as formas fosforiladas das proteínas deveriam ser realizados. Além disso, análises mais

amplas de expressão gênica (*array* de expressão) e proteômica nas células deficientes em *HIPK2* poderão identificar outras vias de atuação deste gene.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho apresenta uma análise do padrão de expressão temporal e espacial de *Hipk2* durante o desenvolvimento embrionário a partir do início da organogênese, de 9.5dpc até 17.5dpc. Esta análise revelou um possível papel de *Hipk2* no início da organogênese, fase na qual o gene é expresso em todos os tecidos do embrião. Além disso, a concentração dos transcritos de *Hipk2* em tecidos neurais a partir do 11.5dpc até estágios mais tardios do desenvolvimento sugerem a participação da proteína na morfogênese destes tecidos. De fato, recentemente foram identificados fenótipos neurais em camundongos *knockout* para *Hipk2* (ZHANG *et al.*, 2007). A determinação do padrão de expressão de *Hipk2* poderá orientar novas investigações sobre sua função nos diferentes órgãos durante o desenvolvimento embrionário.

A segunda parte deste trabalho teve por objetivo estabelecer um modelo experimental de análise de função de HIPK2 em células humanas. Utilizando a técnica de interferência por RNA (RNAi), pôde-se inativar *HIPK2* humano, e avaliar os efeitos desta inibição sobre a expressão de outros genes.

O aumento de expressão de genes *HIPKs* nas células interferidas sugere que, além de existir redundância funcional entre as proteínas *HIPKs*, como propõem alguns trabalhos (ISONO *et al.*, 2006; CALZADO *et al.*, 2007), deve haver um mecanismo compensatório dose-dependente de controle de expressão de genes *HIPKs*. Isto por sua vez abre novas perspectivas de estudo de regulação desta família gênica.

Além disso, o aumento de expressão dos genes *NKX3.1*, *NKX6.1* e *PAX6* nas células interferidas indica que *HIPK2* pode agir como repressor transcricional de genes *homeobox* em humanos. No entanto, como *HIPK2* não é um fator de transcrição, é mais provável que sua atuação seja indireta, o que deverá ser avaliado por estudos de proteínas. Finalmente, as células deficientes para *HIPK2* servem como um sistema experimental *in*

vitro onde poderão ser identificadas as diferentes vias de atuação desta proteína em humanos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIMARU H, CHEN Y, DAI P, HOU DX, NONAKA M, SMOLIK SM, ARMSTRONG S, GOODMAN RH, ISHII S. Drosophila CBP is a co-activator of cubitus interruptus in hedgehog signalling. *Nature*, 1997; 386: 735-8.

AZPIAZU N, FRASCH M. tinman and bagpipe: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of Drosophila. *Genes Dev.*, 1993; 7(7B): 1325-40.

BATESON W. *Materials for the study of variation*. New York, Macmillan, 1894.

BENSON DW, SILBERBACH GM, KAVANAUGH-MCHUGH A. Mutations in de cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J. Clin. Invest.*, 1999; 104: 1567-73.

BILLETER M. Homeodomain-type DNA recognition. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1996; 66(3): 211-25.

BRENNAN RG, MATTHEWS BW. The helix-turn-helix DNA binding motif. *J. Biol. Chem.*, 1989; 264(4): 1903-6.

BRISCOE J, PIERANI A, JESSEL TM, ERICSON J. A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell*, 2000;101(4): 435-45.

BRUMMELKAMP TR, BERNARDS R, AGAMI R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 2002; 296:550-3.

CALZADO MA, RENNER F, ROSCIC A, SCHMITZ ML. HIPK2: a versatile switchboard regulating the transcription machinery and cell death. *Cell Cycle.*, 2007; 6(2):139-43.

CAMARGO AA *et al.* The contribution of 700,000 ORF sequence tags to the definition of the human transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2001; 98(21):12103-8.

CHI N, EPSTEIN JA. Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet.*, 2002; 18(1): 41-7.

CHIZHIKOV VV, MILLEN KJ. Roof plate-dependent patterning of the vertebrate dorsal central nervous system. *Dev. Biol.*, 2005; 277(2): 287-95.

CHOI CY, KIM YH, KWON HJ, KIM Y. The homeodomain protein NK-3 recruits Groucho and a histone deacetylase complex to repress transcription. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274(47): 33194-7.

CHOI CY, KIM YH, KIM YO, PARK SJ, KIM EA, RIEMENSCHNEIDER W, GAJEWSKI K, SCHULZ RA, KIM Y. Phosphorylation by the DHIPK2 protein kinase modulates the corepressor activity of Groucho. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280(22): 21427-36.

CURTIN JF, COTTER TG. JNK regulates HIPK3 expression and promotes resistance to Fas-mediated apoptosis in DU 145 prostate carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279(17): 17090-100.

D'ORAZI G, CECCHINELLI B, BRUNO T, MANNI I, HIGASHIMOTO Y, SAITO S, GOSTISSA M, COEN S, MARCHETTI A, DEL SAL G, PIAGGIO G, FANCIULLI M, APPELLA E, SODDU S. Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat. Cell. Biol.*, 2002; 4(1):11-9.

DAI P, AKIMARU H, TANAKA Y, MAEKAWA T, NAKAFUKU M, ISHII S. Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 8143-52.

DAUTH I, KRUGER J, HOFMAN TG. Homeodomain-interacting protein kinase 2 is the ionizing radiation-activated p53 serine 46 kinase and is regulated by ATM. *Cancer Res.*, 2007; 67(5): 2274-9.

DIAS NETO E *et al.* Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000; 97(7): 3491-6.

DIMOVA DK, DYSON NJ. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene*. 2005; 24(17): 2810-26.

DI STEFANO V, RINALDO C, SACCHI A, SODDU S, D'ORAZI G. Homeodomain-interacting protein kinase-2 activity and p53 phosphorylation are critical events for cisplatin -mediated apoptosis. *Exp. Cell. Res.*, 2004; 293: 311-320.

DOXAKIS E, HUANG EJ, DAVIES AM. Homeodomain-interacting protein kinase-2 regulates apoptosis in developing sensory and sympathetic neurons. *Curr. Biol.*, 2004; 14: 1761-5.

DUBOULE D. The vertebrate limb: a model system to study the Hox/HOM gene network during development and evolution. *Bioessays*, 1992; 14(6): 375-84.

FARKAS LM, DUNKER N, ROUSSA E, UNSICKER K, KRIEGLSTEIN K. Transforming growth factor-beta(s) are essential for the development of midbrain dopaminergic neurons in vitro and in vivo. *J. Neurosci.*, 2003; 23: 5178–86.

FAVIER B, DOLLÉ P. Developmental functions of mammalian Hox genes. *Mol. Hum. Reprod.*, 1997; 3: 115-131.

FIRE A, XU SQ, MONTGOMERY MK, KOSTAS SA, DRIVER SE, MELLO CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998; 391: 806-10.

GEHRING WJ. Homeo boxes in the study of development. *Science*, 1987; 236 (4806): 1245-52.

GEHRING WJ, IKEO K. *Pax 6*: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet.*, 1999; 15(9): 371-7.

GELMANN EP. Searching for the gatekeeper oncogene of prostate cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2003;46 Suppl: S11-20.

HANNON GJ. RNA interference. *Nature*, 2002; 418(6894): 244-51.

HANSON I, VAN HEYNINGEN V. Pax6: more than meets the eye. *Trends Genet.*, 1995; 11(7): 268-72.

HARADA J, KOKURA K, KANEI-ISHII C, NOMURA T, M. KHAN MM, KIM Y, ISHII S. Requirement of the co-repressor homeodomain-interacting protein kinase 2 for ski-mediated inhibition of bone morphogenetic protein-induced transcriptional activation. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 38998-9005.

HARVEY RP. NK-2 homeobox genes and heart development. *Dev. Biol.*, 1996; 178(2): 203-16.

HOCHGREB T, LINHARES VL, MENEZES DC, SAMPAIO AC, YAN CY, CARDOSO WV, ROSENTHAL N, XAVIER-NETO J. A caudorostral wave of RALDH2 conveys anteroposterior information to the cardiac field. *Development*, 2003; 130(22): 5363-74.

HOFMANN TG, MINCHEVA A, LICHTER P, DROGE W, SCHMITZ ML. Human homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) is a member of the DYRK family of protein kinases and maps to chromosome 7q32-q34. *Biochimie.*, 2000; 82(12):1123-7.

HOGAN BLM, HORSBURGH G, COHEN J, HETHERINGTON CM, FISHER G, LYON MF. *Small eyes (Sey)*: a homozygous lethal mutation on chromosome 2 which affects the differentiation of both lens and nasal placodes in the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 1986; 97: 95–110.

HUMBERT PO, VERONA R, TRIMARCHU JM, ROGERS C, DANDAPANI S, LEES JA. E2f3 is critical for normal cellular proliferation. *Genes Dev.*, 2000;14(6):690-703.

HUPPI K, MARTIN SE, CAPLEN NJ. Defining and assaying RNAi in mammalian cells. *Mol. Cell*, 2005; 17(1): 1-10.

ISONO K, NEMOTO K, LI Y, YAKADA Y, SUZUKI R, KATSUMI M, NAKAGAWARA A, KOSEKI H. Overlapping roles for homeodomain-interacting protein kinases hipk1 and hipk2 in the mediation of cell growth in response to morphogenetic and genotoxic signals. *Mol. Cell. Biol.*, 2006; 26(7): 2758-71.

KAPPEN C, SCHUGHART K, RUDDLE FH. Early evolutionary origin of major homeodomain sequence classes. *Genomics*, 1993; 18: 54-70.

KARIN M, HUNTER T. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.*, 1995; 5(7): 747-57.

KAUFMAN MH. *Atlas of mouse development*. First Edition, San Diego, USA: Academic Press; 1992.

KAUFMAN TC, LEWIS R, WAKIMOTO B. Cytogenetic Analysis of Chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*: The Homoeotic Gene Complex in Polytene Chromosome Interval 84a-B. *Genetics*, 1980; 94(1): 115-33.

KHAN A, BENBOUBETRA M, SAYYED PZ, NG KW, FOX S, BECK G, BENTER IF, AKHTAR S. Sustained polymeric delivery of gene silencing antisense ODNs, siRNA, DNazymes and ribozymes: in vitro and in vivo studies. *J. Drug Target*, 2004; 12(6): 393-404.

KIM EA, NOH YT, RYU MJ, KIM HT, LEE SE, KIM CH, LEE C, KIM YH, CHOI CY. Phosphorylation and transactivation of Pax6 by homeodomain-interacting protein kinase 2. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281(11): 7489-97.

KIM Y, NIRENBERG M. *Drosophila* NK-homeobox genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1989; 86(20): 7716-20.

KIM YH, CHOI CY, LEE SJ, CONTI MA, KIM Y. Homeodomain-interacting protein kinases, a novel family of co-repressors for homeodomain transcription factors. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 25875-9.

DE KOK JB, ROELOFS RW, GIESENDORF BA, PENNING J, WAAS ET, FEUTH T, SWINKELS DW, SPAN PN. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab. Invest.*, 2005; 85(1):154-9.

KOMURO I, IZUMO S. *Csx*: A murine homiobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993; 90: 8145-9.

KONDO S, LU Y, DEBBAS M, LIN AW, SAROSI I, ITIE A, WAKEHAM A, TUAN J, SARIS C, ELLIOTT G, MA W, BENCHIMOL S, LOWE SW, MAK TW, THUKRAL SK. Characterization of cells and gene-targeted mice deficient for the p53-binding kinase homeodomain-interacting protein kinase 1 (HIPK1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2003; 100(9): 5431-6.

KONG L-J, CHANG JT, BILD AH, NEVINS JR. Compensation and specificity of function within the E2F family. *Oncogene*, 2007; 26: 321–327.

LANDER ES *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001; 409: 860-921.

LEWIS EB. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, 1978; 276(5688): 565-70.

LI X, WANG Y, DEBATIN KN, HUG H. The serine/threonine kinase HIPK2 interacts with TRADD, but not with CD95 or TNF-R1 in 293T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000; 277(2):513-7.

LINTS TJ, PARSONS LM, HARTLEY L, LYONS I, HARVEY RP. *Nkx-2.5*: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development*, 1993; 119: 419-431.

LYONS I, PARSONS LM, HARTLEY L, R. LI R, ANDREWS JE, ROBB L, HARVEY RP. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes & Devel.*, 1995; 9: 1654-66.

MANUEL M, GEORGALA PA, CARR CB, CHANAS S, KLEINJAN DA, MARTYNOGA B, MASON JO, MOLINEK M, PINSONJ, PRATT T, QUINN JC, SIMPSON TI, TYAS DA, VAN HEYNINGEN V, WEST JD, PRICE DJ. Controlled overexpression of Pax6 in vivo negatively autoregulates the Pax6 locus, causing cell-autonomous defects of late cortical progenitor proliferation with little effect on cortical arealization. *Development*, 2007;134(3): 545-55.

MCGINNIS W, KRUMLAUF R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell*, 1992; 68(2): 283-302.

MCGINNIS W, LEVINE MS, HAFEN E, KUROIWA A, GEHRING WJ. A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the Drosophila Antennapedia and bithorax complexes. *Nature*, 1984; 308: 428-33.

MCMANUS MT, SHARP, PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.*, 2002; 3(10): 737-47.

NAITO Y, YAMADA T, UI-TEI K, MORISHITA S, SAIGO K. siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference. *Nucleic Acids Res.*, 2004; 32 (web Server issue):W124-9.

ODA K, ARAKAWA H, TANAKA T, MATSUDA K, TANIKAWA C, MORI T, NISHIMORI H, TAMAI K, TOKINO T, NAKAMURA Y, TAYA Y. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*, 2000; 102(6): 849-62.

OKAMURA S, ARAKAWA H, TANAKA T, NAKANISHI H, NG CC, TAYA Y, MONDEN M, NAKAMURA Y. p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis. *Mol. Cell*, 2001; 8(1): 85-94.

PATTERSON KD, CLEAVER O, GERBER WV, GROW MW, NEWMAN CS, KRIEG PA. Homeobox genes in cardiovascular development. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 1998; 40:1-44.

PIERANTONI GM, BULFONE A, PENTIMALLI F, FEDELE M, IULIANO R, SANTORO M, CHIARIOTTI L, BALLABIO A, FUSCO A. The homeodomain-interactin protein kinase 2 gene is expressed late in the embryogenesis and preferentially in retina, muscle, and neural tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 290 (3): 942-7.

QIAN YQ, BILLETER M, OTTING G, MÜLLER M, GEHRING WJ, WÜTHRICH K. The structure of the Antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors. *Cell*, 1989; 59(3): 573-80.

QUIRING R, WALLDORF U, KLOTTER U, GEHRING WJ. Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans. *Science*, 1994; 265(5173): 785-9.

ROCHAT-STEINER V, BECKER K, MICHEAU O, SCHNEIDER P, BURNS K, TSCHOPP J. FIST/HIPK3: a Fas/FADD-interacting serine/threonine kinase that induces FADD phosphorylation and inhibits fas-mediated Jun NH(2)-terminal kinase activation. *J. Exp. Med.* 2000; 192(8): 1165-74.

ROGERS S, WELLS R, RECHSTEINER M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, 1986; 234:364-8.

SANDER M, SUSSEL L, CONNERS J, SCHEEL D, KALAMARAS J, DELA CRUZ F, SCHWITZGEBEL V, HAYES-JORDAN A, GERMAN M. Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development*, 2000; 127(24): 5533-40.

SCHOTT JJ, BENSON DW, BASSON CT, PEASE W, SILBERBACH GM, MOAK JP, MARON BJ, SEIDMAN CE, SEIDMAN JG. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science*, 1998; 281(5373):108-11.

SCOTT MP, WEINER AJ. Structural relationships among genes that control development: Sequence homology between *Anthennapedia*, *Ultrabithorax*, and *fushi tarazu* loci of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1984; 81: 4115-19.

STANFEL MN, MOSES KA, SCHWARTZ RJ, ZIMMER WE. Regulation of organ development by the NKX-homeodomain factors: an NKX code. *Cell. Mol. Biol.*, 2005; 51: 785-99.

STUKART GC. *Caracterização de HIPK2, um novo gene humano* [dissertação]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2001.

TON CC *et al.* Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell*, 1991; 67(6): 1059-74.

VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, POPPE B, VAN ROY N, DE PAEPE A, SPELEMAN F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 2002; 3(7): research 0034.

VENTER JC *et al.* The sequence of the human genome. *Science*, 2001; 291: 1304-51.

VOCKE CD, POZZATTI RO, BOSTWICK DG, FLORENCE CD, JENNINGS SB, STRUP SE, DURAY PH, LIOTTA LA, EMMERT-BUCK MR, LINEHAN WM. Analysis of 99 microdissected prostate carcinomas reveals a high frequency of allelic loss on chromosome 8p21-22. *Cancer Res.*, 1996; 56: 2411-6.

VOELLER HJ, AUGUSTUS M, MADLIKE V, BOVA GS, CARTE KC, GELMANN EP. Coding region of NKX3.1, prostate-specific homeobox gene on 8p21, is not mutated in human prostate cancers. *Cancer Res.*, 1997; 57: 4455-9.

VOLLMER J, CLERC RG. Homeobox genes in the developing mouse brain. *J. Neurochem.*, 1998; 71:1-19.

WALTHER C, GRUSS P. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development*, 1991; 113(4): 1435-49.

WANG Y, DEBATIN K-M, HUG H. HIPK2 overexpression leads to stabilization of p53 protein and increased p53 transcriptional activity by decreasing Mdm2 protein levels. *BMC. Mol. Biol.*, 2001; 2:8.

WANG Y, SCHNEIDER EM, LI X, DUTTENHÖFER I, DEBATIN KM, HUG H. HIPK2 associates with RanBPM. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2002; 297:148-53.

WIGGINS AK, WEI G, DOXAKIS E, WONG C, TANG AA, ZANG K, LUO EJ, NEVE RL, REICHARDT LF, HUANG EJ. Interaction of Brn3a and HIPK2 mediates transcriptional repression of sensory neuron survival. *J. Cell. Biol.*, 2004; 167(2): 257-67.

WU L, TIMMERS C, MAITI B, SAAVEDRA HI, SANG L, CHONG GT, GIANGRANDE P, WRIGHT FA, FIELD SJ, GREENBERG ME, ORKIN S, NEVINS JR, ROBINSON ML, LEONE G. The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature*, 2001; 414(6862): 457-62.

ZAFFRAN S, FRASCH M. The beta3 tubulin gene is a direct target of bagpipe and biniou in the visceral mesoderm of drosophila. *Mech. Dev.*, 2002; 114: 85-93.

ZHANG J, PHO V, BONASERA SJ, HOLTZMAN J, TANG AT, HELLMUTH J, TANG S, JANAK PH, TECOTT LH, HUANG EJ. Essential function of HIPK2 in TGFbeta-dependent survival of midbrain dopamine neurons. *Nat. Neurosci.*, 2007; 10(1): 77-86.

ZHANG X, DING L, SANDFORD AJ. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC Mol. Biol.*, 2005; 6(1): 4.