

**Daniel Diniz de Carvalho**

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *SH3BGRL2*, *D53*,  
*PRAME*, *DAP12* E *CALCINEURINA A BETA* POR BCR-  
ABL E CONSEQÜÊNCIAS BIOLÓGICAS DESSA  
REGULAÇÃO NA LMC**

**Tese apresentada ao Instituto de  
Ciências Biomédicas da Universidade de  
São Paulo, para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências (Imunologia).**

**São Paulo  
2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Daniel Diniz de Carvalho**

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *SH3BGRL2*,  
*D53*, *PRAME*, *DAP12* E *CALCINEURINA A BETA*  
POR BCR-ABL E CONSEQÜÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DESSA REGULAÇÃO NA LMC**

**Tese apresentada ao Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São  
Paulo, para obtenção do Título de Doutor  
em Ciências (Imunologia).**

**Orientador: Prof. Dr. João Gustavo P.  
Amarante-Mendes**

**Área de concentração: Imunologia**

**São Paulo  
2009**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Daniel Diniz Carvalho.

Título da Tese: Regulação da expressão de SH3BGRL2, D53, PRAME  
DAP12 e calcineurina A beta por BCR-ABL e  
consequências biológicas dessa regulação na LMC .

Orientador(a): João Gustavo Pessini Amarante Mendes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão  
pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**       **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

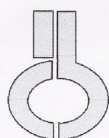
Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

# Parecer da Comissão de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091.77330 - telefax : (55) (11) 3091-7438  
e-mail: cep@icb.usp.br

**PARECER 725 /CEP**

São Paulo, 21 de junho de 2006.

Prezado Senhor,

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB em sua 66ª reunião realizada em 19.06.06, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "Regulação da expressão de SH3BGRL2, D53, PRAME, DAP12 e calcineurina A beta por Bcr-Abl e consequências biológicas dessa regulação na LMC".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**, a qual sugere que no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido evitasse em colocar a descrição explícita da doença, que poderá acarretar trauma psico ao paciente e dados científicos e epidemiológico que poderá aumentar o sofrimento.

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO  
Coordenador da Comissão de Ética em  
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilmo. Sr.  
DANIEL DINIZ DE CARVALHO  
Departamento de Imunologia  
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas / USP  
Aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, em 10 de fevereiro de 1998.

**Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Imunologia ICB/USP com apoio financeiro da FAPESP.**

***Aos meus pais, Wildes e Isabel, e  
à minha esposa, Andrea, que me  
incentivaram e tornaram possível  
sua realização.***

## AGRADECIMENTOS

*À Deus, antes de tudo.*

*Ao meu orientador, Doutor Gustavo Amarante-Mendes, que foi essencial para que este trabalho fosse realizado, e também acrescentou muito para o meu amadurecimento profissional. Obrigado pelos ensinamentos, liberdade, orientação e por me permitir fazer parte de um grupo de tão alto nível.*

*Aos meus pais pelo amor, educação, princípios e valores que me fizeram quem sou hoje. Tenho com vocês, um belo exemplo de união e o verdadeiro significado da palavra família. Obrigado por acreditarem em meus sonhos e ajudarem a torná-los realidade.*

*À Andrea, agradeço por seu apoio, amor, carinho e paciência, que tem sido fundamental na minha vida. Obrigado por me apoiar nos momentos mais difíceis e vibrar comigo nas minhas conquistas.*

*À minha segunda família, Álvaro e Rosana, por me terem aberto as portas de sua família e me recebido com tanto amor.*

*Aos meus irmãos, Fernando e Davi e aos meus irmãos por escolha, Thiago, Rafael e Camila, pelo carinho e amizade.*

*Aos meus avós e familiares por sempre estarem torcendo por mim.*

*Aos meus colegas e amigos do laboratório: Ana Elisa, Moki, Jackie, Ricardo, Welbert, Maria Emilia, Maira, Júlia, Lu, Bruna, Márcia, Janine e Clau, pelo carinho, amizade, por todas às vezes que precisei de auxílio, por todas as alegrias e momentos de descontração nestes anos.*

*À minha grande amiga e madrinha, Dra. Jacqueline, que sempre esteve do meu lado no laboratório e sempre acreditou em mim, obrigado por tudo.*



*À Dra. Fabíola por todo o incentivo, discussões científicas e ajuda no decorrer da elaboração desta tese, informalmente minha co-orientadora.*

*A minha amiga de longa data Carolita, que tem me acompanhado nesta jornada desde a graduação.*

*Aos meus antigos orientadores, Dra. Silvia e Dra. Anamélia, por me ensinarem meus primeiros passos na carreira científica*

*Ao Dr. Peter Jones por me receber em seu laboratório, onde eu tive à minha disposição todos os recursos materiais e intelectuais, permitindo um grande amadurecimento científico.*

*Aos meus colegas da USC, Terry, Phillippa, Erika, Shikar, Tina, Xangning, Flora, Xiaojing, Gangning, Yvonne, Jeff, Jueng Soo, Sheng-Fang e Fernanda.*

*Aos professores Dr. Alexandre Barbuto, Dra. Anamaria Camargo e Dra. Miriam Jasiulionis pelas idéias sugeridas na banca de qualificação que me ajudaram na confecção final da tese.*

*Aos meus amigos de pós-graduação pela agradável convivência durante estes anos e momentos inesquecíveis de descontração, em especial à turma do cursão Tati, Nati, Pati, Juciane, Josias, Carol, Layra, Débora, Paulo Vitor, Otávio e Andrea.*

*Ao Professor Niels pelas excelentes discussões, dentro e fora de classe.*

*À Dra. Anamaria, um grande exemplo de realizações científicas e aos seus alunos Anna Chris e Érico, que eu tive o prazer em dividir a bancada.*

*A todas as pessoas que contribuíram de alguma maneira na realização deste trabalho.*

## RESUMO

CARVALHO, D. D. **Regulação da expressão de *SH3BGRL2*, *D53*, *PRAME*, *DAP12* e *CALCINEURINA A BETA* por BCR-ABL e conseqüências biológicas dessa regulação na LMC.** 139 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Sabe-se que TRAIL, um membro da família do TNF- $\alpha$  e ligante dos receptores de morte, é capaz de matar células tumorais de forma seletiva. Sabe-se também que TRAIL tem sua expressão reduzida em diversos tumores, incluindo-se leucemias positivas para o BCR-ABL. Apesar da literatura estar repleta de informações acerca dos mecanismos moleculares da morte celular mediada por TRAIL, pouco se sabe sobre os mecanismos responsáveis pela inibição de TRAIL em tumores. Tendo em vista que a expressão de TRAIL pode ser regulada pelo Ácido Retinóico; que PRAME é capaz de inibir a via do ácido retinóico através da proteína EZH2, um membro da família dos polycombs; e que nós observamos anteriormente que a expressão de TRAIL esta inversamente correlacionada com a expressão de BCR-ABL em pacientes com LMC, nós decidimos investigar a associação entre PRAME, EZH2 e TRAIL em leucemia positiva para o BCR-ABL. Nós demonstramos que PRAME, mas não EZH2, tem sua expressão aumentada em células que apresentam o BCR-ABL e sua expressão está associada com a progressão da LMC. Além disto, existe uma correlação positiva entre PRAME e BCR-ABL e uma correlação negativa entre PRAME e TRAIL nestes pacientes. Após inibir a expressão de PRAME ou EZH2 por shRNA em células positivas para o BCR-ABL, foi possível observar um aumento da expressão de TRAIL. Estes dados revelam um novo mecanismo de regulação responsável por diminuir a expressão de TRAIL, e geram novos possíveis alvos para a terapia da LMC e, possivelmente, também para outros tumores.

**Palavras-chave:** BCR-ABL; PRAME; Leucemia Mielóide Crônica; Câncer.

## ABSTRACT

CARVALHO, D. D. **BCR-ABL-mediated regulation of *SH3BGRL2*, *D53*, *PRAME*, *DAP12* e *Calcineurin A beta* and biological consequences of this regulation on CML.** 139 p. PhD thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TRAIL, a member of the TNF- $\alpha$  family and a death receptor ligand, was shown to selectively kill tumor cells. Not surprisingly, TRAIL is down-regulated in a variety of tumor cells, including BCR-ABL-positive leukemia. Although the literature is filled with information about the molecular basis of TRAIL-mediated cell killing, the mechanism responsible for TRAIL inhibition in tumors remains elusive. Because *TRAIL* can be regulated by retinoic acid; *PRAME* was shown to inhibit transcription of retinoic acid receptor target genes through the polycomb protein *EZH2*; and we have found that *TRAIL* is inversely correlated with *BCR-ABL* in CML patients, we decided to investigate the association of *PRAME*, *EZH2* and *TRAIL* in BCR-ABL-positive leukemia. Here, we demonstrate that *PRAME*, but not *EZH2*, is up-regulated in BCR-ABL cells and is associated with the progression of disease in CML patients. In addition, there is a positive correlation between *PRAME* and *BCR-ABL* and an inverse correlation between *PRAME* and *TRAIL* in these patients. Importantly, knocking down of *PRAME* or *EZH2* by RNA interference in a BCR-ABL-positive cell line restores *TRAIL* expression. Our data reveal a novel regulatory mechanism responsible for lowering *TRAIL* expression and provide the basis of alternative targets for combined therapeutic strategies for CML.

**Key words:** BCR-ABL; *PRAME*; Chronic Myeloid Leukemia; Cancer.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b> Vias de sinalização ativadas pela ligação de TRAIL com seus receptores.....	25
<b>Figura 2-</b> Número de genes que são modulados pela expressão de BCR-ABL nas células HL-60, HeLa e SKW.6.4.....	28
<b>Figura 3-</b> Inibição da via do ácido retinóico mediada por PRAME.....	33
<b>Figura 4-</b> Expressão relativa de CALCINEURINA A BETA em HL60 e HL60.BA obtida por Real Time PCR.....	50
<b>Figura 5-</b> Expressão relativa de DAP12 em HL60 e HL60.BA obtida por Real Time PCR.....	51
<b>Figura 6-</b> Expressão relativa de D53 em HL60 e HL60.BA obtida por Real Time PCR.....	51
<b>Figura 7-</b> Expressão relativa de SH3BGRL2 em HL60 e HL60.BA obtida por Real Time PCR.....	52
<b>Figura 8-</b> Expressão relativa de PRAME em HL60 e HL60.BA obtida por Real Time PCR.....	52
<b>Figura 9-</b> Expressão relativa de CALCINEURINA A BETA em linhagens celulares transfectadas com o BCR-ABL ou vetor vazio.....	53
<b>Figura 10-</b> Expressão relativa de DAP12 em linhagens celulares transfectadas com o BCR-ABL ou vetor vazio.....	54
<b>Figura 11-</b> Expressão relativa de D53 em linhagens celulares transfectadas com o BCR-ABL ou vetor vazio.....	54
<b>Figura 12-</b> Expressão relativa de SH3BGRL2 em linhagens celulares transfectadas com o BCR-ABL ou vetor vazio.....	55
<b>Figura 13-</b> Expressão relativa de PRAME em linhagens celulares transfectadas com o BCR-ABL ou vetor vazio.....	55
<b>Figura 14-</b> Expressão relativa de PRAME em linhagens celulares BCR-ABL <sup>+</sup> e BCR-ABL <sup>-</sup> .....	56
<b>Figura 15-</b> Western-blot de Células tratadas com STI571, marcados para c-ABL, Actina e Fosfotirosina.....	57

<b>Figura 16-</b> Expressão relativa de PRAME em linhagens celulares tratadas ou não com STI571.....	58
<b>Figura 17-</b> Expressão relativa de CALCINEURINA A BETA em indivíduos saudáveis, pacientes com LMC e em remissão.....	59
<b>Figura 18-</b> Expressão relativa de CALCINEURINA A BETA nas diferentes fases da LMC.....	60
<b>Figura 19-</b> Expressão relativa de DAP12 em indivíduos saudáveis, pacientes com LMC e em remissão.....	60
<b>Figura 20-</b> Expressão relativa de DAP12 nas diferentes fases da LMC.....	61
<b>Figura 21-</b> Expressão relativa de D53 em indivíduos saudáveis, pacientes com LMC e em remissão.....	62
<b>Figura 22-</b> Expressão relativa de D53 nas diferentes fases da LMC.....	62
<b>Figura 23-</b> Expressão relativa de SH3BGRL2 em indivíduos saudáveis, pacientes com LMC e em remissão.....	63
<b>Figura 24-</b> Expressão relativa de SH3BGRL2 nas diferentes fases da LMC....	64
<b>Figura 25-</b> Expressão relativa de PRAME em indivíduos saudáveis, pacientes com LMC e em remissão.....	65
<b>Figura 26-</b> Expressão relativa de PRAME nas diferentes fases da LMC.....	65
<b>Figura 27-</b> Correlação entre a expressão de PRAME e de BCR-ABL em indivíduos saudáveis, pacientes com LMC e em remissão.....	66
<b>Figura 28-</b> Células com alta expressão de PRAME apresentam baixa expressão de TRAIL.....	67
<b>Figura 29-</b> Correlação entre a expressão de PRAME e de TRAIL em indivíduos saudáveis, pacientes com LMC e em remissão.....	68
<b>Figura 30-</b> Promotor de TRAIL.....	69
<b>Figura 31-</b> Inibição da expressão de PRAME por shRNA.....	70
<b>Figura 32-</b> Restauração da expressão de TRAIL após Inibição da expressão de PRAME.....	70
<b>Figura 33-</b> Inibição da expressão de EZH2 por shRNA.....	71
<b>Figura 34-</b> Restauração da expressão de TRAIL após Inibição da expressão de EZH2.....	72
<b>Figura 35-</b> Expressão relativa de EZH2 em linhagens celulares BCR-ABL <sup>+</sup> e BCR-ABL <sup>-</sup> .....	73

<b>Figura 36-</b> Expressão relativa de EZH2 nas diferentes fases da LMC.....	74
<b>Figura 37-</b> Correlação entre a expressão de EZH2 e de TRAIL em indivíduos saudáveis, pacientes com LMC e em remissão.....	75
<b>Figura 38-</b> Os silenciamentos de PRAME ou de EZH2 não interferem na fosforilação de FOXO3a.....	76
<b>Figura 39-</b> Os silenciamentos de PRAME ou de EZH2 interferem na proliferação celular.....	77
<b>Figura 40-</b> Os silenciamentos de PRAME ou de EZH2 interferem na resistência à apoptose induzida por STI571 após 48 horas.....	78
<b>Figura 41-</b> Porcentagem de apoptose e de viabilidade celular 48 horas apos tratamento com STI571.....	79
<b>Figura 42-</b> Os silenciamentos de PRAME ou de EZH2 interferem na resistência à apoptose induzida por STI571 após 72 horas.....	79
<b>Figura 43-</b> Porcentagem de apoptose e de viabilidade celular 72 horas apos tratamento com STI571.....	80
<b>Figura 44-</b> Expressão relativa das enzimas UTX e JMJD3 nas diferentes fases da LMC.....	81
<b>Figura 45-</b> Meta-Análises da expressão de TRAIL, PRAME, EZH2, JMJD3 e UTX nas diferentes fases da LMC.....	82
<b>Figura 46-</b> Meta-Análises da expressão de TRAIL e PRAME em amostras de Adenocarcinoma de Pulmão.....	83
<b>Figura 47-</b> Meta-Análises da expressão de TRAIL e PRAME em amostras de Melanoma.....	84
<b>Figura 48-</b> Meta-Análises da expressão de TRAIL e PRAME em amostras de Carcinoma de Mama.....	85

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Identificação dos genes escolhidos.....	50
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ABL** - *Abelson leukemia virus*  
**ARF** - *alternate reading frame*  
**ATP** - *Adenosine triphosphate*  
**BAD** - *BCL2-antagonist of cell death*  
**Bcl-xL** - *B-cell lymphoma-extra large*  
**BCR** – *breakpoint cluster region*  
**BID** - *BH3 interacting domain death agonist*  
**BIM** - *Bcl-2-interacting mediator of cell death*  
**BMI1**- *B lymphoma Mo-MLV insertion region 1*  
**BSA** - *Bovine Serum Albumin*  
**cDNA** – *DNA complementar*  
**CEP** - *comitê de ética em pesquisa*  
**Ct** - *cycle threshold*  
**CTA** - *cancer-testis antigen*  
**DISC** - *death-inducing signalling complex*  
**DNA** - *Deoxyribonucleic acid*  
**DR1**- *Direct Repeat 1*  
**DR4**- *Death receptor 4*  
**DR5**- *Death receptor 5*  
**EDTA** - *ethylenediaminetetraacetic acid*  
**EED** - *embryonic ectoderm development*  
**EGFP** – *enhanced green fluorescent protein*  
**ERK** - *Extracellular signal-regulated kinases*  
**EZH2**- *enhancer of zeste homologue 2*  
**EZH2<sup>KD</sup>** – *EZH2 Knock-down*  
**FADD** - *Fas-Associated via Death Domain*  
**FasL** - *Fas ligand*  
**FKHR** - *Forkhead*  
**FMRP** - *Faculdade de Medicina de Riberão Preto*  
**FoxO1**- *Forkhead box O1*  
**FoxO3a** - *Forkhead box O3*



**FoxO4** - *Forkhead box O4*  
**Gab2**- *GRB2-associated binding protein 2*  
**GAPDH** - *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*  
**GDP** – *Guanosine diphosphate*  
**Grb-2**- *Growth factor receptor-bound protein 2*  
**GTP** - *Guanosine triphosphate*  
**HDACs** - *histona deacetilases*  
**HFS** - *hypotonic fluorochromic solution*  
**HLA** - *Human leukocyte antigen*  
**ICB** - *Instituto de Ciências Biomédicas*  
**IRES** - *internal ribosome entry site*  
**ISGF-3** - *Interferon-stimulated gene factor 3*  
**JAK** - *Janus kinase*  
**JMJD3** - *Jumonji domain-containing protein 3*  
**kDa** – *Quilo Dalton*  
**LB** – *Luria-Bertani*  
**LLA** - *leucemia linfocítica aguda*  
**LMA** - *leucemia mielóide aguda*  
**LMC** – *Leucemia mielóide crônica*  
**MAPKs** - *Mitogen-activated protein kinases*  
**Mcl-1**- *Myeloid cell leukemia sequence 1*  
**Mdm2**- *murine double minute*  
**mRNA** – *RNA mensageiro*  
**mTor** - *mammalian target of rapamycin*  
**NFkB** - *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*  
**NK** - *natural killer*  
**Ph** – *cromossomo Filadélfia (Philadelphia)*  
**PI** – *propidium iodide*  
**PI3K** - *Phosphoinositide 3-kinase*  
**PP2A** - *Protein phosphatase 2*  
**PRAME** - *preferentially expressed antigen in melanoma*  
**PRAME<sup>KD</sup>** – *PRAME knock-down*  
**PRC1**- *polycomb repressor complex 1*  
**PRC2**- *polycomb repressor complex 2*

**PVDF** - *Polyvinylidene Fluoride*  
**RA** - ácido retinóico  
**RAR** - receptor do ácido retinóico  
**RARE** – *retinoic acid responsive element*  
**RNA** - *Ribonucleic acid*  
**RT-PCR** - *Reverse transcription polymerase chain reaction*  
**SDS** - *Sodium Dodecyl Sulphate*  
**SH1** - *Src homology 1*  
**SH2** - *Src homology 2*  
**SH3**- *Src homology 3*  
**SH3BGRL2**- *SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 2*  
**shRNA** – *short hairpin RNA*  
**Sos** - *Son of Sevenless*  
**SRC** - Sarcoma  
**STAT** - *Signal Transducers and Activators of Transcription*  
**SUZ12** - *suppressor of zeste 12*  
**TCLE** - termo de consentimento livre e esclarecido  
**TE** – Tris-EDTA  
**TNF** – *Tumor Necrosis Factor*  
**TPD52L1**- *tumor protein D52-like 1*  
**TRAIL** - *TNF-related apoptosis-inducing ligand*  
**TRAIL-R1** – *TRAIL receptor 1*  
**TRAIL-R2**- *TRAIL receptor 2*  
**TYROBP** - *tyro protein tyrosine kinase binding protein*  
**USP** – Universidade de São Paulo  
**UTX** - *Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
<b>2.1 Geral.....</b>	<b>35</b>
<b>2.2 Específicos.....</b>	<b>35</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Pacientes.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Linhagens celulares.....</b>	<b>37</b>
<b>3.3 Tratamento das Linhagens com Mesilato de Imatinibe.....</b>	<b>38</b>
<b>3.4 Extração de RNA, síntese de cDNA.....</b>	<b>39</b>
<b>3.5 RT- PCR em Tempo Real.....</b>	<b>39</b>
<b>3.6 Cálculo da expressão relativa e Análises estatísticas.....</b>	<b>42</b>
<b>3.7 Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) e “Western-blot” .....</b>	<b>43</b>
<b>3.8 Cepas bacterianas.....</b>	<b>44</b>
<b>3.9 Plasmídeos.....</b>	<b>44</b>
<b>3.10 Recuperação dos plasmídeos recebidos.....</b>	<b>45</b>
<b>3.11 Transformação bacteriana.....</b>	<b>46</b>
<b>3.12 Purificação de DNA plasmidial.....</b>	<b>46</b>
<b>3.13 Transfecção celular.....</b>	<b>46</b>
<b>3.14 Infecção viral.....</b>	<b>47</b>
<b>3.15 Avaliação e quantificação de morte celular por citometria de fluxo.....</b>	<b>48</b>
<b>3.16 Meta-análises.....</b>	<b>48</b>
<b>4.RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
<b>4.1 Confirmação dos resultados do microarray.....</b>	<b>49</b>
<b>4.2 Validação dos resultados em outras linhagens celulares.....</b>	<b>52</b>
<b>4.3 Quantificação da expressão gênica em pacientes com LMC.....</b>	<b>58</b>

<b>4.4 O aumento da expressão de PRAME está correlacionado com a inibição da expressão de TRAIL.....</b>	<b>66</b>
<b>4.5 Análise do promotor de TRAIL.....</b>	<b>68</b>
<b>4.6 Inibição da Expressão de PRAME em linhagem K562.....</b>	<b>69</b>
<b>4.7 Inibição da Expressão de EZH2 em linhagem K562.....</b>	<b>71</b>
<b>4.8 A expressão de EZH2 não é modulada por BCR-ABL.....</b>	<b>72</b>
<b>4.9 A inibição da expressão de PRAME e de EZH2 não interfere na via do FOXO3a.....</b>	<b>75</b>
<b>4.10 A inibição da expressão de PRAME e de EZH2 interfere na proliferação celular.....</b>	<b>76</b>
<b>4.11 A inibição da expressão de PRAME e de EZH2 interfere na resistência à apoptose mediada pelo Mesilato de Imatinibe.....</b>	<b>77</b>
<b>4.12 Quantificação da expressão dos genes responsáveis pela demetilação da H3K27 em pacientes com LMC.....</b>	<b>80</b>
<b>4.13 Meta-análises.....</b>	<b>81</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>86</b>
<b>6.CONCLUSÕES.....</b>	<b>98</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>99</b>
<b>Anexo A – Artigo Submetido.....</b>	<b>115</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa resultante de uma expansão clonal de células tronco hematopoiéticas transformadas. A LMC é uma desordem bifásica ou trifásica, onde a fase crônica inicial é caracterizada por uma expansão massiva de precursores mielóides e células maduras que saem da medula óssea prematuramente, porém ainda possuem capacidade de diferenciação normal, a duração média desta fase é de 3 a 4 anos. Na fase acelerada ocorre acentuação da leucocitose, elevação do número de basófilos no sangue periférico e a terapia utilizada começa a não fazer mais efeito. A aquisição de alterações genéticas e/ou epigenéticas causa a progressão até a fase blástica, uma fase aguda e geralmente fatal. Esta fase caracteriza-se por um bloqueio da diferenciação celular que culmina na presença de 20%, ou mais, células blásticas mielóides ou linfóides na medula óssea, podendo, ainda, apresentar um infiltrado extramedular de células blásticas (REN, 2005; SAWYERS, 2004). A incidência da LMC é de dois casos por 100.000 pessoas por ano, representando aproximadamente 15% de todas as leucemias em adultos, sendo que aproximadamente 85% dos pacientes estão na fase crônica no momento do diagnóstico (FADERL *et al.*, 1999).

A anormalidade genética marcante na LMC é uma translocação cromossômica t(9;22) (q34;q11) que funde o gene *BCR* (breakpoint cluster region), localizado no cromossomo 22 ao gene *ABL* (Abelson leukemia virus), do cromossomo 9, produzindo o cromossomo Filadélfia (Ph). Essa translocação gera o gene *BCR-ABL*, que codifica uma proteína quimérica com alta atividade tirosina quinase (PANE *et al.*, 2002).

O cromossomo Ph está presente em aproximadamente 95% dos pacientes com LMC, além de ser encontrado em 15 a 30% dos pacientes com leucemia linfocítica aguda (LLA) e em aproximadamente 2% dos pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) (KALIDAS *et al.*, 2001).

Dependendo do ponto onde o gene *BCR* é quebrado, podem se formar três principais isoformas de proteínas BCR-ABL (MELO, 1996). Essas proteínas podem

variar de tamanho (190 kDa, 210kDa e 230 kDa) em função do comprimento da porção N-terminal codificada pelo segmento *BCR*, sendo que o tamanho parece correlacionar-se com o fenótipo e agressividade da doença. Na maioria dos pacientes com LMC a proteína se encontra sob a forma de 210 kDa, enquanto que em pacientes com LLA, o BCR-ABL apresenta-se com 190 kDa, e 230 kDa, no caso da leucemia neutrofílica crônica. Ainda nesse contexto, a proteína de 190 kDa parece apresentar sua atividade tirosina-quinase aumentada em relação à proteína de 210 kDa e 230kDa (MCLAUGHLIN *et al.*, 1987; SAWYERS, 1999).

Em contraste à proteína c-ABL, a BCR-ABL exibe sua atividade tirosina-quinase constitutivamente desregulada e é encontrada exclusivamente no citoplasma da célula (BEN-NERIAH *et al.*, 1986), sendo estas duas características essenciais para a indução da transformação das células na LMC. Vários domínios funcionais têm sido identificados na proteína BCR-ABL que podem contribuir para essa transformação. Na porção ABL esses domínios são o SH1 (domínio responsável pela atividade tirosina-quinase), o SH2 (domínio que se liga à resíduos de fosfotirosina e medeia a interação com outras SRC-quinases e substratos celulares), SH3 (domínio que se liga à seqüências ricas em prolina e são potencialmente inibitórios da atividade quinase) e o domínio de ligação a actina. Na porção BCR, o domínio de homo-oligomerização *coiled-coil*, é o responsável pela ativação do domínio tirosina-quinase do ABL; a tirosina na posição 177 (sítio de ligação ao GRB-2) e a seqüência rica em serina e treonina fosforilados (sítio de ligação ao SH2) são os principais domínios (DEININGER *et al.*, 2000).

A expressão de *BCR-ABL* em células hematopoéticas induz a inibição de apoptose (BEDI *et al.*, 1994), sinalização mitótica constitutivamente ativa (PUIL *et al.*, 1994), adesão alterada às células estromais e à matriz extracelular (GORDON *et al.*, 1987) e degradação de proteínas inibitórias do ABL (DAI *et al.*, 1998). Diversas evidências sugerem que a supressão da apoptose constitui um importante mecanismo pelo qual o BCR-ABL leva à expansão das células mielóides. Dentre estas, a consequência primária da inibição da atividade tirosina quinase em células transformadas pelo *BCR-ABL* é a indução da apoptose (DRUKER *et al.*, 1996; GAMBACORTI-PASSERINI *et al.*, 1997); em células hematopoiéticas dependentes de fatores de crescimento, a indução de *BCR-ABL* induz a proliferação e

sobrevivência destas células após a retirada destes fatores e a subsequente inibição deste gene nestas células induz a apoptose (BEDI *et al.*, 1994); outros estudos demonstram que células que apresentam BCR-ABL são extremamente resistentes à vários estímulos apoptóticos e se tornam sensibilizadas à estes estímulos após a inibição do BCR-ABL (MCGAHON *et al.*, 1994). É importante ressaltar que experimentos usando células primárias têm demonstrado que as células progenitoras apresentam uma resposta proliferativa normal aos fatores de crescimento e não apresentam um potencial proliferativo maior do que progenitores normais (EMANUEL *et al.*, 1991). Além do mais, na ausência de soro e de fatores de crescimento nem os progenitores normais nem os da LMC proliferam, porém os últimos são capazes de manter uma alta viabilidade (BEDI *et al.*, 1994). Assim, estas observações ressaltam a importância da inibição da apoptose mediada por BCR-ABL na expansão de células mielóides, progressão tumoral e resistência à terapia citotóxica na LMC.

Dentre as vias de sinalização alteradas pelo BCR-ABL, algumas aparentemente são cruciais para o aumento da resistência à apoptose, principalmente as vias de RAS (SAWYERS *et al.*, 1995), PI3K/AKT (SKORSKI *et al.*, 1997), JAK/STAT (CARLESSO *et al.*, 1996; ILARIA e VAN ETTEN, 1996; SHUAI *et al.*, 1996) e NFkB que estão ativadas e PP2A que esta inibida (NEVIANI *et al.*, 2005). As conseqüências funcionais da desregulação destas vias são as alterações nas atividades e padrões de expressão gênica de moléculas importantes na sobrevivência celular.

Os fatores de transcrição conhecidos como STAT têm sido bastante estudados nas leucemias. Esta família de fatores de transcrição participa de diversos processos, incluindo crescimento celular, diferenciação, apoptose e resposta imune. A ligação de algumas citocinas ou fatores de crescimento aos seus respectivos receptores resultam em uma série de eventos de sinalização que resultam na fosforilação de STAT, dimerização e conseqüente translocação para o núcleo. Alguns genes alvos de STAT são os genes anti-apoptóticos *BCL-xL* e *MCL-1* (STERNBERG e GILLILAND, 2004). Linhagens celulares *BCR-ABL* positivas apresentam uma constitutiva fosforilação e ativação de STAT1 e STAT5. A ativação de STAT5 induz um aumento da expressão de *PIM-1*, *A1* e *BCL-xL* (GESBERT e GRIFFIN, 2000; HORITA *et al.*, 2000; NIEBOROWSKA-SKORSKA *et al.*, 2002).

A importância da ativação do fator de transcrição NFkB na transformação induzida por BCR-ABL permanece controversa, nas quais, alguns trabalhos mostraram que células hematopoiéticas expressando *BCR-ABL* apresentaram uma maior atividade de ligação ao DNA da subunidade p65 (RelA) do NFkB (HAMDANE *et al.*, 1997). Porém, quando foi utilizada uma forma mutante do Ikb, que não pode ser fosforilada e, portanto, inibe de forma constitutiva o NFkB; foi observado que a ativação deste fator de transcrição não é necessária para a proteção da apoptose, mediada por BCR-ABL, após a retirada de fatores de crescimento ou após a exposição a agentes que causam dano ao DNA. Por outro lado, a atividade do NFkB é necessária para que células hematopoiéticas transformadas com o *BCR-ABL* formem tumores em camundongos *nude* e para a transformação de células primárias da medula óssea (REUTHER *et al.*, 1998).

A via de sinalização do RAS encontra-se constitutivamente ativada em células expressando BCR-ABL e a inibição desta via diminui a capacidade do BCR-ABL de transformar células da medula óssea murina (SAWYERS *et al.*, 1995). Como explicado anteriormente, a proteína BCR-ABL apresenta um sítio de ligação ao GRB-2, esta proteína adaptadora é capaz de se associar ao SOS, que forma uma plataforma para o recrutamento de RAS, permitindo a troca do GDP por um GTP e, conseqüentemente, ativando-o (PENDERGAST *et al.*, 1993; PUILL *et al.*, 1994). Esta constante ativação de RAS induz a uma maior expressão de *MCL-1* em células primárias de pacientes com LMC, enquanto que a inibição de *MCL-1* induz uma menor sobrevivência de células K562, que expressam o *BCR-ABL* de forma constitutiva, tanto resistente quanto sensível ao Imatinibe, produzindo efeitos sinérgicos com este fármaco (AICHBERGER *et al.*, 2005).

Recentemente foi demonstrado que a proteína serina/treonina fosfatase PP2A, um supressor de tumor, está funcionalmente inativada na crise blástica devido ao aumento da transcrição de SET, um inibidor de PP2A, mediada por BCR-ABL (NEVIANI *et al.*, 2005). Esta inativação permite a hiperfosforilação e, conseqüentemente, inativação dos substratos pró-apoptóticos de PP2A, como o BAD. Além disto, a hiperfosforilação de algumas quinases como AKT e ERK leva a uma prolongada ativação destas proteínas, induzindo a sinalização de vias de sobrevivência e proliferação. A reativação de PP2A em células BCR-ABL positivas



promove a desfosforilação destes fatores, suprimindo a proliferação e induzindo apoptose.

Por fim, sabe-se que o BCR-ABL é capaz de ativar a via de sinalização PI3K/AKT (SKORSKI *et al.*, 1997), sendo que a inibição farmacológica desta via, em células *BCR-ABL* positivas, com Wortmannin, leva à uma menor formação de colônia (SKORSKI *et al.*, 1995). Não se sabe precisamente como o BCR-ABL ativa a PI3K e, conseqüentemente, fosforila o AKT. Aparentemente, a tirosina 177 do BCR-ABL tem um papel central nesta ativação, por recrutar o complexo GRB2/GAB2 e fosforilar GAB2, que se transforma em um sítio de ligação para o domínio SH2 da subunidade p85 da PI3K (SATTLER *et al.*, 2002). O AKT ativado irá fosforilar e, assim, regular a atividade de diversos substratos, promovendo o aumento da sobrevivência. Entre os substratos de AKT encontram-se: BAD, caspase-9, MDM2, mTOR, FoxO1, FoxO3a e FoxO4 (BURGERING e MEDEMA, 2003; CARDONE *et al.*, 1998; DATTA *et al.*, 1997; MAYO e DONNER, 2001).

A fosforilação, mediada pelo AKT, dos fatores de transcrição da família FoxO regula a sua localização celular, pois após a fosforilação eles migram do núcleo para o citoplasma, tornando-se, assim, inativos. Os fatores desta família regulam a expressão de genes envolvidos na diferenciação, reparo de danos no DNA, controle do ciclo celular, metabolismo da glicose e apoptose (ACCILI e ARDEN, 2004; TRAN *et al.*, 2002). Entre os genes alvos, encontram-se os genes que codificam as proteínas pró-apoptóticas: *FasL*, *p27<sup>Kip1</sup>*, *BIM* e *TRAIL* (DIJKERS *et al.*, 2000; STAHL *et al.*, 2002).

A proteína TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand* ou Apo2L) foi primeiramente descrita em 1995, como sendo uma proteína capaz de induzir apoptose de forma bastante rápida e recebeu este nome devido a sua alta homologia com outros membros da família do TNF e devido à sua semelhança com o FasL (Apo1L) (PITTI *et al.*, 1996; WILEY *et al.*, 1995). O TRAIL é uma proteína transmembrânica com um domínio N-terminal citoplasmático curto e um domínio C-terminal extracelular longo, com capacidade de se ligar aos seus receptores. A ligação do TRAIL aos receptores TRAIL-R1 (DR4) ou TRAIL-R2 (DR5) resulta na trimerização do receptor, o que permite a ligação do FADD (Fas-Associated via Death Domain), uma proteína adaptadora, e na formação do DISC (*death-inducing signalling*

*complex*). A proteína FADD tem dois domínios funcionais, um domínio C-terminal que interage com os DR4 ou DR5 e um domínio N-terminal, que é capaz de recrutar as pró-caspases 8 e 10 para o DISC, onde estas caspases são ativadas, permitindo a transmissão do sinal de apoptose (FALSCHLEHNER *et al.*, 2007). Após a caspase 8 ser ativada no DISC, ela terá dois substratos preferenciais, a caspase 3 e BID, a ativação da primeira levará diretamente à cascata da caspase, levando à apoptose, enquanto que a clivagem de BID irá ativar a via intrínseca de apoptose (Figura 1).

Intrigantemente a cascata de sinalização intracelular induzida por TRAIL não leva somente a ativação das caspases efetoras e, conseqüentemente, à inicialização da apoptose, mas pode também induzir outras vias de sinalização, como por exemplo a ativação de NF- $\kappa$ B, AKT e MAPKs (FALSCHLEHNER *et al.*, 2007). Apesar de todo o conhecimento dos mecanismos moleculares da indução de apoptose por TRAIL, pouco se sabe sobre sua atividade na diferenciação e proliferação celular.

O TRAIL tem demonstrado duas funções importantes na defesa contra tumores. Primeiro, esta proteína é capaz de induzir apoptose seletivamente em células tumorais, enquanto que células normais são altamente insensíveis (ASHKENAZI *et al.*, 1999; WALCZAK *et al.*, 1999; WANG e EL-DEIRY, 2003); por fim, o TRAIL é crítico na vigilância imunológica contra o desenvolvimento de tumores (TAKEDA *et al.*, 2002; TAKEDA *et al.*, 2001; TAKEDA *et al.*, 2004), sendo necessário para a atividade das células T contra os tumores (SCHMALTZ *et al.*, 2002). Isso se reflete nos camundongos TRAIL<sup>-/-</sup>, que apresentam maior susceptibilidade à iniciação tumoral e à metástase (CRETNEY *et al.*, 2002; SEDGER *et al.*, 2002).

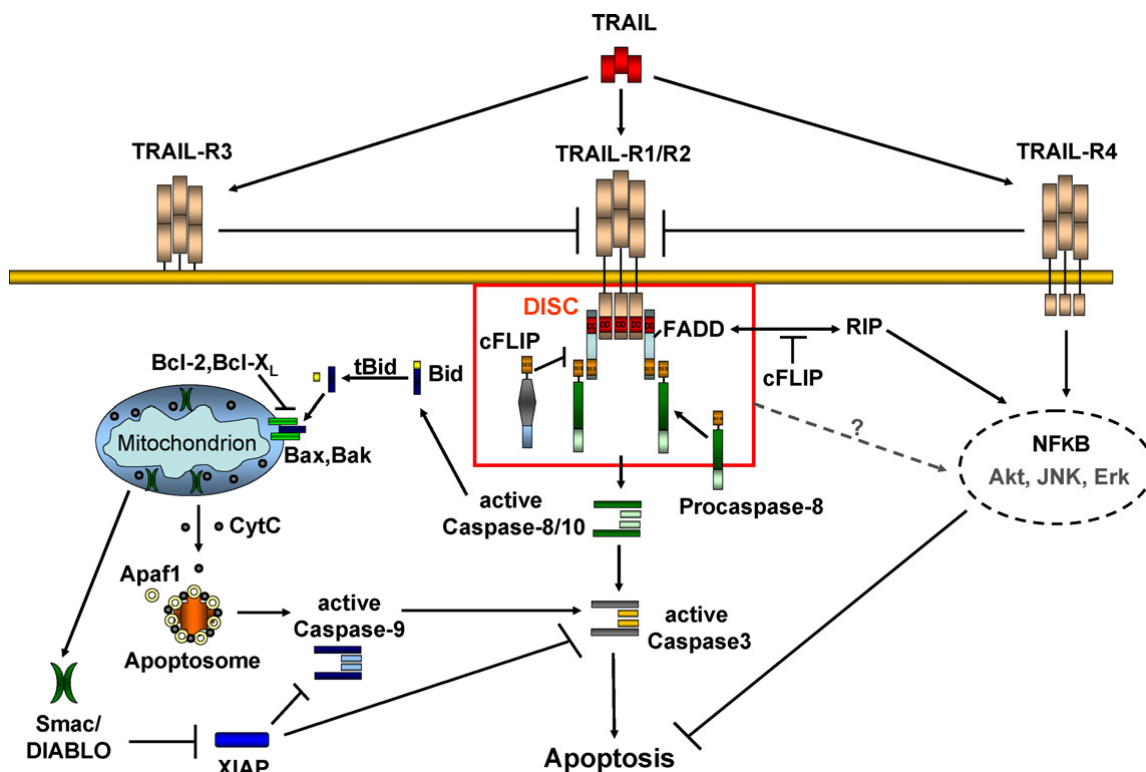


Figura 1: Vias de sinalização ativadas pela ligação de TRAIL com seus receptores. (FALSCHLEHNER *et al.*, 2007).

Somente recentemente começou-se a ter um conhecimento mais aprofundado, ao nível molecular, da regulação transcripcional do *TRAIL*. Diferentes trabalhos têm demonstrado um aumento do mRNA deste gene por ácido retinóico (ALTUCCI *et al.*, 2001) e por citocinas, como os interferons ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) (CHEN *et al.*, 2001; FANGER *et al.*, 1999; KAYAGAKI *et al.*, 1999) e o TNF (SIEGMUND *et al.*, 2001). Muito destes estudos têm identificado seqüências no promotor de TRAIL que são necessárias na regulação por estes indutores, dentre os fatores de transcrição identificados, importantes para a regulação da expressão deste gene, podemos citar o ISGF-3 (*INF-stimulated gene-factor 3*) (SATO *et al.*, 2001), Nf $\kappa$ B, FOXO3a (FKHRL1), FKHR (GHAFARI *et al.*, 2003; MODUR *et al.*, 2002) e EGR-2 e EGR-3 (DROIN *et al.*, 2003).

Tendo em vista a capacidade de TRAIL induzir apoptose seletivamente em células tumorais (ASHKENAZI *et al.*, 1999; WALCZAK *et al.*, 1999; WANG e EL-DEIRY, 2003), ele se tornou uma potencial molécula para o tratamento do câncer, utilizando-se TRAIL recombinante, assim como tem se buscado alvos terapêuticos na

sua via de sinalização, utilizando-se por exemplo anticorpos monoclonais capazes de ativar DR4 ou DR5 (ASHKENAZI *et al.*, 1999; CHUNTHARAPAI *et al.*, 2001).

Devido à alta resistência das células *BCR-ABL*<sup>+</sup> à apoptose, o transplante de medula óssea tem sido o único tratamento definitivo para a LMC. Porém, a maioria dos pacientes não estão aptos a receber este tratamento, seja devido à idade avançada ou em função da ausência de um doador HLA-compatível (GOLDMAN e DRUKER, 2001). A descoberta que o BCR-ABL é necessário na patogenia da LMC e que sua atividade tirosina-quinase é importante na transformação celular fez com que a ABL quinase se tornasse um alvo interessante para a intervenção terapêutica (DEININGER, 2004). Assim, foi desenvolvido o Mesilato de Imatinibe (Glivec ou STI571), um derivado de 2-fenilaminapirimidina, que apresenta grande especificidade pela tirosina-quinase ABL (DRUKER *et al.*, 1996) e que inibe competitivamente e em concentrações micro molares a ligação do ATP com o domínio quinase de ABL (MAHON *et al.*, 2000). Dessa forma, a atividade enzimática da proteína BCR-ABL é suprimida, levando a morte da célula leucêmica por diminuir sua resistência à apoptose. Esse fármaco tem demonstrado ser capaz de induzir a apoptose seletivamente em células *BCR-ABL*<sup>+</sup> e tem obtido sucesso no tratamento de pacientes com LMC (OHNO, 2006).

Apesar das altas taxas de resposta hematológica e citogenética, tem sido observado, em um crescente número de pacientes com LMC, a resistência ao Mesilato de Imatinibe, principalmente em pacientes nos estágios mais avançados da doença. Os dois principais mecanismos de resistência são o aumento da expressão de *BCR-ABL* devido, principalmente, a uma amplificação gênica e, mais freqüentemente, à aquisição ou seleção de mutações pontuais específicas em várias regiões críticas do *BCR-ABL* (GORRE e SAWYERS, 2002; HOCHHAUS *et al.*, 2002; SOVERINI *et al.*, 2004).

Entretanto, algumas linhagens celulares apresentam resistência ao Imatinibe sem apresentar uma maior expressão de *BCR-ABL* ou mutações nesta proteína. De fato, 10 a 50% dos pacientes com LMC, que apresentam resistência secundária ao Imatinibe, não apresentam mutações detectáveis no *BCR-ABL*, sugerindo, neste processo de resistência, o envolvimento de outros mecanismos, que não estão sobre controle direto da atividade de tirosina-quinase de BCR-ABL (MAHON *et al.*, 2000).

Assim, enquanto o Imatinibe e as novas gerações de inibidores têm melhorado o tratamento da LMC, um entendimento detalhado das vias de sinalização que são ativadas pelo BCR-ABL, tanto dependentes quanto independentes de sua atividade tirosina-quinase, é necessário para uma compreensão detalhada da leucemia induzida pelo BCR-ABL. Essa informação poderá ser utilizada em novas estratégias terapêuticas que poderão ser aplicadas independentemente ou combinado com inibidores de atividade tirosina-quinase para o tratamento da LMC. Isto tem estimulado alguns grupos, entre os quais o nosso, a utilizarem uma abordagem genômica, como técnicas de DNA *Microarray*, para detectar a expressão diferencial de alguns genes que possivelmente estejam envolvidos neste processo de transformação maligna e resistência ao Imatinibe.

Em trabalhos prévios no nosso laboratório, ainda não publicados, foram estabelecidas três linhagens celulares transfectadas com o oncogene *BCR-ABL*, as quais expressam, de forma constitutiva, a proteína BCR-ABL: HL60.BCR-ABL, HeLa.BCR-ABL e SKW.6.4.BCR-ABL. A expressão gênica global dessas células foi comparada com suas respectivas contrapartes, transfectadas apenas com o vetor vazio, a saber, HL60, HeLa e SKW6.4. Para obtenção da expressão gênica utilizou-se a técnica de hibridização em DNA *Microarrays*, realizado com *CodeLink™ Bioarray Chips* (*GE Health Care*), compostos por oligonucleotídeos representando cerca de 20.000 genes humanos distintos, com seqüências catalogadas em banco de dados (Human Unigene, NCBI). Os dados extraídos de cada *Microarray* foram normalizados de acordo com os valores de fluorescência dos genes de expressão constitutiva, presentes nos chips como controles internos (*GAPDH* e  $\beta$ *ACTINA*), e os genes expressos diferencialmente nas células *BCR-ABL*<sup>+</sup> em relação às negativas foram identificados pelas razões dos valores de intensidade fluorescente obtidos a partir de amostras teste e controle, pelo programa *CodeLink Expression v.2.3* (*GE Health Care*).

Desse modo, a análise de expressão gênica diferencial, detectou 465 genes cuja expressão está aumentada em células HL60.BCR-ABL e HeLa.BCR-ABL. Além disso, 70 genes apresentaram expressão diminuída, sendo que a maioria apresentou uma alteração discreta (Figura 2). Não foram selecionados genes diferencialmente expressos em SKW6.4.BCR-ABL, pois nesta linhagem a presença do BCR-ABL não

produziu um fenótipo de resistência à apoptose. Dentre os genes selecionados que apresentaram uma maior variação e cuja função parece ser importante na patogênese das leucemias *BCR-ABL*<sup>+</sup> encontram-se os genes que codificam as proteínas SH3BGRL2 (*SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 2*); TPD52L1 (*tumor protein D52-like 1*), também conhecida como D53; PRAME (*preferentially expressed antigen in melanoma*); DAP12, também conhecido como TYROBP (*tyro protein tyrosine kinase binding protein*) e CALCINEURINA A BETA. Os três primeiros apresentaram uma expressão aumentada e os dois últimos apresentaram uma expressão diminuída.

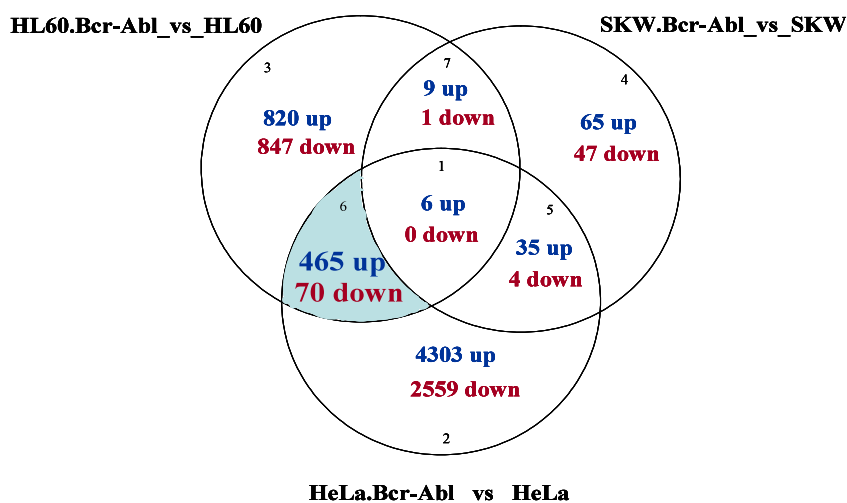


Figura 2: Número de genes que são modulados pela expressão de BCR-ABL nas células HL60, HeLa e SKW.6.4.

O gene que codifica a proteína SH3BGRL2 está localizado no cromossomo 6, na região 6q13-15, uma região associada com a diminuição da heterogeneidade em várias formas de tumores sólidos como câncer de próstata (ROKMAN *et al.*, 2001), carcinomas hepatocelulares (SAKAKURA *et al.*, 1999) e câncer de mama (RODRIGUEZ *et al.*, 2000). Essa proteína se localiza principalmente no núcleo e na região perinuclear, possui uma região rica em prolina que apresenta um domínio SH3 e, através de bioinformática, é classificada como pertencente à superfamília de proteínas “Thioredoxin-like” que agrupa um grande número de proteínas com atividade de oxirredução, sugerindo que a proteína SH3BGRL2 possa estar envolvida

no controle de processos celulares dependentes de oxirredução (MAZZOCCO *et al.*, 2002). Dentre os processos regulados por essa família de proteínas podemos citar: defesa ao estresse oxidativo, proliferação celular, transdução de sinais e regulação da transcrição (ARNER e HOLMGREN, 2000; KONTOU *et al.*, 2004; NAKAMURA *et al.*, 1997).

O gene que codifica a proteína D53 também está localizado no cromossomo 6, na região 6q22-23 (BYRNE *et al.*, 1996). Esta proteína apresenta grande homologia com os membros da família D52 (D52, D53 e D54), incluindo um domínio *coiled-coil* o que indica interação proteína-proteína. Esta família de proteínas está envolvida na transdução de sinal mediada por cálcio e na proliferação celular (BYRNE *et al.*, 1998). Sabe-se que o gene *D53* está presente em um “*cluster*” de genes implicados na divisão celular, morte celular e segregação de cromossomos, e que a sua regulação é dependente da fase do ciclo celular, sendo seu pico de expressão na transição de G2-M (BOUTROS e BYRNE, 2005). Entretanto, foi recentemente demonstrado que a indução da expressão de *D53* em linhagem celular 3T3, não induz aumento da proliferação ou capacidade de crescimento independente de ancoragem, enquanto a expressão ectópica de *D52* é capaz de induzir estes fenótipos. Da mesma forma, a redução da expressão de *D52* em células SK-BR-3 é capaz de induzir apoptose, enquanto a redução de *D53*, não (SHEHATA *et al.*, 2008).

O gene que codifica a proteína DAP12 está localizado no cromossomo 19, na região 19q13.1. Essa proteína está associada à ativação de células natural killer (NK), já que vários receptores de ativação de NK dependentes de DAP12 têm sido identificados (LANIER, 2005; TOMASELLO e VIVIER, 2005). Além disso, as células NK exercem importante papel na resposta imune anti-leucêmica na LMC, pois apresentam atividade citotóxica somente contra as células progenitoras leucêmicas (LIM e COLEMAN, 1997). Finalmente, sabe-se que células NK quando transfectadas com o *BCR-ABL* têm sua atividade citotóxica reduzida, porém não se sabe quais os mecanismos moleculares envolvidos (CHIOREAN *et al.*, 2003).

O gene que codifica a proteína CALCINEURINA A BETA está localizado no cromossomo 10, na região 10q21-22. Sabe-se que esta molécula apresenta funções pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, dependendo do contexto celular (ASADA *et al.*, 1998; JAYARAMAN e MARKS, 2000; LOTEM *et al.*, 1999; TOMBAL *et al.*, 2000;

WANG *et al.*, 1999; ZHAO *et al.*, 1995). Porém não se sabe o comportamento desta molécula em células que apresentam o BCR-ABL.

O gene que codifica a proteína PRAME foi inicialmente descrito em um paciente que apresentava um quadro de melanoma recorrente, sendo encontrado um antígeno capaz de iniciar uma resposta imune citotóxica mediada por linfócitos T autólogos, a esse antígeno foi dado o nome de PRAME (*PReferentially expressed Antigen of MELanoma*) (IKEDA *et al.*, 1997). Em trabalhos subseqüentes, ao se analisar o perfil de expressão gênica em diferentes estágios da progressão do melanoma, foi demonstrado que o *PRAME* é expresso em melanomas primários, porém não é expresso em tecidos de pele saudável ou em lesões melanocíticas benignas. Sugerindo que a expressão de *PRAME* é um evento da transformação do melanócito (HAQQ *et al.*, 2005).

Em seguida, foi demonstrado que o *PRAME* é freqüentemente expresso em diferentes tumores e sua expressão se correlaciona com o prognóstico e a sobrevida dos pacientes. Sabe-se que este gene é expresso em carcinomas de pulmão; mama; renal; tumores de cabeça e pescoço; linfomas de Hodgkin's; sarcomas; tumores de Wilm e meduloblastoma (BEER *et al.*, 2002; BOON *et al.*, 2003; IKEDA *et al.*, 1997; NEUMANN *et al.*, 1998; WILLENBROCK *et al.*, 2006). Além de ser expresso em leucemias, como nas fases aguda e crônica das leucemias mielocíticas e linfocíticas; leucemia linfoblástica aguda; leucemia mielóide aguda e, aparentemente, ocorre um aumento durante a progressão da leucemia mielóide crônica (GREINER *et al.*, 2004; PAYDAS *et al.*, 2005; RADICH *et al.*, 2006; STEINBACH *et al.*, 2002a; STEINBACH *et al.*, 2002b; VAN BAREN *et al.*, 1998).

Um outro tumor onde normalmente encontra-se uma alta expressão de *PRAME* é o neuroblastoma, no qual foi observada a expressão deste gene em 93% dos tumores primários e em 100% dos pacientes em estágios mais avançados. Neste tumor observam-se associações altamente significativas entre a alta expressão de *PRAME* e o estágio mais avançado da doença e a um prognóstico desfavorável (OBERTHUER *et al.*, 2004). No caso do tumor de mama, foi observado que a alta expressão de *PRAME* funciona como um marcador molecular para um prognóstico desfavorável, sendo que a alta expressão de *PRAME* se correlaciona com uma maior



probabilidade de desenvolver metástases e com uma menor sobrevida do paciente (VAN 'T VEER *et al.*, 2002).

Diferentemente de outros antígenos do tipo “*cancer-testis*” (CTA), a expressão de *PRAME* também é observada em alguns tecidos saudáveis. Além dos testículos, foi observada sua expressão em ovários, glândulas adrenais, endométrio e células CD34<sup>+</sup> da medula óssea (IKEDA *et al.*, 1997; STEINBACH *et al.*, 2002b). A alta expressão de antígenos do tipo CTA nos testículos pode ser explicada pela ampla demetilação de ilhas de CpG no genoma das células germinais masculinas, porém muito pouco se sabe sobre a causa da expressão aumentada de *PRAME* nos tumores. Como a maioria dos estudos tem usado técnicas baseadas na quantificação da expressão de mRNA, está claro que os níveis dos transcritos deste gene são altamente induzidos em amostras tumorais, porém não se sabe se isto ocorre devido a amplificações gênicas, maiores taxas de transcrição ou uma maior meia-vida do mRNA. Não foram descritas até o momento alterações genéticas como mutações e translocações neste gene. Porém, recentemente foi demonstrado que a hipometilação das ilhas de CpG presentes no promotor do *PRAME* é responsável pela sua maior expressão em tumores humanos (SCHENK *et al.*, 2007).

Surpreendentemente, uma ampla família de genes “*PRAME-like*” e pseudogenes têm sido observadas no genoma humano. Foram observados 22 “*PRAME-like*” genes e 10 Pseudogenes, os quais têm surgido recentemente na evolução por meio de extensivas duplicações gênicas (BIRTLE *et al.*, 2005). Entretanto, pouco se sabe sobre a expressão destes genes e suas possíveis funções. O genoma de camundongo contém vários genes “*PRAME-like*” em uma região ortóloga, porém não está claro se um ortólogo funcional do *PRAME* existe.

Assim sendo, surge a questão se a expressão de *PRAME* está implicada nas causas da transformação oncogênica ou se isto é apenas uma consequência da doença. Dados recentes indicam que o *PRAME* pode ser importante na progressão tumoral por interferir com a sinalização do receptor do ácido retinóico - RAR (EPPING *et al.*, 2005). A sinalização do ácido retinóico é essencial no desenvolvimento, determinação da diferenciação celular e homeostase do tecido. O ácido retinóico (RA) induz a transcrição de diversos genes alvos por se ligar e ativar o seu receptor, resultando em diferenciação e parada do ciclo celular em células responsivas

(ALTUCCI *et al.*, 2001). Assim sendo, a perda da responsividade ao ácido retinóico é benéfica para as células tumorais.

A seqüência de aminoácidos da proteína PRAME revela a presença de sete possíveis regiões de ligação aos receptores nucleares. Estas regiões apresentam o motivo LXXLL (onde L é leucina e X é qualquer outro aminoácido) e normalmente estão presentes em proteínas que se ligam e modulam a atividade de receptores nucleares hormonais. Assim, foi verificado se o PRAME possuiria a capacidade de reprimir a transativação de diversos receptores nucleares e foi notado que esta proteína é capaz de inibir apenas a sinalização do RAR (EPPING *et al.*, 2005).

O RAR reprime a transcrição dos genes alvo na ausência do seu ligante e ativa a transcrição após a ligação com o ácido retinóico (RA). Foi observado que o PRAME se liga diretamente ao RAR e inibe a transativação, mesmo na presença do ácido retinóico, agindo assim, como um repressor dominante da via do RAR. A expressão ectópica de PRAME, em células sensíveis ao RA, foi capaz de induzir resistência à parada do ciclo celular, diferenciação e apoptose induzidos pelo RA. Além disto, a inibição da expressão de *PRAME* por RNA de interferência em linhagens de melanoma resistentes ao ácido retinóico, restaurou a sensibilidade e induziu a expressão dos genes alvos *RARβ* e *p21*. Outro dado importante, é que o xenotransplante de melanoma com o *PRAME* inibido pode ser tratado com ácido retinóico, resultando em tumores com tamanho significativamente menor quando comparado com tumores sem a inibição deste gene (EPPING *et al.*, 2005).

O mecanismo pelo qual o PRAME inibe a trans-ativação mediada pelo RAR é independente do recrutamento de histona deacetilases (HDACs), e dependente do recrutamento da proteína EZH2 (Figura 3), do grupo dos polycombs, já que em ensaios de co-imunoprecipitação foi possível observar a interação de PRAME e EZH2. Além disto, o silenciamento de *EZH2* é capaz de reverter a inibição da via do RAR mediado por PRAME. Também é importante ressaltar que mutação pontual no domínio com atividade histona metil-transferase, chamado SET, da proteína EZH2 também restaura a sinalização do RAR e, por fim, o silenciamento do gene *EED*, que codifica uma proteína fundamental do complexo PRC2 também é capaz de recuperar a sinalização do RAR (EPPING *et al.*, 2005).

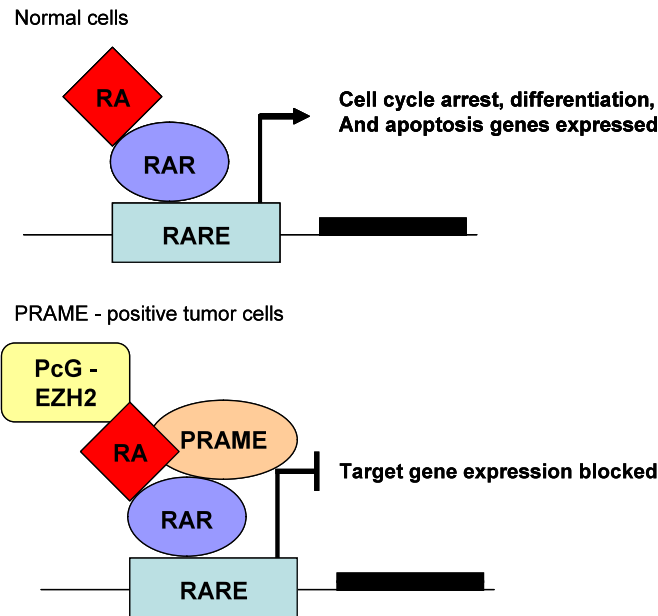


Figura 3: Inibição da via do ácido retinóico mediada por PRAME (EPPING *et al.*, 2005).

Sabe-se que existem pelo menos quatro diferentes complexos formados pelas proteínas polycombs. Destes, dois são extremamente importantes para o silenciamento gênico, o PRC1 (*polycomb repressor complex 1*) e PRC2. A metilação da lisina 27 de histona H3 (H3K27) é catalizada pelo PRC2, um complexo que depende de três principais componentes: EED (“embryonic ectoderm development”), SUZ12 (“suppressor of zeste 12”) e EZH2 (“enhancer of zeste homologue 2”), este último possui um domínio SET, com atividade histona metil-transferase. A lisina 27 da histona H3 trimetilada serve como um sítio de ligação para o complexo PRC1, que possui as proteínas RING1A, RING1B e BMI1. Apesar de não ser conhecido o mecanismo exato pelo qual as proteínas do complexo polycomb reprimem a transcrição, sabe-se que os componentes RING1A-B funcionam como uma ubiquitina ligase para a monoubiquitinação da lisina 119 da histona H2A e, aparentemente, a proteína BMI1 é capaz de aumentar este efeito (CAO *et al.*, 2005; DE NAPOLES *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004). Assim, é possível que a ubiquitinação da histona H2A possa interferir com a dinâmica do nucleossoma ou com a estabilidade da RNA polimerase e, portanto, inibir a expressão dos genes onde os complexos PRC1 e 2 estão agindo.

Três trabalhos recentes mostram evidências que locais do genoma onde ocorre metilação da H3K27 estão sujeitos à metilação *de novo* de ilhas CpG no DNA, em células tumorais, o que permitiria um silenciamento ainda mais estável destes genes (OHM *et al.*, 2007; SCHLESINGER *et al.*, 2007; WIDSCHWENDTER *et al.*, 2007).

Mais recentemente, quatro grupos descreveram que as proteínas UTX e JMJD3 são capazes de demetilar lisina 27 di ou trimetilada, na histona H3 (AGGER *et al.*, 2007; DE SANTA *et al.*, 2007; LAN *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2007). Estes achados têm grande importância em como o silenciamento gênico mediado pelo grupo dos polycombs pode ser revertido.

Assim sendo, é possível que a expressão de *TRAIL*, que é induzida pelo ácido retinóico (ALTUCCI *et al.*, 2001), seja regulada por PRAME, um repressor dominante da via do ácido retinóico (EPPING *et al.*, 2005), em um processo dependente de EZH2, uma proteína do grupo dos polycombs. Este processo, se comprovado, teria grande relevância na fisiopatologia e terapêutica da LMC e, possivelmente, também de outros tumores.

Logo, a hipótese deste trabalho é que *PRAME* tenha sua expressão aumentada na LMC o que, por inibir a via do ácido retinóico, irá reduzir a expressão de *TRAIL*, um importante supressor tumoral.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Nosso grupo de pesquisa desenvolve diversos trabalhos que investigam, por meio de abordagens genômicas e proteômicas, as vias bioquímicas de sinalização intracelular que são alteradas pelo neo-oncogene *BCR-ABL*. Ainda nesse contexto, procuramos melhorar o conhecimento dos mecanismos pelos quais a proteína BCR-ABL exerce sua atividade de transformação tumoral, com ênfase na sua atividade anti-apoptótica, além de buscar novos alvos terapêuticos e marcadores prognósticos em leucemias que apresentem o cromossomo Filadélfia.

### 2.2 Específicos

1- Validar os resultados de expressão gênica global, obtidos anteriormente pela técnica de cDNA “Microarray” através da quantificação da expressão dos genes *SH3BGRL2*, *D53*, *PRAME*, *DAP12* e *CALCINEURINA A BETA* em linhagens celulares BCR-ABL<sup>-</sup>, BCR-ABL<sup>+</sup> e em células de pacientes portadores de LMC, em diversas fases da doença;

2- Verificar se a expressão de *PRAME* é regulada por BCR-ABL e se a expressão de *PRAME* pode ser utilizada como um marcador da progressão da LMC;

3- Definir se a expressão de *PRAME* é capaz de reduzir a expressão de *TRAIL* e verificar se este possível processo é dependente de EZH2;

4- Avaliar o potencial uso da proteína PRAME como alvo terapêutico, isolado ou em associação com o Mesilato de Imatinibe, nas leucemias Ph<sup>+</sup>;

5- Analisar se uma maior expressão de *PRAME* esta correlacionada a uma menor expressão de *TRAIL* em outros tipos tumorais.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Pacientes

No estudo foram utilizadas amostras de sangue periférico 40 pacientes com LMC, sendo 11 pacientes na fase crônica, 10 na fase acelerada, 10 na fase blástica e 9 em remissão citogenética completa. O grupo de pacientes é composto por 20 homens e 20 mulheres, com idade média de 40 anos. Os pacientes avaliados nesse estudo foram selecionados com base no diagnóstico da doença, realizado por meio de achados clínicos e laboratoriais. O diagnóstico de LMC foi confirmado por meio da detecção do *BCR-ABL* pela técnica de RT-PCR em tempo real e/ou identificação do cromossomo Filadélfia por citogenética. Os dados clínico-laboratoriais e de terapêutica utilizados nos pacientes foram obtidos a partir da revisão dos prontuários arquivados em cada hospital de procedência dos pacientes. Os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) autorizando a obtenção e utilização das amostras de sangue para desenvolvimento desse estudo.

O grupo controle foi formado por 10 indivíduos com idade média de 41 anos, sendo 5 do sexo masculino e 5 do sexo feminino. Todos também assinaram o TCLE antes da colheita de 40 ml de sangue periférico.

Células mononucleares de sangue periférico dos pacientes com LMC em diferentes fases da doença, antes e após tratamento com o Mesilato de Imatinibe e dos indivíduos saudáveis foram obtidas, armazenadas em Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen Life technologies) para posterior realização da extração de RNA.

O sangue periférico dos pacientes foi submetido à separação das células mononucleares pelo método de Ficoll-Hypaque conforme técnica descrita por Boyum em 1977 (BOYUM, 1977). O sangue foi diluído em solução fisiológica e aplicado delicadamente às paredes dos tubos de polipropileno de 15 ml, contendo Ficoll-Hypaque 1,077, na proporção de 4 para 1 parte em volume, respectivamente. Após centrifugação a 500 g durante 20 minutos, as células foram retiradas da interface plasma-Ficoll-Hypaque e lavadas duas vezes com solução fisiológica. As células

mononucleares na concentração de  $5 \times 10^6$  células foram re-suspendidas em 0,5 ml de Trizol<sup>®</sup>.

Essas amostras que estão sendo utilizadas em diferentes projetos de pesquisas do laboratório. O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein (CEP/Einstein número 06/405) e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEP/ICB parecer 725).

### 3.2 Linhagens celulares

Foram utilizadas as seguintes linhagens celulares:

K562: Isolada de efusão pleural de uma paciente com 53 anos em fase terminal da crise blástica. Linhagem de origem hematopoiética, multipotente que se diferencia espontaneamente em precursores das séries eritrocítica, granulocítica e monocítica;

K562pRS: K562 infectada com o vetor pRS vazio;

K562pRS-PRAME: K562 infectada com o vetor pRS-PRAME. Esta linhagem apresenta baixa expressão de *PRAME*;

K562pRS-EZH2 3: K562 infectada com o vetor pRS-EZH2 3. Esta linhagem apresenta baixa expressão de *EZH2*;

K562pRS-EZH2 4: K562 infectada com o vetor pRS-EZH2 4. Esta linhagem apresenta baixa expressão de *EZH2*;

LAMA-84: Linhagem celular de leucemia mielóide crônica estabelecida do sangue periférico de uma paciente com 29 anos na fase blástica. Essa linhagem tem características morfológicas de blastos da linhagem megacariocítica;

KBM7: Linhagem celular derivada de um paciente de 39 anos na fase blástica. As células são fenotipicamente mielóide e expressam atividade quinase do BCR-ABL;

HL-60: Linhagem humana derivada de leucemia promielocítica aguda, que possui uma alta expressão de c-myc e é extremamente sensível à apoptose;

HL60.BcrABL: HL60 infectada com o plasmídeo pSRaMSNtkneo.p185BCR-ABL. Essa linhagem é extremamente resistente à apoptose;

HeLa: Linhagem epitelial humana isolada de carcinoma cervical, transformada pelo papilomavírus humano 18 (HPV18). A expressão de p53 nessa linhagem é baixa;

HeLa.BCR-ABL HeLa infectada com o plasmídeo pSRaMSNtkneo.p185BCR-ABL. Resistente à apoptose;

SKW6.4: Linfócito B humano transformado pelo vírus Epstein-Barr (EBV);

SKW6.4.BCR-ABL: SKW6.4 infectada com o plasmídeo pSRaMSNtkneo.p185BCR-ABL. Essa linhagem é sensível à apoptose apesar da presença do BCR-ABL;

THP1: Monócito humano derivado de leucemia monocítica aguda;

THP1.BCR-ABL: THP1 infectada com o plasmídeo pSRaMSNtkneo.p185BCR-ABL;

293Phoenix-ampho: Linhagem produtora de retrovírus altamente transfectável. Criada a partir da 293T com construções capazes de produzir gag, pol e proteínas do envelope para retrovírus amphotrópicos.

O cultivo das linhagens celulares supracitadas foi realizado em meio RPMI1640 completo (suplementado com 10% soro fetal bovino, 2 mM glutamina, 100 µg/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina e 25 mM HEPES), com exceção das linhagens 293Phoenix-ampho, HeLa e HeLa.BcrABL que foram cultivadas em meio DMEM completo.

### **3.3 Tratamento das Linhagens com Mesilato de Imatinibe**



As linhagens HL-60, HL60.BCR-ABL, K562, K562pRS, K562pRS-PRAME, K562pRS-EZH2 3 e K562pRS-EZH2 4 foram plaqueadas na concentração de  $3 \times 10^6$  células por poço em placa de 6 poços, cultivadas em três ml de meio RPMI 1640 completo (suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2mM glutamina, 100u/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina) e na presença ou ausência de STI571 nas concentrações finais de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 10mM. As células foram mantidas na estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 8, 24, 48 ou 72 horas. Ao final de cada período, as células foram retiradas e processadas para a obtenção de amostras para cDNA e Western-blot.

### **3.4 Extração de RNA, síntese de cDNA**

A extração do RNA total das células mononucleares dos pacientes e das linhagens celulares foi realizada pelo método do Trizol<sup>®</sup>, de acordo com protocolo do fabricante (Invitrogen Life Technologies). Em linhas gerais,  $4 \times 10^6$  células foram lisadas com 0,5 mL de Trizol e, após precipitação e lavagem do RNA, os precipitados foram ressuspensos em 30µl de água livre de RNAses.

A concentração de RNA total foi detectada por espectrofotometria ( $\lambda=260$  nm), observando-se a relação entre 1,8 e 2,0 sobre a leitura a 280 nm, e três microgramas de RNA total foram usados para obtenção do cDNA, utilizando-se a *Superscript* III (Life Technologies), de acordo com protocolo do fabricante. Todos os produtos utilizados foram adquiridos da empresa Invitrogen, Life Technologies.

Para a verificação da qualidade dos cDNAs sintetizados foram feitas reações de RT-PCR para b-actina. O *primer* usado para amplificar a b-actina foi: *Forward* (GTG GGC ATG GGT CAG AAG) e *Reverse* (GGC CAT CTC TTG CTC GAA). Para essa reação foi utilizado o seguinte ciclo: (94 °C/1 minuto, 94 °C/ 30 segundos, 54 °C/ 30 segundos, 72 °C/45 segundos) x 24 ciclos, 72 °C/5 minutos.

### **3.5 RT- PCR em Tempo Real**

Para a amplificação por RT-PCR em tempo real dos genes de interesse, foram desenhados primers específicos. Para isso foram utilizadas as seqüências de cDNA obtidas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), a saber: *PRAME* (NM\_206954.1), *Calcineurina a beta* (NM\_021132), *D53* (NM\_003287), *DAP12* (NM\_003332), *SH3BGRL2* (NM\_031469), *EZH2* (NM\_004456), *EED* (NM\_003797), *SUZ12* (NM\_015355), *UTX* (NM\_021140), *JMJD3* (NM\_001080424) e *TRAIL* (NM\_003810). Essas seqüências foram usadas no programa PRIMER3 ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)), para o desenho dos primers. No programa foi escolhido o tamanho do produto da amplificação de 100 a 300 pares de base. O programa gera 5 possíveis *primers* e, para a escolha do oligonucleotídeo a ser sintetizado, foi verificado a qualidade dos *primers* no programa Jellyfish, e escolhido o que apresentava uma maior qualidade. Por fim, foi verificado se o *primer* se anela apenas com o gene de interesse, utilizando-se a seqüência do par de *primers* no BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e verificando se apenas o gene de interesse se liga a ambos os *primers*. Os oligonucleotídeos selecionados foram sintetizados pela Invitrogen, Life Technologies.

Os pares de Oligonucleotídeos utilizados foram os seguintes:

*PRAME Foward: 5'- GGT TCC ATT CAG AGC CGA TA -3'*

*PRAME Reverse: 5'- TCA AGT CCA TCA AGC ACA GC -3'*

*Calcineurina a beta Foward: 5'- CAG CCC GGA AAG AAA TCA TA -3'*

*Calcineurina a beta Reverse: 5'- ATC CAA ACC CTT TGC CTC TT -3'*

*D53 Foward: 5'- CAA AAA CTC GGC ATG AAC CT -3'*

*D53 Reverse: 5'- CCG CCT ACT TTC GTC TTG AG -3'*

*DAP12 Foward: 5'- GCT GGC TGT AAG TGG TCT CC -3'*

*DAP12 Reverse: 5'- TAA GGC GAC TCG GTC TCA GT -3'*

*SH3BGRL2 Forward: 5'- GCT TCG TGG CGA TAA AGA AG -3'*

SH3BGRL2 *Reverse*: 5'- TGT GTT GCT TTC CTT GGA TTC -3'

EZH2 *Foward*: 5'-AGG ACG GCT CCT CTA ACC AT-3'

EZH2 *Reverse*: 5'-CTT GGT GTT GCA CTG TGC TT-3'

EED *Foward*: 5'-GAG AGG GAA GTG TCG ACT GC-3'

EED *Reverse*: 5'-GGT GTA TCA GGG CGT TCA GT-3'

SUZ12 *Foward*: 5'-CTG CCT CCA TTC GAA ACA TT-3'

SUZ12 *Reverse*: 5'-GTT TGG CAA TAG GAG CCG TA-3'

UTX *Forward*: 5'-CCT CAT AAC CGC ACA AAC CT-3'

UTX *Reverse*: 5'-ATT AGG ACC TGC CGA ATG TG-3'

JMJD3 *Forward*: 5'-GGC CAC CAG GAG AAT AAC AA-3'

JMJD3 *Reverse*: 5'-ACA GAA AGC GCT GAT GGT CT-3'

TRAIL *Forward*: 5'-AAG GCT CTG GGC CGC AAA ATA AAC-3'

TRAIL *Reverse*: 5'-GCC AAC TAA AAA GGC CCC GAA AAA-3'

Para as reações de quantificação por RT-PCR em tempo real foi utilizado o kit Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG, da Invitrogen. Para cada reação foi utilizado 6,25 ml de SYBR Green; 4,25 ml de água livre de DNase/RNase; 0,5 ml de cada *primer* (*foward* e *reverse*) e 1 ml do cDNA previamente diluído 1:10 em água livre de DNase/RNase. O ciclo de amplificação utilizado foi: 50 °C/2 minutos, 95 °C/15 minutos, 50x (94 °C/30 segundos, Temperatura de anelamento do primer/tempo de anelamento do primer, 70 °C/30 segundos), 95 °C/1 minuto e a curva de dissociação até 95 °C. A temperatura de anelamento e o tempo de anelamento utilizados foram os seguintes: PRAME (57 °C/25 segundos), Calcineurina a beta (56 °C/25 segundos), D53 (59 °C/20 segundos), DAP12 (63 °C/25 segundos), SH3BGRL2 (59 °C/20 segundos), EZH2 (56 °C/25 segundos), EED (58 °C/25

segundos), UTX (56 °C/25 segundos), JMJD3 (56 °C/25 segundos) e TRAIL (59 °C/20 segundos).

Os produtos de amplificação foram detectados por eletroforese em géis de agarose a 2% para verificar se houve formação de bandas inespecíficas.

A Expressão do gene *PRAME* foi realizada por meio de ensaios em colaboração com o Dr. Rodrigo Proto-Siqueira e Prof. Dr. Marco Antonio Zago na Faculdade de Medicina de Riberão Preto (FMRP-USP). A amplificação desse gene foi feita em 40 ciclos, usando o TaqMan PCR Master Mix na plataforma SDS 5700. Os *primers* utilizados foram: pra2F-GAGGCCGCCTGGATCAG (*forward*) e pra2R-CGGCAGTTAGTTATTGAGAGGGTTT (*reverse*) e a *probe* utilizada foi: FAM-TCACGTGCCTGAGCAA-MGBQ.

### 3.6 Cálculo da expressão relativa e Análises estatísticas

Para o cálculo da expressão relativa foi utilizado o método de Livak, que consiste em subtrair o Ct (“threshold cycle”) do gene de interesse pelo Ct do gene *housekeeping* (GAPDH), obtendo-se o DCt, em seguida subtrai-se esse DCt pelo DCt do gene calibrador (gene cuja expressão será considerada 1), obtendo-se o DDcT e, por fim, calcula-se o  $2^{-DDcT}$ , que representa quantas vezes o gene de interesse está aumentado ou diminuído em relação ao calibrador. Quando o gene não apresenta Ct, por não amplificar nos 50 ciclos usados no experimento, considera-se o Ct como 50, para poder se calcular o  $2^{-DDcT}$ .

Para o cálculo do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ser válido é necessário demonstrar que as eficiências de amplificação do gene alvo e do gene constitutivo são aproximadamente iguais. Para isso, foi feita uma curva de diluição do cDNA utilizado e calculado o  $\Delta Ct$ . Para todos os primers utilizados, obteve-se eficiências de amplificação semelhantes entre os genes alvos e o GAPDH.

Para as análises estatísticas entre os grupos de pacientes nas diferentes fases da doença foi utilizado o método *One-way* ANOVA com o teste Kruskal-Wallis, pois se objetiva comparar mais de duas médias amostrais, com distribuição não paramétrica.

Para obtenção das correlações entre as expressões de dois genes nos pacientes foi calculado o coeficiente de correlação de Spearman, o valor de p “two-tailed”, com intervalo de confiança de 95%. Este teste foi escolhido porque se desejava verificar correlações entre variáveis intervalares absolutas com distribuição não paramétrica.

### **3.7 Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) e “Western-blot”**

Este método foi utilizado para detectar a expressão de proteínas de interesse (BCR-ABL, c-ABL, PRAME, EZH2, P-FOXO3a e actina), a fosforilação induzida pelo BCR-ABL e o bloqueio desta fosforilação induzido pelo Mesilato de Imatinibe (STI-571). Assim sendo, foram utilizadas  $1 \times 10^6$  células, tratadas ou não com o STI-571, essas células foram centrifugadas a 240 g, por 5 minutos a 4°C e foram lisadas em 100 µl de tampão de amostra (SDS 1x, “Sodium Dodecyl Sulphate”), seguido pelo aquecimento a 100 °C por 5 minutos e resfriamento no freezer -20 °C. O estoque destas amostras foi mantido a -20 °C. As proteínas presentes foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS PAGE - “Sodium dodecyl sulphate gel electrophoresis”), seguida de “Western-Blot”.

Após a preparação do gel de corrida na percentagem adequada para viabilizar a detecção de cada proteína estudada, 25 µl da amostra foram aplicados em cada poço e a eletroforese foi conduzida a 100 V.

Após a eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de 0,22 mm de PVDF (0,15 A, amperagem constante) por 4 a 5 horas. Após a transferência, a membrana foi deixada *overnight* na solução de bloqueio composta por 5% Leite em pó desnatado em TBS Tween (150 mM NaCl; 50 mM Tris-Cl; 0,05% Tween 20); 0,1% Azida para a maioria dos anticorpos utilizados, à exceção do antifosfotirosina, onde foi utilizada uma solução composta por 5% BSA (“Bovine Serum Albumin”) em TBS Tween, 0,1% Azida. Em seguida as membranas foram incubadas por 12 a 18 horas a 4 °C com o anticorpo primário. Após a marcação a membrana foi lavada três vezes em tampão TBS-tween e incubada por 1 hora, à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário apropriado, conjugado a peroxidase. Após a marcação, a membrana foi submetida à lavagem por três vezes consecutivas e a detecção dos imunocomplexos foi feita pelo método de

quimioluminescência, ECL (kit ECL Plus, Amersham). Após esse procedimento a membrana foi exposta a um filme de autoradiografia (Kodak) e as bandas analisadas quanto ao peso molecular das proteínas investigadas. O tempo de exposição das membranas ao filme dependeu da intensidade de marcação e variou de 10 segundos a 30 minutos.

Os anticorpos utilizados neste trabalho foram:

Anti-PRAME: Abcam (Número de catálogo: ab32185)

Anti-EZH2: Cell Signaling (Número de catálogo: 4905), gentilmente cedido pela Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis (UNIFESP)

Anti- $\beta$ -Actina: Sigma (Número de catálogo: A 5441)

Anti-fosfo-FOXO3a: Detecta FOXO3a fosforilado em resíduos de serina (318 e 321). Cell Signaling (Número de catálogo: 9465)

### **3.8 Cepas bacterianas**

Células competentes das linhagens bacterianas DH10.B e DH5- $\alpha$  foram utilizadas para as transformações dos plasmídeos. Para o cultivo destas linhagens bacterianas foi utilizado o meio de cultura Luria Betani (LB) líquido e/ou sólido, contendo, quando necessário, ampicilina (concentração final 100  $\mu$ g/ml).

### **3.9 Plasmídeos**

Os plasmídeos que foram utilizados no desenvolvimento desse trabalho são:

pSR $\alpha$ MSVtkneo.BCR-ABL: plasmídeo retroviral, contendo o gene *BCR-ABL*, gentilmente cedido pelo Dr. Owen Witte (*Howard Hughes Medical Institute, University of California Los Angeles, CA, USA*).

pRS: Plasmídeo retroviral gentilmente cedido pelo Dr. René Bernards (*Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands*). Este plasmídeo possui um gene de resistência à puromicina que permite selecionar as células infectadas e foi utilizado como controle (vetor vazio) nos ensaios com os plasmídeos pRS-PRAME, pRS-EZH2 3 e pRS-EZH2 4.

pRS-PRAME: Plasmídeo retroviral gentilmente cedido pelo Dr. René Bernards (*Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands*). Este plasmídeo foi utilizado para produzir shRNA a fim de se silenciar a expressão de *PRAME*.

pRS-EZH2 #3: Plasmídeo retroviral gentilmente cedido pelo Dr. René Bernards (*Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands*). Este plasmídeo foi utilizado para produzir shRNA a fim de se silenciar a expressão de *EZH2*.

pRS-EZH2 #4: Plasmídeo retroviral gentilmente cedido pelo Dr. René Bernards (*Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands*). Este plasmídeo foi utilizado para produzir shRNA a fim de se silenciar a expressão de *EZH2*.

pMX-IRES-EGFP: plasmídeo retroviral bicistrônico que, por conter o elemento IRES (“internal ribosome entry site”), permite a expressão da proteína repórter EGFP e de um gene de interesse nele clonado, a partir do mesmo transcrito. No caso do presente trabalho esse plasmídeo foi utilizado para os ensaios de eficiência de transfecção e infecção. Esse plasmídeo foi gentilmente cedido pelo Dr. Douglas Green (*La Jolla Institute for Allergy and Immunology, San Diego, CA, EUA*).

### **3.10 Recuperação dos plasmídeos recebidos**

Os plasmídeos pRS, pRS-PRAME, pRS-EZH2 3 e pRS-EZH2 4, cedidos pelo Dr. René Bernards (*Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands*) foram recebidos em papel filtro. Para recuperar estes plasmídeos foi cortado o pedaço do papel onde se encontrava o plasmídeo e adicionado 50 ml de Tris 10 mM, pH 7,6; vórtex e deixado re-hidratar por 5 minutos. Após uma rápida centrifugação, o sobrenadante pôde ser usado para transformar bactéria competente.

### **3.11 Transformação bacteriana**

As transformações foram feitas a partir de bactérias competentes das linhagens DH5- $\alpha$  (Life Technology) e DH10B, utilizando-se o método do choque térmico. Este procedimento consiste na adição do plasmídeo de interesse às bactérias competentes, seguido de incubação no gelo por 30 minutos e um choque térmico a 42 °C por 45 segundos, para permitir que o plasmídeo entre na bactéria. Foi feita uma incubação por uma hora, em meio sem antibiótico, para a expressão do gene de resistência ao antibiótico. Em seguida, essa solução foi semeada em placa contendo o antibiótico de seleção e cultivada overnight, para selecionar as bactérias transformadas.

### **3.12 Purificação de DNA plasmidial**

Para a purificação de DNA plasmidial foi adotado o procedimento padrão, que consiste em uma adaptação do protocolo de lise alcalina empregado para preparações em pequena escala. Assim sendo, foram utilizadas colunas QIAGEN para MidiPrep. Num primeiro momento foram utilizados, nesta ordem, os reagentes 1 (50 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA e 100  $\mu$ g/ml de RNase), 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) e 3 (3,0 M acetato de potássio, pH 5.5), para que haja a lise bacteriana e a precipitação das proteínas. Após a lise das bactérias, o DNA é ligado a uma resina de sílica, sendo posteriormente lavado e filtrado com uma solução de lavagem composta de 1.0 M NaCl, 50 mM MOPS e 15% de etanol 100%, diluída em volume igual de etanol (100%). No final o plasmídeo foi eluído em 50  $\mu$ l de um tampão de baixo sal (TE: 5.0 mM Tris-Cl, 0.1 mM EDTA).

### **3.13 Transfecção celular**

Com o intuito de se transfectar as células 293phoenix ampho foi utilizado o método do fosfato de cálcio. Para a obtenção de uma confluência de 50-80%, dois dias antes da transfecção,  $2 \times 10^6$  células foram distribuídas em placas de cultura de 10 cm. No dia da transfecção, de 2-4 horas antes de acrescentar o precipitado, foi



adicionado um volume de 9 ml de meio DMEM completo (suplementado com soro Defined). O Precipitado foi obtido por adição de 10 µg do plasmídeo de interesse em 50 µl de 2,5 M CaCl<sub>2</sub>. Acrescentou-se a esta solução que contém DNA, 500 µl do tampão 2x HeBS (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e o volume foi completado para 1ml com água miliQ. Após isso, a solução foi agitada gentilmente por 5 segundos e, então, incubada por 30 minutos a temperatura ambiente, para que seja formado o precipitado que, em seguida, foi transferido para a placa de cultura.

As células 293phoenix foram transfectadas apenas com o plasmídeo de interesse, tendo em vista que essa linhagem possui as proteínas GAG, POL e ENV para a produção de retrovírus.

As células foram deixadas na estufa a 37 °C por 6 horas, em seguida troca-se o meio de cultura por meio novo e foram mantidas por 24 horas em 10 ml de meio DMEM completo. Após este período, as amostras que foram utilizadas como controle de eficiência de transfecção (pMX-IRES-EGFP) foram tripsinizadas (Tripsina 0,25%) e separadas para análise no citômetro de fluxo. O sobrenadante das células 293phoenix amphi transfectadas com o plasmídeo de interesse foi recolhido para ser utilizado na infecção das células-alvo descritas neste projeto.

### **3.14 Infecção viral**

Antes de utilizar o sobrenadante para a infecção, este foi centrifugado a 500 g para que restassem somente as partículas virais, impedindo, assim, a contaminação da cultura alvo com as células empacotadoras.

As células-alvo foram, então, incubadas por 4-18 horas na estufa na presença do sobrenadante viral e 8µg/ml de polibrene, uma molécula pequena carregada positivamente que se liga à superfície celular neutralizando sua carga. Esse composto parece facilitar a ligação das glicoproteínas virais com os seus receptores presentes na membrana celular, aumentando a eficiência de infecção. 48 horas após a infecção as células infectadas foram selecionadas pela expressão de EGFP, por citometria de fluxo ou por seleção com antibiótico.

### **3.15 Avaliação e quantificação de morte celular por citometria de fluxo**

Uma amostra da ordem de  $10^5$  células foi submetida à centrifugação por 5 min/210 g e após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 300  $\mu$ l de solução fluorocrômica (HFS, hypotonic fluorochromic solution - 0,1% citrato de sódio, 0,1% Triton X-100, 50  $\mu$ g/ml iodeto de propídeo) para a determinação do nível de fragmentação do DNA, através da análise do ciclo celular por citometria de fluxo de acordo com o protocolo descrito por NICOLETTI e colaboradores (1991). Os núcleos definidos como apoptóticos, são hipodiplóides e, por isso, quando é analisado o ciclo celular, se encontram à esquerda do pico G0-G1.

### **3.16 Meta-análises**

As meta-análises de bancos de dados públicos de microarrays foram realizadas utilizando-se a página da web <[www.oncomine.org](http://www.oncomine.org)>. Foram utilizadas os algoritmos e análises estatísticas previamente descritos (RHODES *et al.*, 2004).

Neste banco de dados estão reunidos diversos microarrays públicos de amostras de tumores humanos. As análises de expressão diferencial foram realizadas usando-se teste t “two-sided” para quantificar a diferença de expressão e “false Discovery rates” para quantificar a significância (valor de p corrigido) (RHODES *et al.*, 2004).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Confirmação dos resultados do microarray

Existem duas abordagens para a confirmação dos resultados de Microarray: *in silico* ou análise laboratorial (CHUAQUI *et al.*, 2002). A primeira compara os resultados do Microarray com resultados previamente disponíveis na literatura, permitindo, assim, a validação sem necessidade de mais experimentos. Como as linhagens que foram empregadas nos ensaios de Microarray foram desenvolvidas no nosso laboratório, não existindo na literatura resultados prévios de Microarray comparando estas linhagens e como não existia na literatura resultados de Microarray comparando linhagens celulares *BCR-ABL* positiva versus *BCR-ABL* negativas, esta abordagem *in silico* não foi possível. Assim, foi necessária uma abordagem experimental para confirmar estes dados. Entre as técnicas disponíveis estão: RT-PCR, RT-PCR em tempo real ou *northern blot*. A técnica de RT-PCR em tempo real foi escolhida para validar os resultados, tendo em vista ser um método empregado mais usualmente e que, uma vez padronizado, é rápido, requer pouca amostra, e é bastante sensível.

Dessa forma, foram realizadas reações de RT-PCR em tempo real para os genes selecionados (tabela 1) conforme descrito na seção Materiais e Métodos para as linhagens HL-60 e HL60.*BCR-ABL* e calculado a expressão relativa pelo método descrito por Livak, estabelecendo-se um valor arbitrário para a HL60 como 1 (um).

Foram confirmados os resultados de cDNA *Microarray* para todos os genes estudados. Para os genes que tiveram sua expressão diminuída pelo *BCR-ABL*, foi observada uma diminuição de 1,44 vezes na expressão de *CALCINEURINA A BETA* (Figura 04) e de 1,58 vezes na expressão de *DAP12* (Figura 05) na linhagem *BCR-ABL*<sup>+</sup> quando comparada a *BCR-ABL*<sup>-</sup>.

Tabela 1: Identificação dos genes escolhidos.

#NCBI	Gene	Sinônimos	Aumento*
NM_206953.1	<i>PRAME</i>	<i>MAPE, OIP4 (OPA-INTERACTING PROTEIN 4)</i>	13,45
NM_021132.1	<i>PPP3CB</i>	<i>Calcineurina A Beta, Calcineurina A2</i>	0,25
NM_003332	<i>TYROBP</i>	<i>DAP12</i>	0,053
NM_001003396	<i>TPD52L1</i>	<i>D53</i>	159,78
NM_031469	<i>SH3BGRL2</i>		14,93

\* Os dados correspondem a quantas vezes o gene está aumentado em HL-60.BCR-ABL em relação à HL-60.

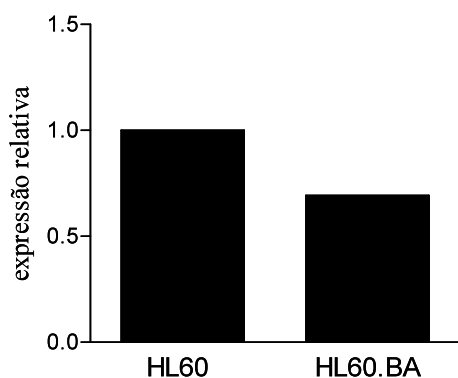


Figura 4: Expressão relativa de CALCINEURINA A BETA em HL60 e HL60.BA obtida por Real Time PCR.

Para os genes que tiveram sua expressão aumentada pelo BCR-ABL, foi observado um aumento de aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  vezes na expressão de *D53* em HL60 BCR-ABL<sup>+</sup> (HL60.BA) quando comparada com a HL-60 BCR-ABL<sup>-</sup> (Figura 6), um aumento de aproximadamente  $4,3 \times 10^7$  vezes na expressão de *SH3BGRL2* (Figura 7), e um aumento de 48,33 vezes na expressão de *PRAME* (Figura 8). É importante ressaltar que este valor excessivamente alto para a expressão de *SH3BGRL2* nas células BCR-ABL<sup>+</sup> deve-se ao fato de não haver expressão deste gene na HL-60, sendo considerado, para fins matemáticos, um Ct de 50 nesta linhagem. Já no caso do *D53*, observa-se alguma expressão na HL60, porém a HL60.BA apresenta uma expressão extremamente maior.

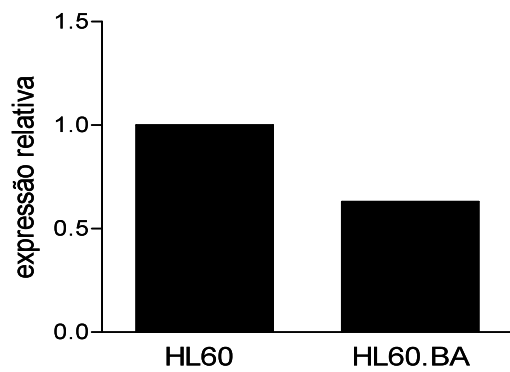


Figura 5: Expressão relativa de DAP12 em HL60 e HL60.BA obtida por Real Time PCR.

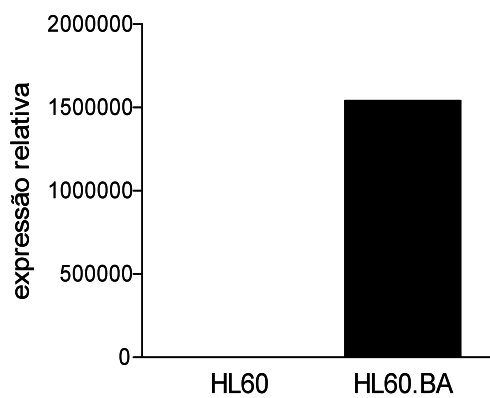


Figura 6: Expressão relativa de D53 em HL60 e HL60.BA obtida por Real Time PCR.

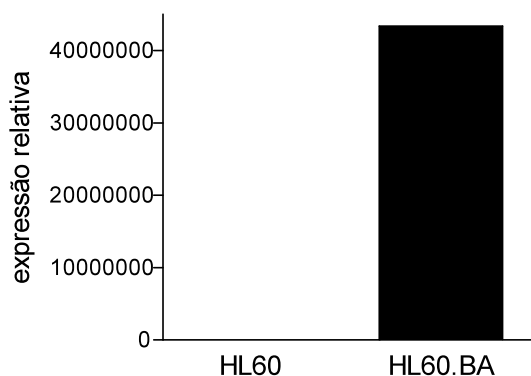


Figura 7: Expressão relativa de SH3BGR2 em HL60 e HL60.BA obtida por Real Time PCR.

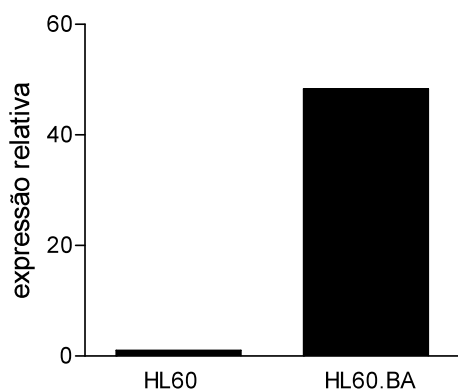


Figura 8: Expressão relativa de PRAME em HL60 e HL60.BA obtida por Real Time PCR.

#### 4.2 Validação dos resultados em outras linhagens celulares

Após a confirmação da modulação destes genes por BCR-ABL, no contexto celular de HL-60, é necessário verificar estes resultados em outros contextos celulares, para avaliar se este perfil de expressão é uma característica universal da transformação maligna por BCR-ABL ou um achado acidental em HL60.BA. Assim, utilizamos as linhagens THP1.BA, SKW6.4.BA e HeLa.BA, transfectadas com o plasmídeo pSR $\alpha$ MSVtkneo.BCR-ABL, expressando o oncogene *BCR-ABL* e comparamos a expressão dos genes em questão com suas contrapartes selvagens (THP1, SKW6.4 e HeLa). Cabe aqui ressaltar que na seleção dos genes

diferencialmente expressos no Microarray, foram selecionados genes diferencialmente expressos na HL60.BA versus HL60, e HeLa.BA versus HeLa sendo que estes genes não eram diferencialmente expressos na SKW6.4.BA versus SKW6.4. Foi escolhido este critério porque a presença de BCR-ABL gera uma maior resistência à apoptose apenas nas linhagens HL60.BA e HeLa.BA, não alterando a resistência à apoptose na SKW6.4.BA. Assim, é coerente esperar que o perfil de expressão destes genes nas linhagens SKW6.4 versus SKW6.4.BA seja diferente em relação às outras linhagens.

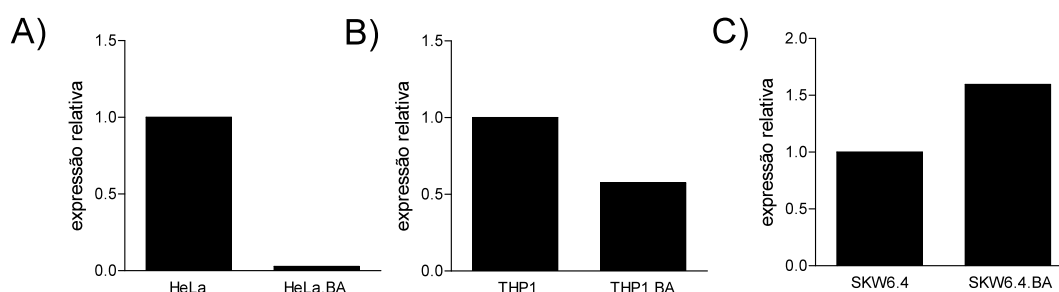


Figura 9: Expressão relativa de CALCINEURINA A BETA em A) HeLa X HeLa.BA; B) THP1 X THP1.BA e C) SKW6.4 X SKW6.4.BA.

Para o gene *CALCINEURINA A BETA*, observa-se uma redução de 35,38 vezes na sua expressão em HeLa.BA quando comparada à HeLa, e de 1,74 vezes na THP1.BA quando comparada à THP1, além de um aumento de 1,59 vezes na SKW6.4.BA quando comparada à SKW6.4 (Figura 9).

Com relação ao gene *DAP12*, observa-se uma redução de 17,27 vezes na sua expressão em HeLa.BA quando comparada à HeLa, e de 2,06 vezes na THP1.BA quando comparada à THP1, e uma diminuição de 4,47 vezes na SKW6.4.BA quando comparada à SKW6.4 (Figura 10). Esses resultados reforçam a universalidade da redução da expressão de *DAP12* na transformação mediada por BCR-ABL.

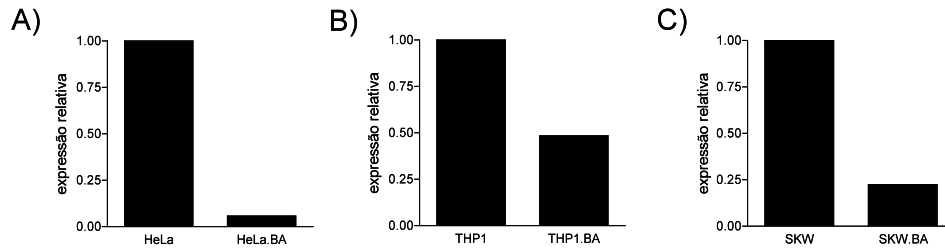


Figura 10: Expressão relativa de DAP12 em A) HeLa X HeLa.BA; B) THP1 X THP1.BA e C) SKW6.4 X SKW6.4.BA.

No gene *D53* observam-se aumentos de 1,49 vezes na sua expressão em HeLa.BA quando comparado à HeLa, 15,72 vezes em THP1.BA quando comparado à THP1, e uma diminuição de 1.84 vezes na SKW6.4.BA quando comparado à SKW6.4 (Figura 11).

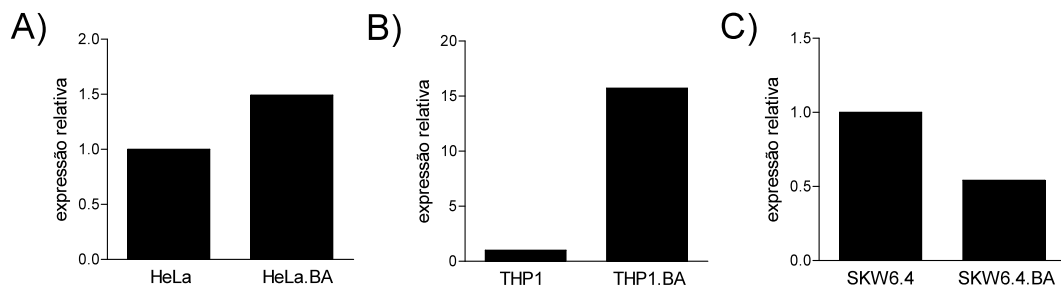


Figura 11: Expressão relativa de D53 em A) HeLa X HeLa.BA; B) THP1 X THP1.BA e C) SKW6.4 X SKW6.4.BA.

Não foi observada a expressão do gene *SH3BGRL2* em THP1, THP1.BA, SKW6.4 e SKW6.4.BA, e observou-se uma diminuição de apenas 1,15 vezes na sua expressão em HeLa.BA quando comparada à HeLa (Figura 12).



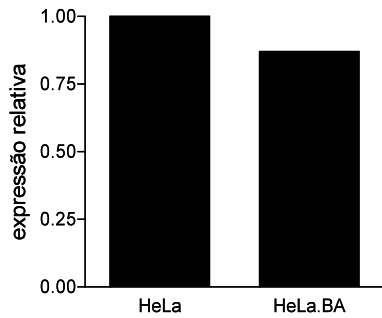


Figura 12: Expressão relativa de SH3BGRL2 em HeLa X HeLa.BA. Não foi observada a expressão deste gene em THP1, THP1.BA, SKW6.4 e SKW6.4.BA.

No gene *PRAME* observa-se uma redução de 1,33 vezes na sua expressão em HeLa.BA quando comparada à HeLa selvagem, uma expressão igual em THP1.BA, e THP1 e uma redução de 1,67 vezes na SKW6.4.BA quando comparada à SKW6.4 (Figura 13).

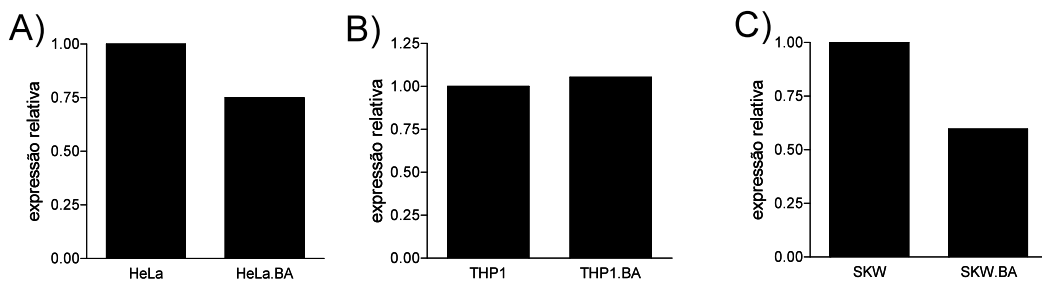


Figura 13: Expressão relativa de PRAME em A) HeLa X HeLa.BA; B) THP1 X THP1.BA e C) SKW6.4 X SKW6.4.BA.

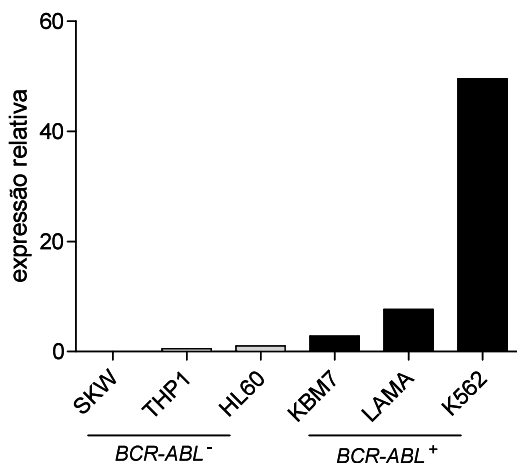


Figura 14: Expressão relativa de PRAME em células que não expressam o BCR-ABL e em células que o expressam de forma constitutiva.

Porém, ao se comparar os níveis de expressão de *PRAME* em células leucêmicas, é possível observar que as células *BCR-ABL*<sup>+</sup> apresentam uma maior expressão deste gene do que as células *BCR-ABL*<sup>-</sup> (Figura 14).

Com o intuito de avaliar se a tirosina-quinase de BCR-ABL tem influência sobre a expressão de *PRAME*, foram realizados tratamentos com 10mM de STI571 nas linhagens celulares HL60 (controle), HL60.BA (transfectada com o *BCR-ABL*) e K562 (expressão constitutiva de *BCR-ABL*), por 8 e 24 horas. Como controle do experimento foram realizados Western-Blots para detecção da expressão das proteínas c-ABL, que marca também o BCR-ABL; para fosfotirosina que marca as proteínas fosforiladas em tirosina, a fim de se verificar a eficácia do tratamento; e para actina, como controle do experimento (Figura 15). Como esperado, verificou-se a ausência da banda para BCR-ABL nas células HL60 e a presença nas células HL60.BA e K562. Nota-se também uma ausência de proteínas fosforiladas em tirosina nas células HL-60, uma grande quantidade destas proteínas nas células *BCR-ABL*<sup>+</sup> e redução pós-tratamento com STI571, mostrando a eficácia do tratamento na redução da atividade tirosina-quinase de BCR-ABL.

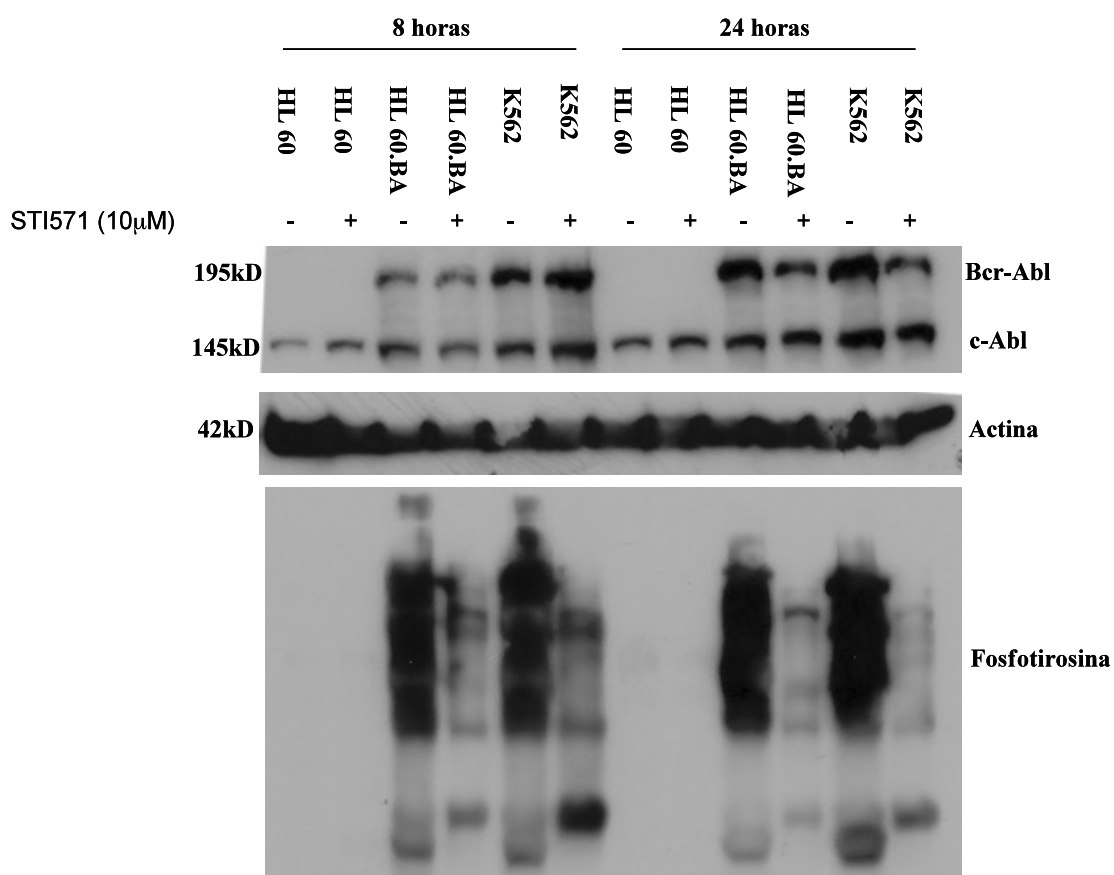


Figura 15: Western-blot de HL60, HL60.BA e K562 tratadas ou não com 10mM de STI571, marcadas para c-ABL, Actina e fosfotirosina.

Não foram observadas diferenças consistentes entre as células *BCR-ABL*<sup>+</sup> tratadas ou não com STI571, para a expressão de *PRAME* (Figura 16), sugerindo que caso ocorra uma regulação por BCR-ABL neste gene, esta é independente da sua atividade tirosina-quinase, ou que a via que gerou estas alterações seja dependente de BCR-ABL, porém mantém-se ativa por um período maior que 24 horas sem a atividade tirosina-quinase.

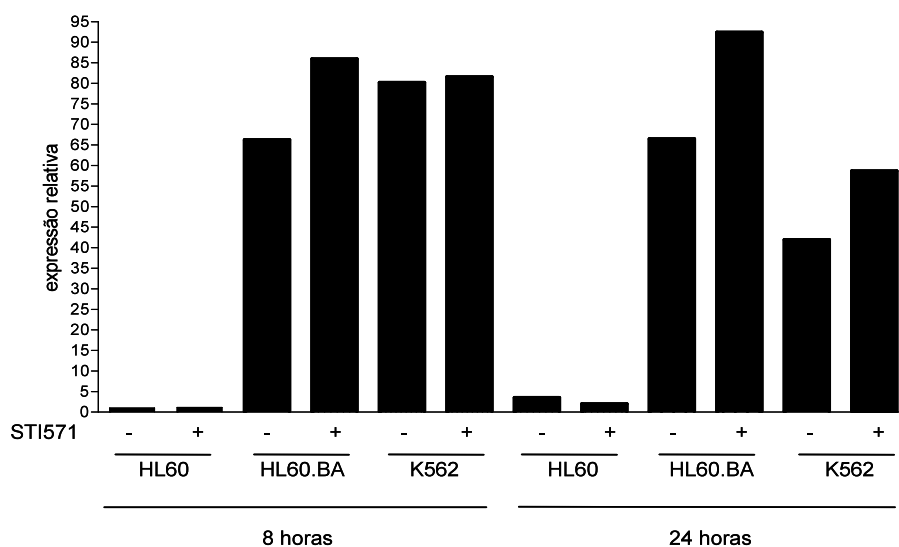


Figura 16: Expressão relativa de PRAME em HL60, HL60.BA e K562 tratadas ou não com 10mM de STI571 por 8 ou 24 horas.

#### 4.3 Quantificação da expressão gênica em pacientes com LMC

Com intuito de avaliar se a regulação destes genes por BCR-ABL pode ter alguma relevância na progressão da leucemia mielóide crônica (LMC), foram realizadas reações de RT-PCR em tempo real para os genes em questão em amostras de cDNA obtidas a partir de sangue periférico de pacientes nas diversas fases da doença e em doadores saudáveis. Estes dados serão usados, posteriormente, para tentar associar a variação da expressão destes genes com achados clínico-laboratoriais, a fim de tentar se estabelecer futuros marcadores de prognóstico.

Até esta fase do projeto, foram usadas amostras de 11 pacientes na fase crônica, 10 na fase acelerada, 11 na fase blástica, 10 em remissão citogenética completa e 10 controles saudáveis, para a análise de expressão dos genes *CALCINEURINA A BETA*, *DAP12*, *D53* e *SH3BGRL2*. Para o gene *PRAME*, foram usadas amostras de 15 pacientes na fase crônica, 12 na fase acelerada, 15 na fase blástica, 8 em remissão citogenética completa e 9 controles saudáveis.

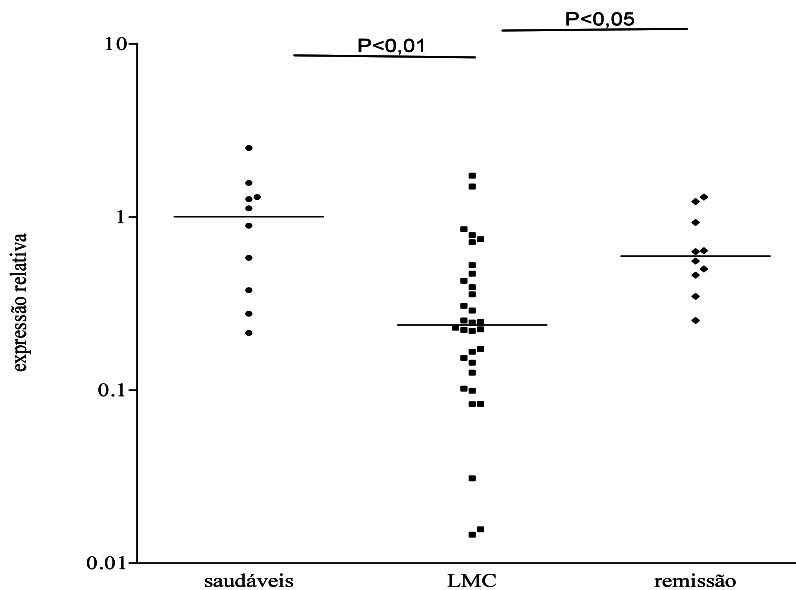


Figura 17: Expressão relativa de CALCINEURINA A BETA em indivíduos saudáveis, pacientes com LMC (nas fases crônica, acelerada e blástica) e em remissão citogenética completa.

Inicialmente os dados foram divididos em três subgrupos: saudáveis (indivíduos saudáveis), LMC (pacientes com LMC na fase crônica, acelerada e blástica) e remissão (remissão citogenética completa), para analisar se a presença do BCR-ABL altera o padrão de expressão dos genes estudados na LMC. Em seguida, os dados foram separados em 5 grupos: controle, crônica, acelerada, blástica e remissão, a fim de estudar se a modulação destes genes esta associada com a progressão da doença.

Para o gene *CALCINEURINA A BETA*, observa-se uma clara redução na expressão nos indivíduos doentes em relação aos saudáveis, e nota-se que os indivíduos em remissão citogenética apresentam um padrão de expressão mais próximo aos saudáveis (Figura 17), mostrando uma possível modulação negativa deste gene pelo BCR-ABL, e também uma recuperação dos níveis de calcineurina quando o BCR-ABL está inibido. Porém, esta diminuição de expressão não se acentua conforme a doença progride, tendo em vista que só foi observada uma

diferença significativa entre o grupo controle e o grupo de pacientes na fase crônica (Figura 18).

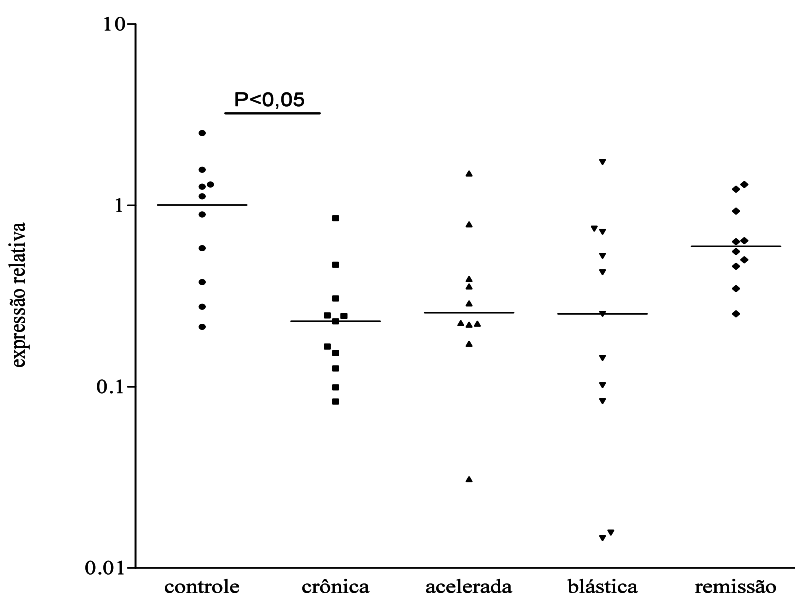


Figura 18: Expressão relativa de CALCINEURINA A BETA em pacientes com LMC nas diferentes fases da doença e em indivíduos saudáveis.

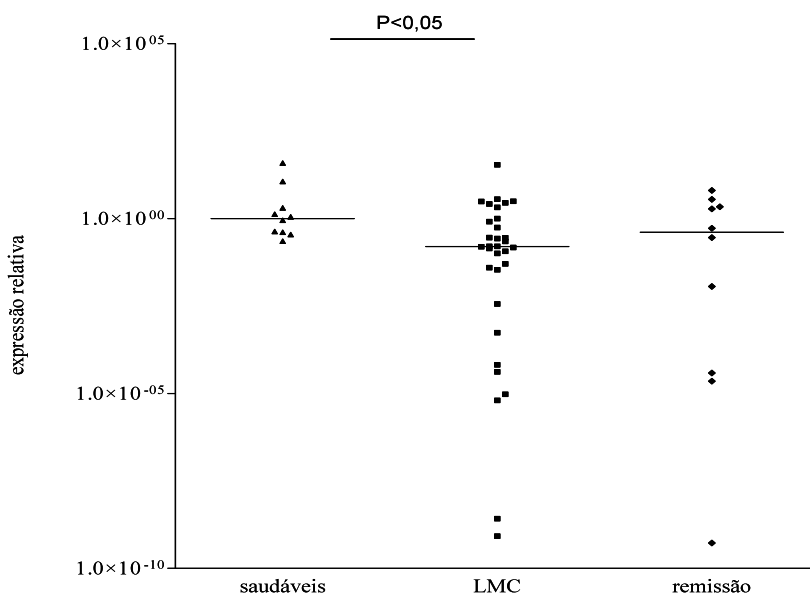


Figura 19: Expressão relativa de DAP12 em indivíduos saudáveis, pacientes com LMC (nas fases crônica, acelerada e blástica) e em remissão citogenética completa.

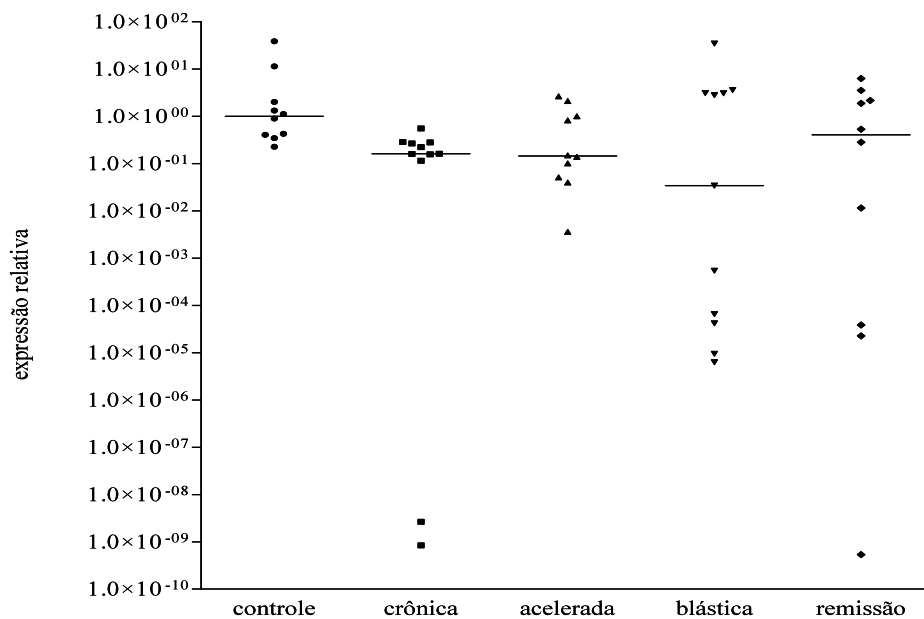


Figura 20: Expressão relativa de DAP12 em pacientes com LMC nas diferentes fases da doença e em indivíduos saudáveis.

Ao se avaliar o perfil de expressão do gene *DAP12*, observa-se uma significativa ( $p < 0,05$ ) redução na sua expressão em indivíduos com LMC, quando comparados aos indivíduos saudáveis, porém os indivíduos em remissão não apresentaram um padrão de expressão semelhante ao controle, apresentando um padrão mais heterogêneo, com uma amplitude de valores muito grande e sem diferença significativa com os outros grupos (Figura 19). Neste caso, também não foi possível observar nenhuma correlação entre a expressão deste gene e a progressão da doença (Figura 20).

Para o gene *D53* não foi observada nenhuma diferença significativa entre os indivíduos com LMC, saudáveis e em remissão citogenética completa (Figura 21), nem entre as diferentes fases da doença (Figura 22). Assim, apesar deste gene ter sua expressão aumentada nas células HL60.BA quando comparadas à HL60, ele não parece ter o mesmo comportamento *in vivo*, em pacientes com LMC.

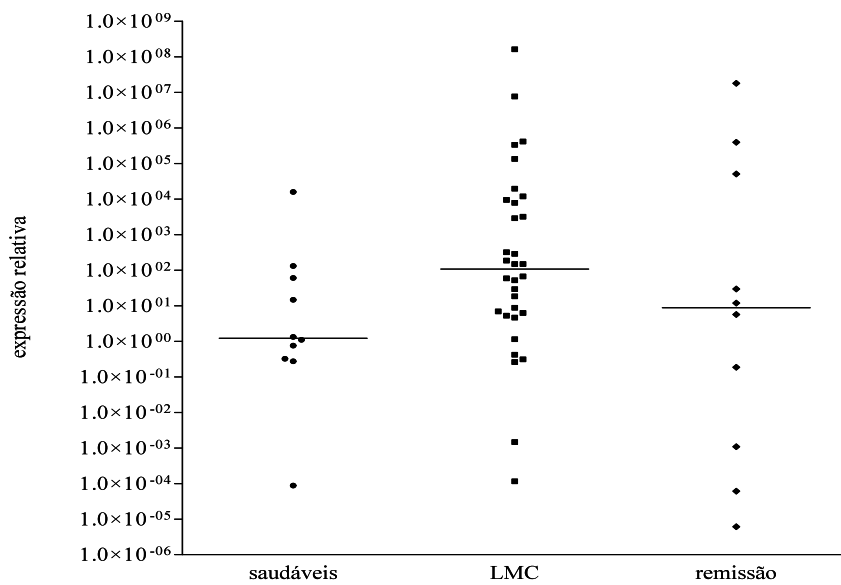


Figura 21: Expressão relativa de D53 em indivíduos saudáveis, pacientes com LMC (nas fases crônica, acelerada e blástica) e em remissão citogenética completa.

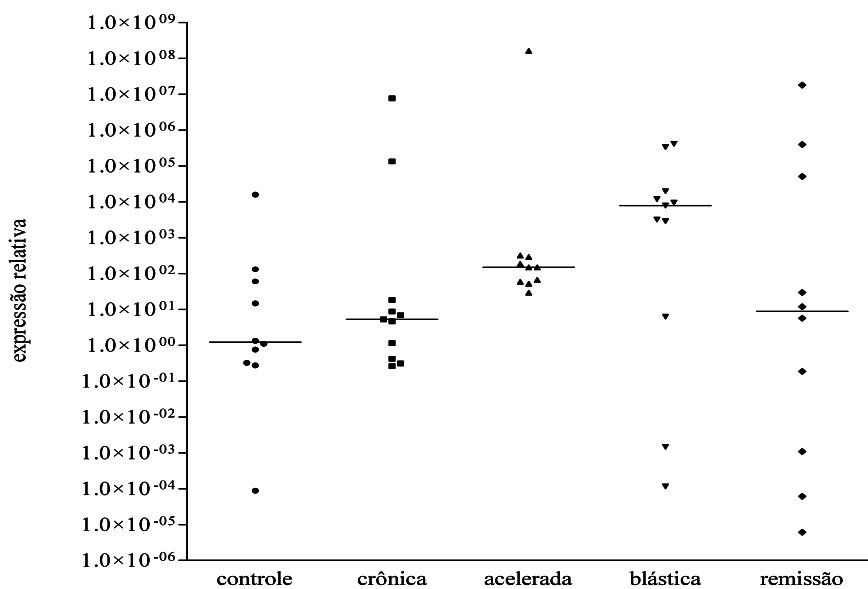


Figura 22: Expressão relativa de D53 em pacientes com LMC nas diferentes fases da doença e em indivíduos saudáveis.



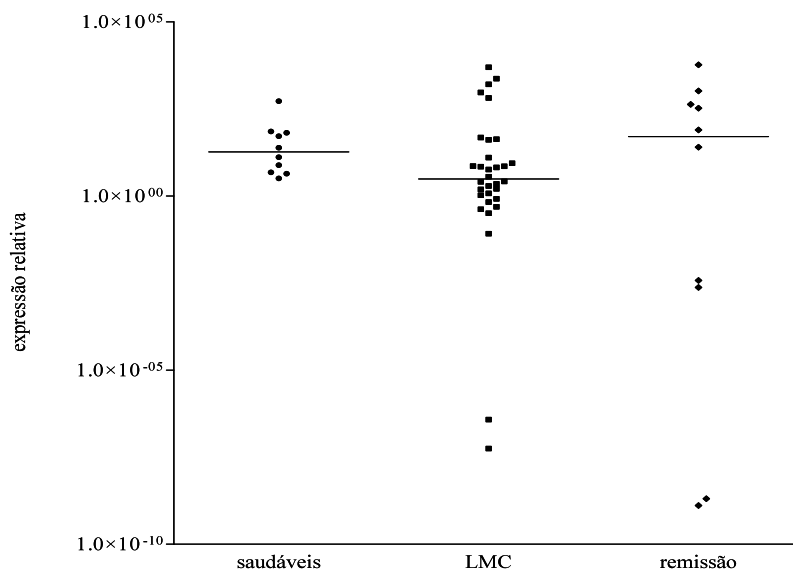


Figura 23: Expressão relativa de SH3BGRL2 em indivíduos saudáveis, pacientes com LMC (nas fases crônica, acelerada e blástica) e em remissão citogenética completa.

Também não foi observada nenhuma diferença significativa na expressão de *SH3BGRL2* entre os indivíduos controle, pacientes com LMC e indivíduos em remissão citogenética completa (Figura 23). Esse gene também não apresentou qualquer associação com a progressão da doença, tendo em vista que nenhuma diferença estatística pode ser observada entre as diferentes fases, controle e remissão (Figura 24).

O *PRAME* foi o gene que apresentou resultados mais promissores nesta fase do projeto, sendo observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na sua expressão em pacientes com LMC, quando comparados aos indivíduos saudáveis. Observou-se, também, uma tendência na redução da expressão nos indivíduos em remissão quando comparados aos doentes (Figura 25), esta diferença não foi estatisticamente significativa, porém é possível que ao aumentar o número de amostras, principalmente no grupo remissão (atualmente com 8 indivíduos), este resultado seja significativo. Outro resultado bastante interessante é observado quando se avalia a expressão deste gene nas diferentes fases, observando-se uma associação bastante clara entre o aumento de sua expressão e a progressão da LMC (Figura 26), observa-se um significativo aumento na crise blástica, tanto em relação ao controle ( $p < 0,001$ )

quanto em relação à fase crônica ( $p < 0,01$ ), além de uma diminuição significativa na remissão quando comparada à crise blástica ( $p < 0,01$ ).

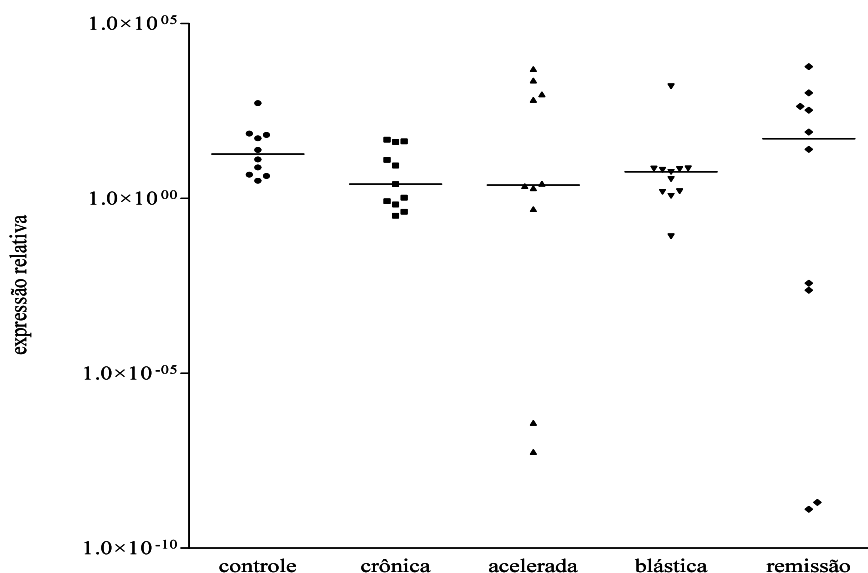


Figura 24: Expressão relativa de SH3BGRL2 em pacientes com LMC nas diferentes fases da doença e em indivíduos saudáveis.

Tendo em vista que a expressão de *PRAME* aumenta com a progressão da doença e sabendo-se que a expressão de *BCR-ABL* também aumenta com a progressão da doença (BARNES *et al.*, 2005), foi avaliada a correlação entre a expressão destes dois genes entre as amostras de pacientes presentes neste trabalho (Figura 26). Para essa correlação, foram utilizados os valores de expressão relativa de *PRAME* em log na base 2 e os valores de expressão relativa de *BCR-ABL*, já obtidos para estes pacientes em outros projetos do laboratório. É possível observar uma correlação positiva, forte e estatisticamente significativa, com um coeficiente de Spearman de 0,6117.

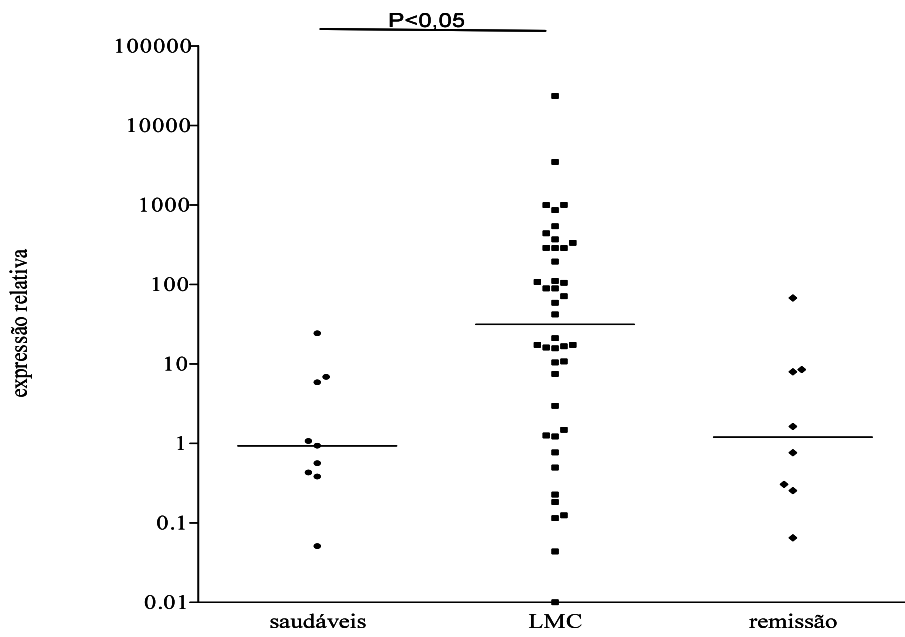


Figura 25: Expressão relativa de PRAME em indivíduos saudáveis, pacientes com LMC (nas fases crônica, acelerada e blástica) e em remissão citogenética completa.

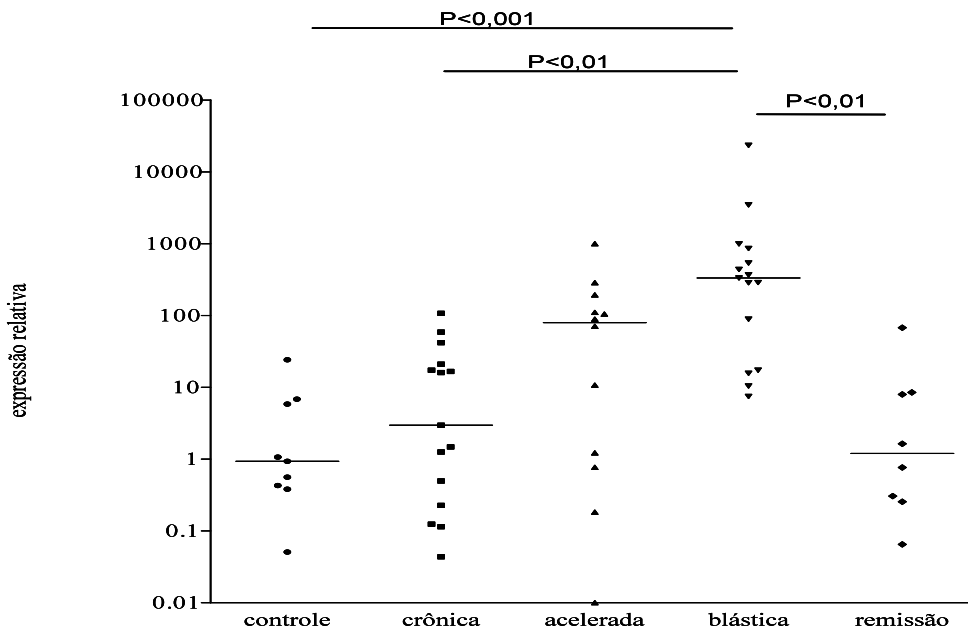


Figura 26: Expressão relativa de PRAME em pacientes com LMC nas diferentes fases da doença e em indivíduos saudáveis.

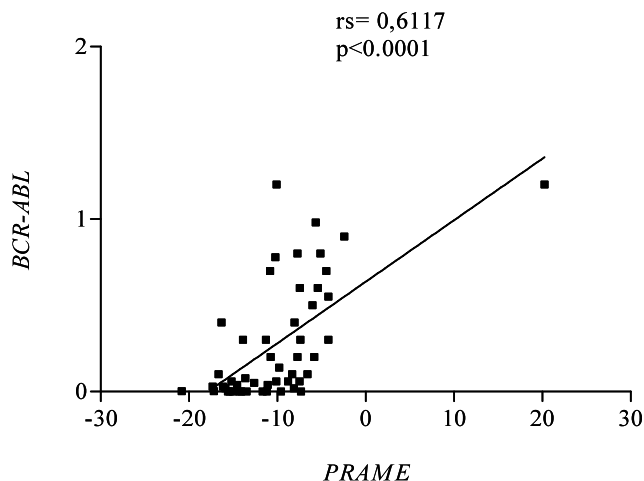


Figura 27: Correlação positiva entre a expressão de *PRAME* e de *BCR-ABL* em amostras de indivíduos saudáveis, pacientes nas três fases da LMC e em indivíduos em remissão citogenética completa.

#### 4.4 O aumento da expressão de *PRAME* esta correlacionada com a inibição da expressão de *TRAIL*

Tendo em vista o aumento da expressão de *PRAME* em células *BCR-ABL*<sup>+</sup> e que este gene está aumentado conforme a Leucemia Mielóide Crônica progride surge a questão se este gene tem uma função na transformação por *BCR-ABL* e/ou na progressão da doença, ou se seria um mero marcador da progressão. Dados recentes indicam que o *PRAME* possa ter uma função na progressão tumoral, por ser um repressor dominante do receptor do ácido retinóico (RAR), interferindo, assim, na via do ácido retinóico (EPPING e BERNARDS, 2006). O ácido retinóico induz a expressão de diversos genes alvos, após se ligar ao RAR. Entre estes alvos, encontram-se genes relacionados à diferenciação celular, controle do ciclo celular e apoptose, assim, o bloqueio desta via é benéfico para as células tumorais (Figura 3). Porém, o modelo usado para descrever esta função foi o melanoma, não existindo ainda evidências que esta proteína tenha esta função em células *BCR-ABL* positivas.

Com o objetivo de avaliar se a alta expressão de *PRAME* poderia ter um papel na fisiopatologia da LMC, foi realizada uma análise *in silico* dos dados de Microarray, buscando-se genes que apresentaram uma expressão reduzida nas células HL60.BA e HeLa.BA em relação às suas contrapartes e, dentre estes genes, quais apresentam

uma regulação pelo ácido retinóico. Foi observado que o gene *TRAIL* (também conhecido como *TNFSF10* ou *APO2L* e com o número no NCBI: NM\_003810) apresentou uma menor expressão nestas células. Sabe-se que o *TRAIL* apresenta uma maior expressão na presença do ácido retinóico (ALTUCCI *et al.*, 2001) e, em dados não publicados do nosso laboratório, é possível observar uma menor expressão deste genes em pacientes com LMC, apresentando uma diminuição de sua expressão conforme a doença progride.

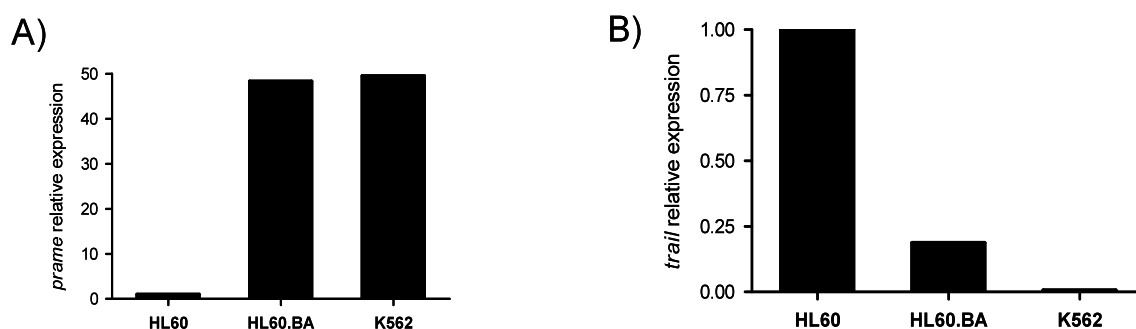


Figura 28: Células com alta expressão de PRAME apresentam baixa expressão de TRAIL. A) Expressão relativa de PRAME em HL60, HL60.BA e K562 obtida por Real Time PCR. B) Expressão relativa de TRAIL em HL60, HL60.BA e K562 obtida por Real Time PCR.

Ao analisarmos a expressão de *PRAME* e de *TRAIL* em células *BCR-ABL* positivas e negativas, observamos uma maior expressão de *PRAME* nas células positivas enquanto o *TRAIL* apresenta uma maior expressão nas células negativas (Figura 28).

Em seguida, foi verificado que a alta expressão de *PRAME* está correlacionada com a baixa expressão de *TRAIL* em pacientes, pois é possível observar uma correlação inversa, moderada, estatisticamente significativa e com coeficiente de Spearman de -0,497 (Figura 29).

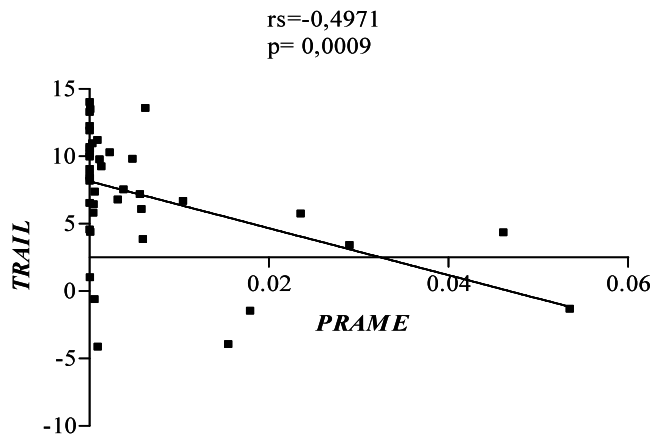


Figura 29: Correlação negativa entre a expressão de PRAME e de TRAIL em amostras de indivíduos saudáveis, pacientes nas três fases da LMC e em indivíduos em remissão citogenética completa.

#### 4.5 Análise do promotor de *TRAIL*

A fim de verificar se no promotor do gene *TRAIL* existe algum elemento responsivo ao ácido retinóico (RARE), foi utilizado o programa Gene2Promoter, disponível na página da web: [www.genomatix.de](http://www.genomatix.de). Como organismo foi selecionado o Homo sapiens e como “sequence input” foi utilizado o número de acesso NM\_003810, do *TRAIL*. Como parâmetros da Matrix de fatores de transcrição, foram utilizados a versão da biblioteca mais recente (7,0) e o grupo dos vertebrados. Como resultado, encontrou-se a seqüência tgtgagggtggaagAGGGcagggt, na qual observa-se um sítio DR1 (*Direct Repeat 1*), de ligação ao heterodímero RAR-RXR, com matrix de similaridade 0,819 (Figura 30). É importante ressaltar que o valor máximo para esta matrix é 1, onde cada posição na seqüência corresponde ao nucleotídeo mais conservado na matrix e que este resultado de 0,819 é considerado como um bom valor de sobreposição.

Tendo em vista os resultados anteriores, nos quais é possível observar uma correlação negativa entre a expressão de *TRAIL* e de *PRAME*; dados da literatura que demonstram que o PRAME é capaz de inibir a expressão de genes responsivos ao ácido retinóico e estes dados de bioinformática que demonstram que o *TRAIL* apresenta uma região no seu promotor onde é predita a ligação do receptor do ácido retinóico. Foi, então, formulada a hipótese de que a alta expressão de *PRAME*,

observada na progressão da LMC, poderia estar inibindo a expressão de *TRAIL* por interferir na via do ácido retinóico, sendo este um mecanismo importante para a progressão tumoral.

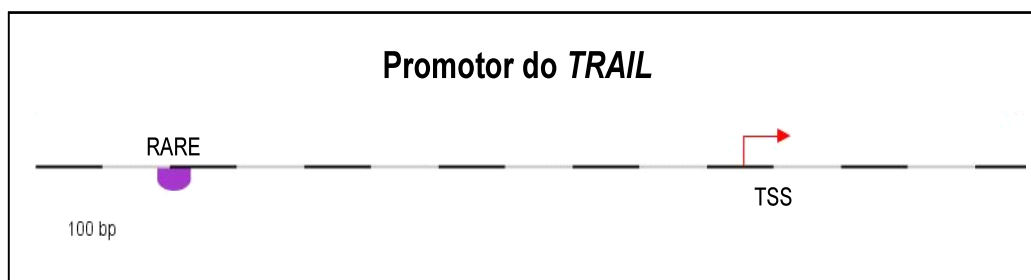


Figura 30: Análise, por bioinformática, do promotor de *TRAIL* usando o programa gene2promoter da genomatix ([WWW.genomatix.de](http://WWW.genomatix.de)). RARE, Retinoic Acid Responsive Element. TSS, Transcript Start Site.

#### 4.6 Inibição da Expressão de *PRAME* em linhagem K562

O próximo passo foi verificar se a baixa expressão de *TRAIL* é diretamente dependente da presença de *PRAME*. Portanto, foram infectadas células K562 com o shRNA para este gene. Para isto, foram transfectadas células Phoenix Amphotropicas, por fosfato de cálcio, com o plasmídeo retroviral pRS-*PRAME*, gentilmente cedido pelo Dr. René Bernards (*Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands*). Este plasmídeo possui um cassete onde está clonado uma seqüência capaz de gerar um shRNA para *PRAME*, além de um gene de resistência à puomicina. Foi então utilizado o sobrenadante retroviral para infectar as células K562 e, após 48 horas, estas células foram selecionadas com 2µg/ml de puomicina por dez dias. Esta dose do antibiótico é capaz de matar todas as células K562 não infectadas. Foram feitas duas infecções distintas. Após o estabelecimento da linhagem, foi verificada por RT-PCR em tempo real a expressão de *PRAME*, observando-se uma diminuição de aproximadamente três vezes na expressão deste gene, em ambas as infecções (Figura 31A). Também foram analisados os níveis protéicos de *PRAME*, podendo ser observado uma clara redução desta proteína após o silenciamento (Figura 31B).

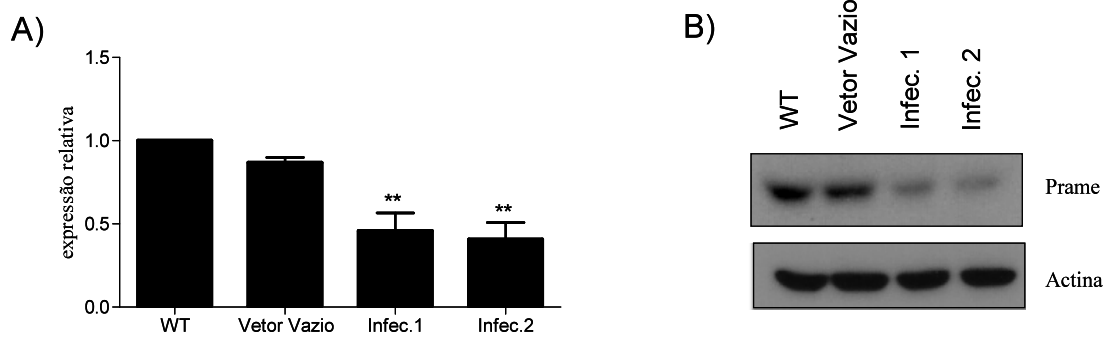


Figura 31: O shRNA para PRAME é capaz de inibir a expressão deste gene. A) Expressão relativa de PRAME em K562 selvagem (WT), transfectada com o vetor vazio (pRS) e duas infecções distintas com o shRNA para PRAME (pRS-PRAME) obtida por Real Time PCR. B) Western Blot de K562 selvagem (WT), transfectada com o vetor vazio (pRS) e duas infecções distintas com o shRNA para PRAME (pRS-PRAME), marcados para PRAME e Actina. \*\* $P < 0,01$  em relação ao vetor vazio.

Após a obtenção da linhagem K562 com o PRAME silenciado, foi avaliada a expressão de TRAIL, por RT-PCR em tempo real, observando-se um aumento de aproximadamente 11 vezes nas células infectadas (Figura 32). Este resultado sugere que a menor expressão de TRAIL, observada na progressão da doença, seja devido ao aumento na expressão de PRAME.

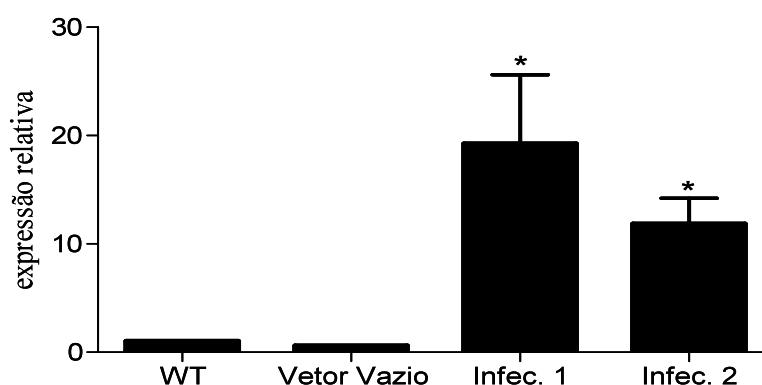


Figura 32: O silenciamento de PRAME é capaz de restaurar a expressão de TRAIL. Expressão relativa de TRAIL em K562 selvagem (WT), transfectada com o vetor vazio (pRS) e duas infecções distintas com o shRNA para PRAME (pRS-PRAME) obtida por Real Time PCR. \* $P < 0,05$  em relação ao vetor vazio.



#### 4.7 Inibição da Expressão de *EZH2* em linhagem K562

A fim de verificar se a inibição de *TRAIL*, devido a maior expressão de *PRAME* era dependente da proteína *EZH2*, foram infectadas células K562 com o shRNA para este gene. Para isto, utilizamos a mesma metodologia para a geração das células K562 silenciadas para o *PRAME*. Porém, neste caso, utilizamos dois plasmídeos diferentes que produziam shRNAs distintos para o *EZH2*. Após o estabelecimento das linhagens, foi verificada por RT-PCR em tempo real a expressão de *EZH2* e observou-se uma diminuição de aproximadamente duas vezes na expressão deste gene, em ambas as infecções (Figura 4A). Também foi notado, por Western Blot, que os níveis protéicos de *EZH2* também diminuíram após o silenciamento, sendo que aparentemente o segundo shRNA funcionou um pouco melhor na diminuição dos níveis protéicos de *EZH2* (Figura 4B).

Após a obtenção da linhagem K562 com o *EZH2* silenciado, foi avaliada a expressão de *TRAIL*, através da técnica de RT-PCR em tempo real, observando-se um aumento de aproximadamente 4 vezes nas células infectadas com o plasmídeo pRS-*EZH2* #3 e de aproximadamente 15 vezes nas células infectadas com o plasmídeo pRS-*EZH2* #4 (Figura 34). Estes resultados sugerem que a menor expressão de *TRAIL*, observada na progressão da doença, é devido ao aumento na expressão de *PRAME* e dependente da expressão de *EZH2*.

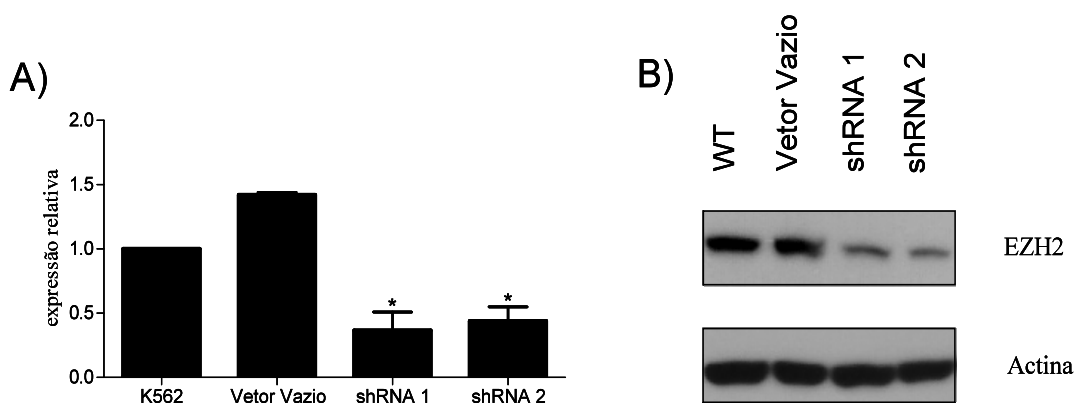


Figura 33: O shRNA para *EZH2* é capaz de inibir a expressão deste gene. A) Expressão relativa de *EZH2* em K562 selvagem (WT), transfectada com o vetor vazio (pRS) e duas infecções distintas com dois shRNAs para *EZH2* (pRS-*EZH2* 3 e pRS-*EZH2* 4) obtida por Real Time PCR. B) Western Blot de K562 selvagem (WT), transfectada com o vetor vazio e duas infecções distintas com os shRNAs para *EZH2*, marcados para *EZH2* e Actina. \* $P < 0,05$  em relação ao vetor vazio.

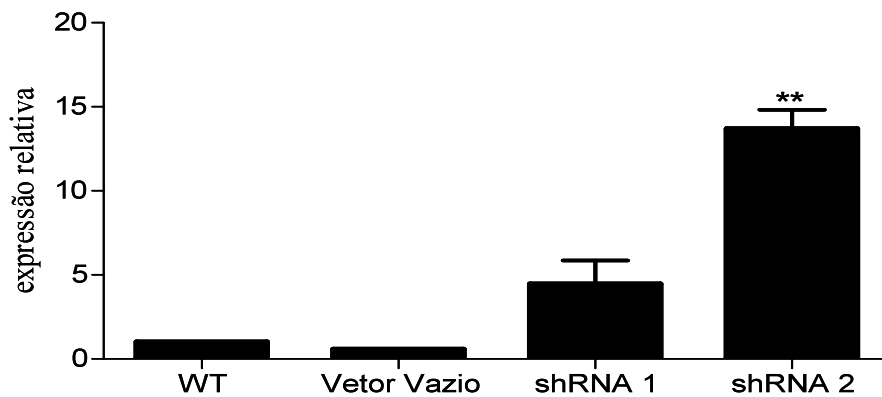


Figura 34: O silenciamento de EZH2 é capaz de restaurar a expressão de TRAIL. Expressão relativa de TRAIL em K562 selvagem (WT), transfectada com o vetor vazio (pRS) e duas infecções distintas com dois shRNAs para EZH2 obtida por Real Time PCR. \*\*P<0,01 em relação ao vetor vazio.

#### 4.8 A expressão de EZH2 não é modulada por BCR-ABL

Após verificarmos que a expressão de *BCR-ABL* é capaz de induzir um aumento na expressão de *PRAME* (Figura 14, 25, 26 e 27), fomos verificar se o mesmo ocorria com *EZH2*, para isso, quantificamos a expressão gênica deste em células leucêmicas que expressam endogenamente o *BCR-ABL* (KBM7, LAMA84 e K562) e em células leucêmicas que não o expressam (SKW, THP1 e HL60).

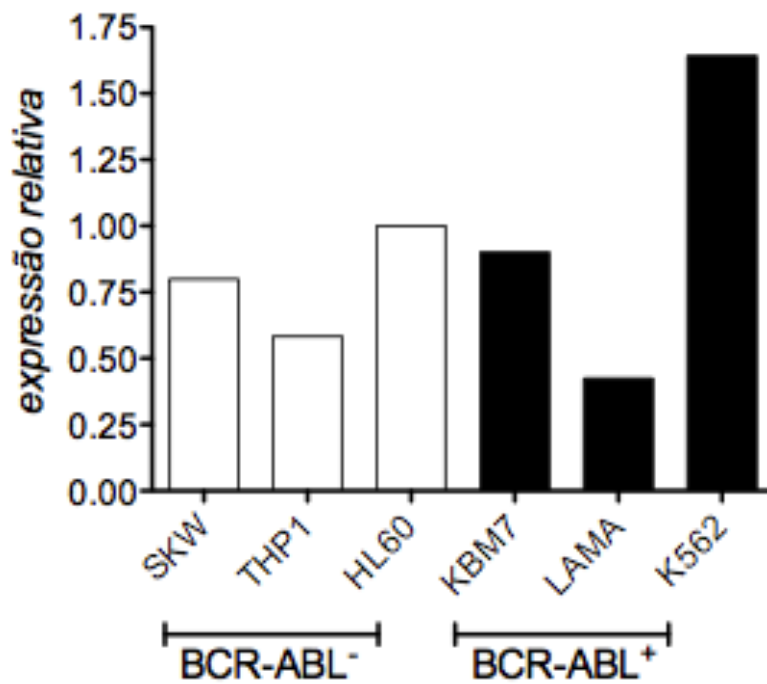


Figura 35: Expressão relativa de EZH2 em Células que não expressam o BCR-ABL e em Células que o expressam de forma constitutiva.

Como pode ser observado na figura 35, tanto as células *BCR-ABL*<sup>+</sup> quanto as células *BCR-ABL*<sup>-</sup> apresentam uma similar expressão de *EZH2*. Ao estender esta análise para os pacientes com LMC, também é possível notar (Figura 36) que a expressão de *EZH2* não varia conforme a doença progride.

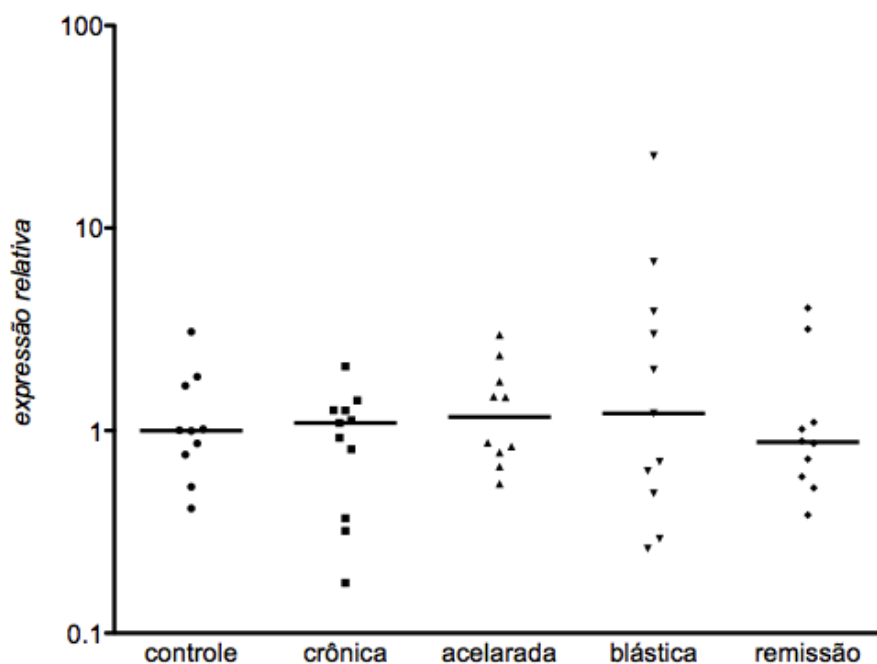


Figura 36: Expressão relativa de EZH2 em pacientes com LMC nas diferentes fases da doença e em indivíduos saudáveis.

Isto sugere que apesar da regulação da expressão gênica de *TRAIL* mediada por PRAME ser dependente de EZH2 (Figura 34), a simples presença deste é suficiente para esta regulação ocorrer. Assim sendo, não é necessário um aumento na expressão de *EZH2*, basta um aumento na expressão de PRAME, desde que na presença de quantidades fisiológicas de EZH2, para que ocorra um recrutamento de EZH2 para diferentes alvos. Logo, ao correlacionamos a expressão de *TRAIL* com a expressão de *EZH2*, em pacientes com LMC, não foi possível encontrar uma correlação entre estes dois genes (Figura 37).

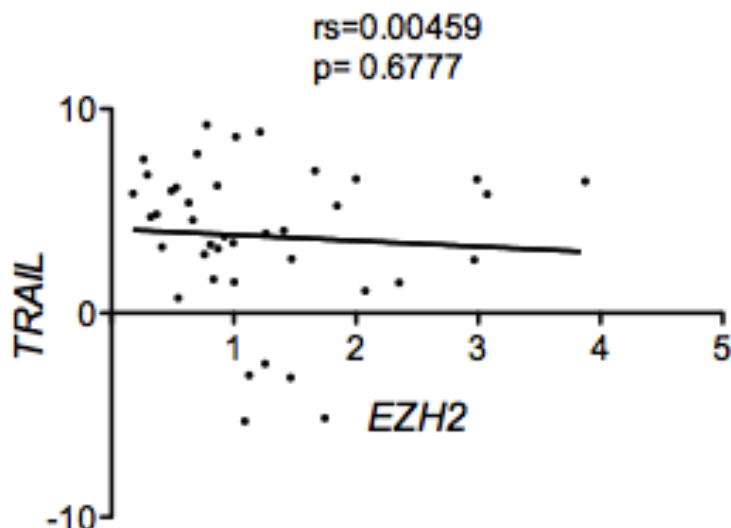


Figura 37: Correlação entre a expressão de TRAIL e EZH2 em indivíduos saudáveis, pacientes com LMC nas três fases da doença e indivíduos em remissão citogenética completa.

#### 4.9 A inibição da expressão de *PRAME* e de *EZH2* não interfere na via do FOXO3a

A constante ativação da via de PI3K/AKT por BCR-ABL tanto em células transformadas por este oncogene quanto em células CD34<sup>+</sup> primárias de pacientes com LMC leva à uma fosforilação constitutiva de FOXO3a e, conseqüentemente, à sua retenção citoplasmática (GHAFARI *et al.*, 2003). Uma das conseqüências da inibição da atividade de FOXO3a por BCR-ABL é a supressão da expressão de *TRAIL*. Para se excluir a hipótese de que o aumento da expressão de *TRAIL* em K562, uma célula BCR-ABL<sup>+</sup>, após o silenciamento de *PRAME* ou de *EZH2* fosse devido a uma ativação na via do FOXO3a, foi realizado um Western Blot para a forma fosforilada em serina 318/321 de FOXO3a (Figura 38A e B). A fosforilação de FOXO3a nestes resíduos são importantes para a retenção do FOXO3a no citoplasma e sua conseqüente inativação. Foi possível observar que os silenciamentos de *PRAME* ou de *EZH2* não interferem na fosforilação de FOXO3a, evidenciando que o aumento da expressão de *TRAIL* é mediado por uma via independente de FOXO3a.

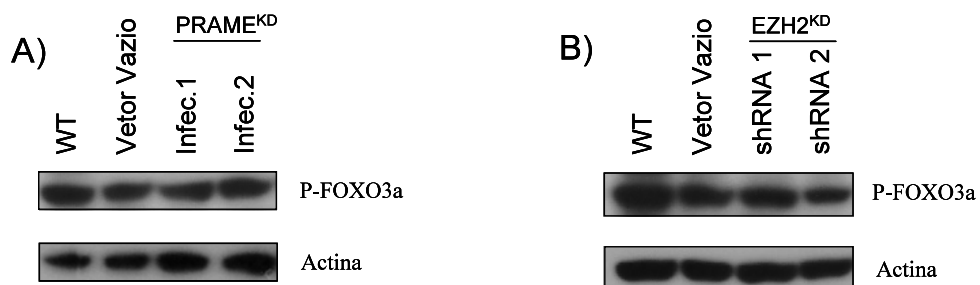


Figura 38: Os silenciamentos de *PRAME* ou de *EZH2* não interferem na fosforilação de FOXO3a. A) Western Blot de K562 selvagem (WT), transfectada com o vetor vazio (pRS) e duas infecções distintas com o shRNA para *PRAME*, marcados para FOXO3a fosforilado (P-FOXO3a) e Actina. B) Western Blot de K562 selvagem (WT), transfectada com o vetor vazio e duas infecções distintas com os shRNAs para *EZH2*, marcados para FOXO3a fosforilado e Actina.

#### 4.10 A inibição da expressão de *PRAME* e de *EZH2* interfere na proliferação celular

Intrigantemente, a sinalização de TRAIL não leva apenas à ativação das caspases efetoras e, subsequente, à iniciação da apoptose. Essa sinalização pode induzir vias de sinalização não apoptóticas, que incluem a ativação de NFkB, AKT e MAPKs (Figura 1). Assim, o TRAIL é capaz de induzir proliferação celular (FALSCHLEHNER *et al.*, 2007).

Para avaliarmos se o silenciamento de *PRAME* e *EZH2* é capaz de interferir na taxa de proliferação celular,  $2 \times 10^4$  células foram plaqueadas e mantidas em cultura por até sete dias. A cada dois dias o meio foi trocado por meio fresco, e as células foram contadas diariamente em câmara de Neubauer. Na figura 39 é possível observar que as células que apresentaram maior expressão de *TRAIL* também apresentaram uma maior proliferação.

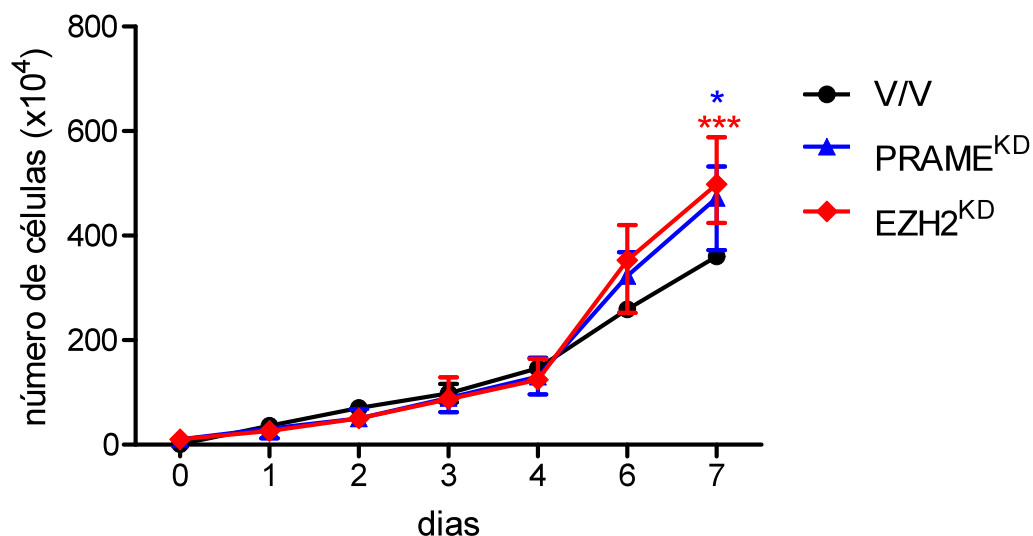


Figura 39: Os silenciamentos de *PRAME* ou de *EZH2* interferem na proliferação celular. Número de células obtido por contagem em câmara de Neubauer. \* $P < 0,05$  e \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao Vetor Vazio.

#### 4.11 A inibição da expressão de *PRAME* e de *EZH2* interfere na resistência à apoptose mediada pelo Mesilato de Imatinibe

Tem sido demonstrado que o Mesilato de Imatinibe (STI571) é capaz de aumentar significativamente a apoptose induzida por TRAIL em células transformadas com o BCR-ABL (NIMMANAPALLI *et al.*, 2001). Tendo em vista que células K562 após o silenciamento gênico de *PRAME* ou de *EZH2* apresentam alta expressão de TRAIL, fomos avaliar se esta diminuição da expressão de *PRAME* ou de *EZH2*, pela técnica de RNA de interferência, seria capaz de aumentar a susceptibilidade de células *BCR-ABL*<sup>+</sup>, no caso a linhagem K562, ao tratamento com STI571.

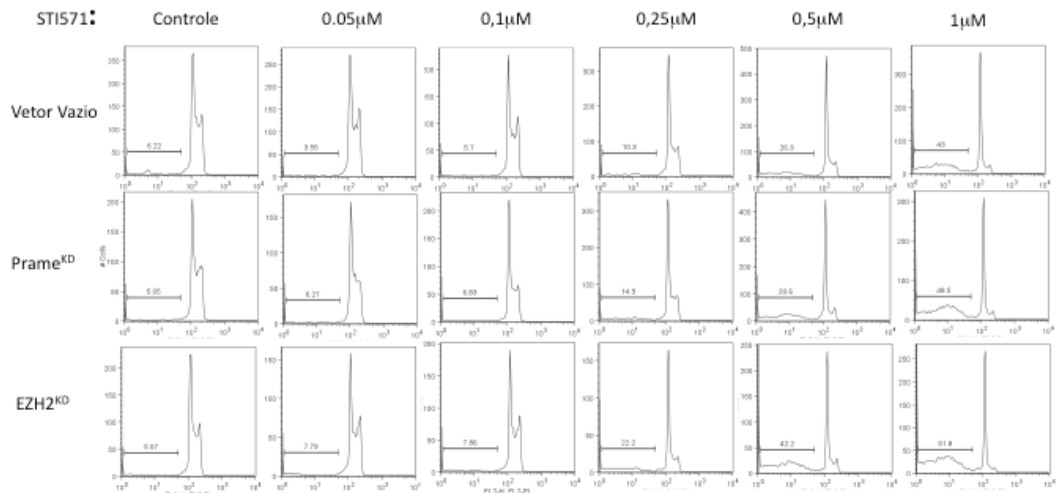


Figura 40: Os silenciamentos de *PRAME* ou de *EZH2* interferem na resistência à apoptose induzida por STI571. As células foram incubadas com as doses indicadas de STI571 por 48 horas e lisadas em tampão HFS contendo PI (5.000 eventos/duplicata) e analisadas em citômetro de fluxo (FacsCalibur.Becton&Dickinson). FL2-H: log PI fluorescência. Os valores apresentados são de um experimento representativo.

Para isso, avaliamos a porcentagem de células em apoptose após o estímulo com 0,05 μM, 0,1 μM, 0,25 μM, 0,5 μM ou 1 μM de STI571 por 48 ou 72 horas, ou sem o tratamento com esta droga. A apoptose foi mensurada pela quantidade de células em subG<sub>0</sub>. Como pode ser observado na figura 40 e na figura 41A, após 48 horas de tratamento, à partir de 0,25 μM de STI571 já é possível observar uma maior sensibilidade à apoptose nas células *PRAME*<sup>KD</sup> e *EZH2*<sup>KD</sup>, e esta maior sensibilidade persiste até a dose de 1 μM. Este resultado se repetiu também no tempo de 72 horas (Figuras 42 e 43A).

A viabilidade celular, por incorporação de azul de tripan, também foi avaliada nestas células, após os mesmos tratamentos e também foi possível observar uma maior sensibilidade das células *PRAME*<sup>KD</sup> e *EZH2*<sup>KD</sup> ao STI571, principalmente a partir de 0,5 μM (Figuras 41B e 43B).



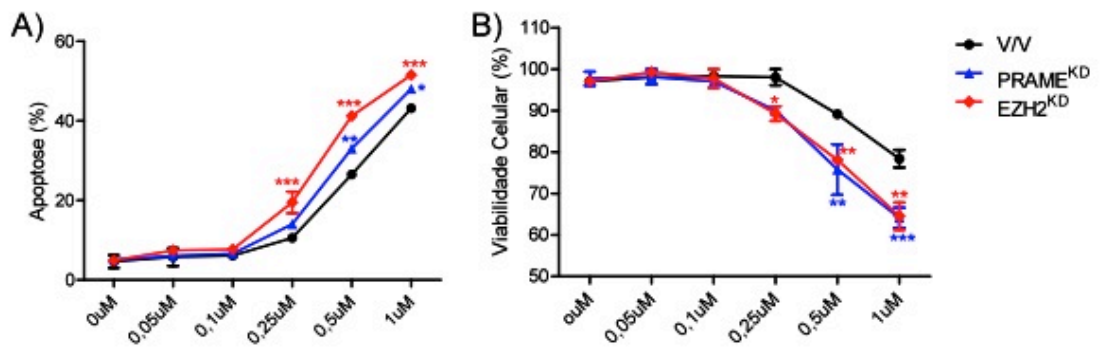


Figura 41: Os silenciamentos de PRAME ou de EZH2 interferem na resistência à apoptose induzida por STI571. A) As células foram incubadas com as doses indicadas de STI571 por 48 horas e lisadas em tampão HFS contendo PI (5000 eventos/duplicata) e analisadas em citômetro de fluxo (FacsCalibur Becton & Dickinson). Os valores apresentados são de dois experimentos independentes, em duplicata. B) As células foram incubadas com as doses indicadas de STI571 por 48 horas e analisada a viabilidade celular por exclusão com Azul de Tripán, em câmara de Neubauer. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001.

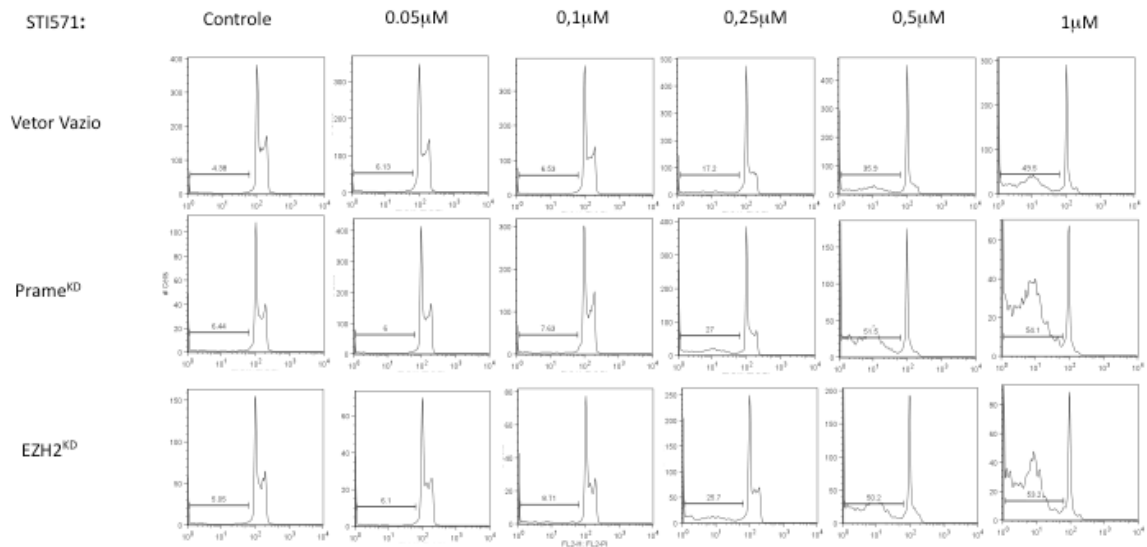


Figura 42: Os silenciamentos de PRAME ou de EZH2 interferem na resistência à apoptose induzida por STI571. As células foram incubadas com as doses indicadas de STI571 por 72 horas e lisadas em tampão HFS contendo PI (5.000 eventos/duplicata) e analisadas em citômetro de fluxo (FacsCalibur.Becton&Dickinson). FL2-H: log PI fluorescência. Os valores apresentados são de um experimento representativo.

A viabilidade celular, por incorporação de azul de tripan, também foi avaliada nestas células, após os mesmos tratamentos e também foi possível observar uma maior sensibilidade das células *PRAME*<sup>KD</sup> e *EZH2*<sup>KD</sup> ao STI571, principalmente a partir de 0,5 µM (Figuras 41B e 43B).

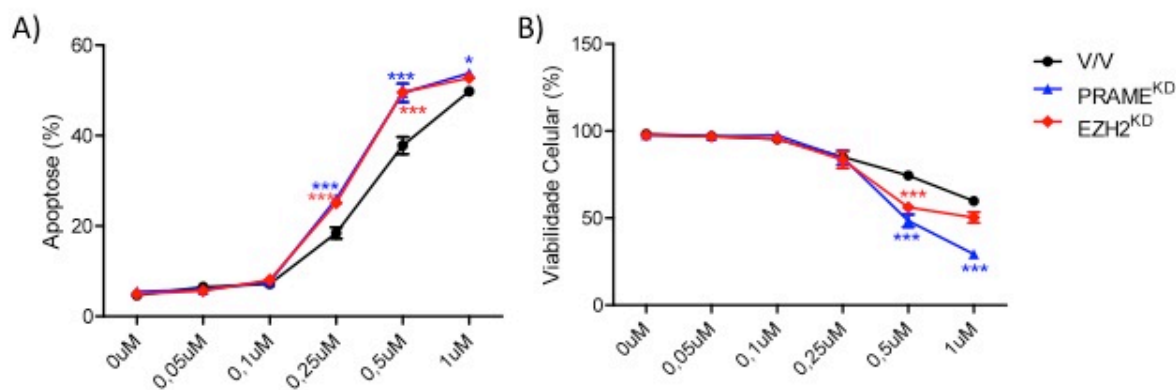


Figura 43: Os silenciamentos de PRAME ou de EZH2 interferem na resistência à apoptose induzida por STI571. A) As células foram incubadas com as doses indicadas de STI571 por 72 horas e lisadas em tampão HFS contendo PI (5000 eventos/duplicata) e analisadas em citômetro de fluxo (FacsCalibur Becton & Dickinson). Os valores apresentados são de dois experimentos independentes, em duplicata. B) As células foram incubadas com as doses indicadas de STI571 por 72 horas e analisada a viabilidade celular por exclusão com Azul de Tripan, em câmara de Neubauer. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001.

#### 4.12 Quantificação da expressão dos genes responsáveis pela demetilação da H3K27 em pacientes com LMC

No nosso modelo experimental a inibição da expressão de *TRAIL* se mostrou dependente da presença de EZH2 (Figura 34), e sabe-se que esta proteína é capaz de promover o silenciamento gênico através da sua atividade enzimática, promovendo a di- ou tri-metilação da H3K27 (SCHUETTENGRUBER *et al.*, 2007). Recentemente foram descritas duas proteínas, UTX e JMJD3, capazes de demetilizar H3K27 e, assim, contrabalançar o silenciamento promovido por EZH2 (AGGER *et al.*, 2007; DE SANTA *et al.*, 2007; LAN *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2007). Ao analisarmos a expressão destes dois genes nos pacientes com LMC, notamos uma redução estatisticamente significativa na expressão de *UTX* na fase blástica da doença, quando comparado com indivíduos saudáveis e que a expressão deste gene volta para níveis semelhante aos dos indivíduos saudáveis quando os pacientes entram em

remissão citogenética completa (Figura 44A). Em relação à expressão de *JMJD3*, observamos uma clara tendência de queda conforme a doença progride, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa, provavelmente devido ao pequeno número de pacientes analisados, com uma recuperação da expressão após a remissão citogenética completa (Figura 44B).

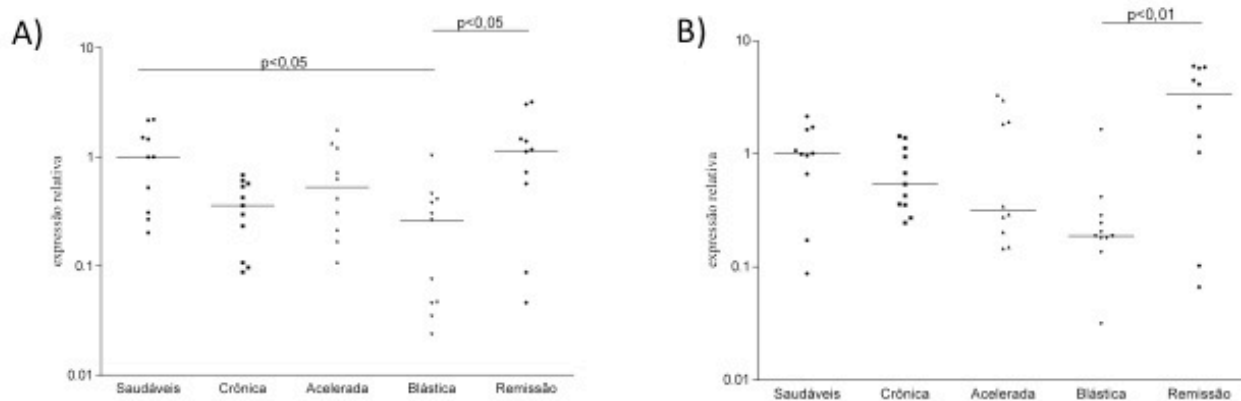


Figura 44: Expressão relativa das enzimas capazes de demetilam a lisina 27 da histona H3 em amostras de PBMC de indivíduos saudáveis, indivíduos nas diferentes fases da LMC e indivíduos em remissão citogenética completa. A) Expressão relativa de *UTX*. B) Expressão relativa de *JMJD3*.

#### 4.13 Meta-análises

Utilizamos a base de dados pública: <[WWW.oncomine.org](http://WWW.oncomine.org)>, que compila aproximadamente 20000 transcriptomas relacionados ao câncer, para fazer duas abordagens. Inicialmente utilizamos para confirmar nossos dados obtidos em pacientes com LMC e em seguida tentamos expandir os nossos achados para outros tipos de tumores, a fim de avaliar-se a universalidade da regulação de *TRAIL* por PRAME/EZH2.

Para validar nossos dados, utilizamos um estudo com pacientes portadores de LMC, onde foi avaliado, por microarray os perfis de expressão gênica de 57 pacientes na fase crônica, 17 na fase acelerada e 37 na fase blástica (RADICH *et al.*, 2006). Foi possível observar uma redução na expressão de *TRAIL*, associada com um aumento na expressão de *PRAME* conforme a doença progride, enquanto no foi possível

notar uma variação na expressão de *EZH2* (Figura 45), confirmando os nossos achados em um grupo diferente de pacientes. Também foi possível confirmar que ocorre uma redução na expressão de *JMJD3*, conforme a doença progride e que a expressão de *UTX* permanece estável nas três fases da doença (Figura 45).

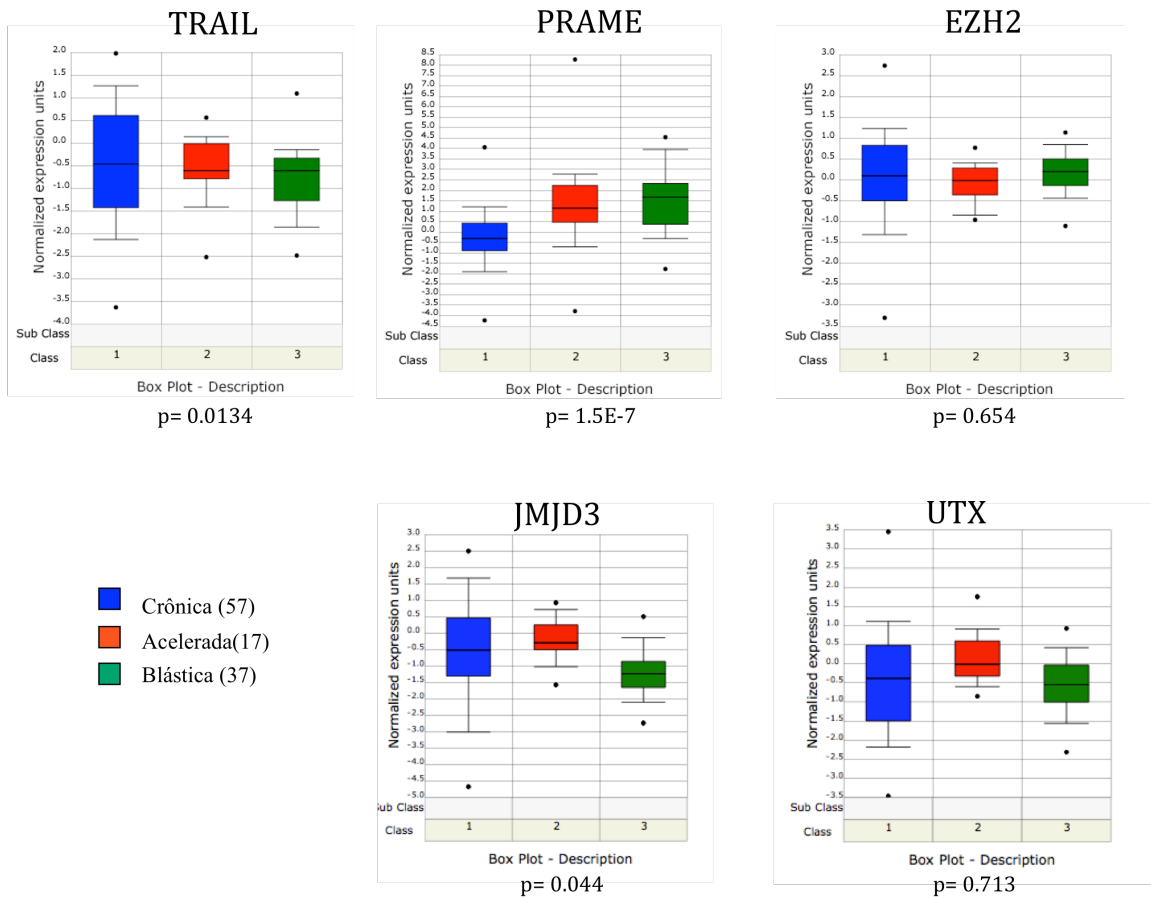


Figura 45: Expressão normalizada de TRAIL, PRAME, EZH2, JMJD3 e UTX obtidos em amostras de pacientes nas três fases da LMC (RADICH *et al.*, 2006). O eixo y representa a expressão normalizada. Os retângulos representam o interquartil (25° ao 75° percentil). A barra representa a mediana.

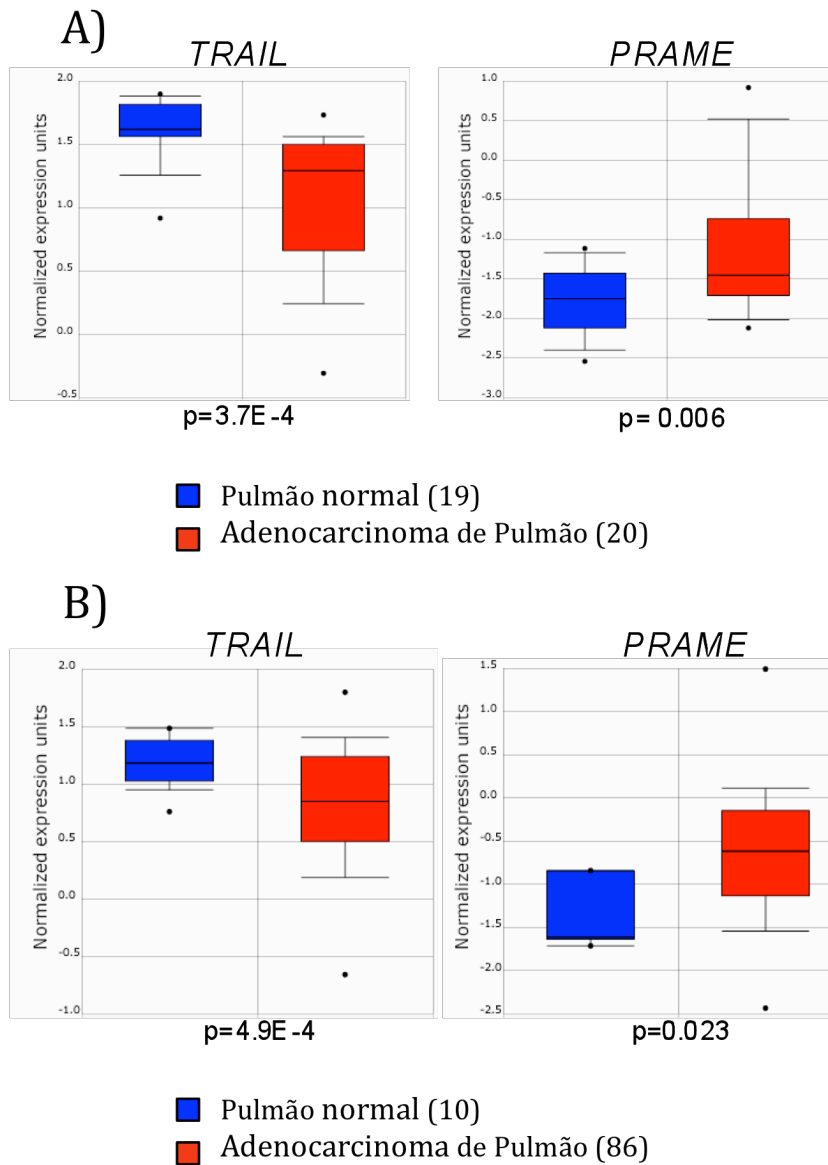


Figura 46: Expressão normalizada de TRAIL e PRAME obtidos em amostras de Adenocarcinoma de pulmão (STEARMAN *et al.*, 2005) (A) e (BEER *et al.*, 2002) (B). O eixo y representa a expressão normalizada. Os retângulos representam o interquartil (25° ao 75° percentil). A barra representa a mediana.

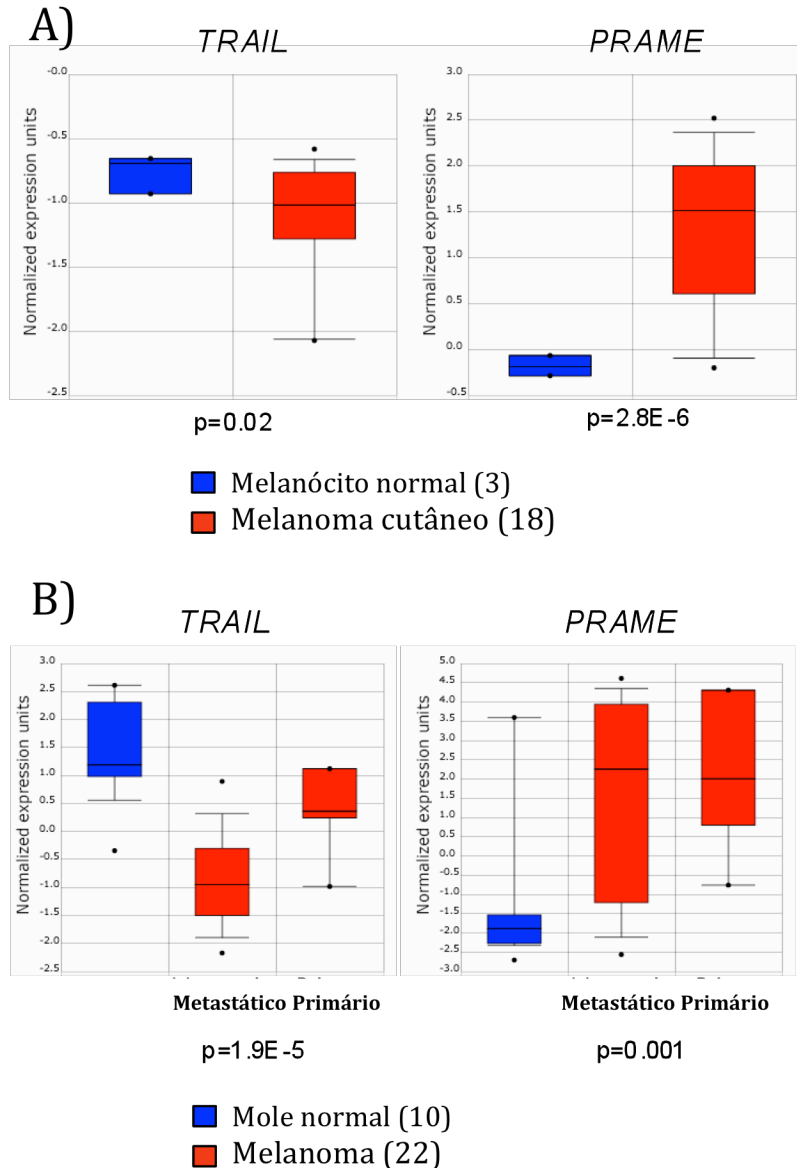


Figura 47: Expressão normalizada de *TRAIL* e *PRAME* obtidos em amostras de melanoma (HOEK *et al.*, 2006) (A) e (HAQQ *et al.*, 2005) (B). O eixo y representa a expressão normalizada. Os retângulos representam o interquartil (25° ao 75° percentil). A barra representa a mediana.

Em seguida utilizamos a mesma plataforma para avaliar se este perfil de expressão, aumento de *PRAME* acompanhado a uma redução de *TRAIL*, ocorria em outros tumores. Assim, avaliamos a expressão de *PRAME* e *TRAIL* em 135 amostras de adenocarcinoma de pulmão e pulmão normal (Figura 46), em 53 amostras de melanoma e melanócitos normais (Figura 47) e em 47 amostras de carcinoma de mama e mama normal (Figura 48). Em todos estes estudos foi possível notar um

aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) na expressão de *PRAME* acompanhado de uma redução na expressão de *TRAIL*.

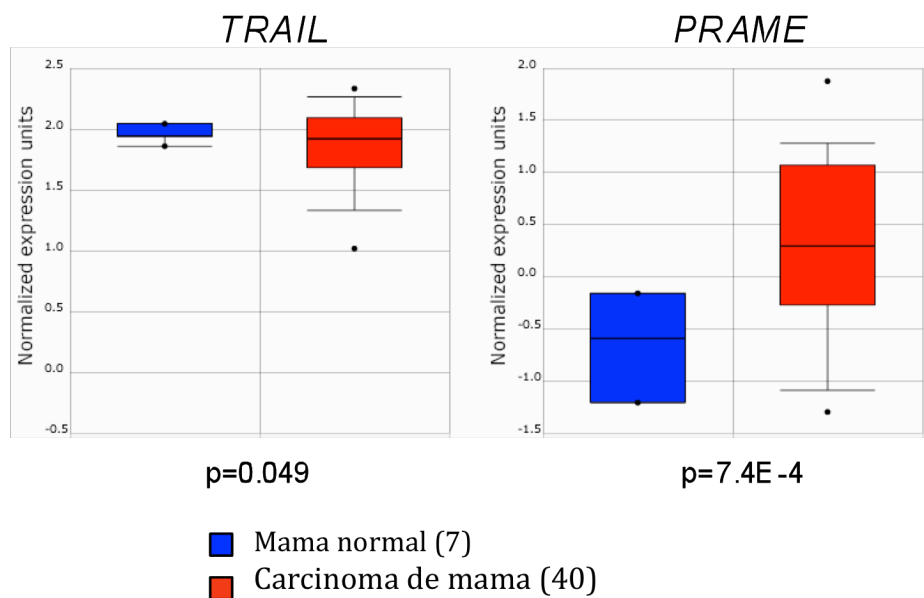


Figura 48: Expressão normalizada de TRAIL e PRAME obtidos em amostras de carcinoma de mama (RICHARDSON *et al.*, 2006). O eixo y representa a expressão normalizada. Os retângulos representam o interquartil (25° ao 75° percentil). A barra representa a mediana.

## 5 DISCUSSÃO

Com o objetivo de aumentar a compreensão dos mecanismos celulares alterados pela oncoproteína BCR-ABL, o nosso grupo gerou diversas linhagens tumorais, transfectadas com o gene *BCR-ABL*, entre elas as linhagens HL60, HL60.BCR-ABL, HeLa, HeLa.BCR-ABL, SKW.6.4 e SKW.6.4.BCR-ABL. Destas, a presença do BCR-ABL foi capaz de aumentar drasticamente a resistência à apoptose nas células HL60 e HeLa, enquanto que na linhagem SKW.6.4 a presença do BCR-ABL não altera o padrão de resistência a apoptose. Tendo em vista que o aumento da resistência à apoptose tem sido descrito como um dos mecanismos mais importante pelo qual este neo-oncogene leva à expansão das células mielóides (JAGANI *et al.*, 2008), foi utilizado por nosso grupo uma abordagem genômica, a fim de identificar genes cuja expressão esteja alterada nas células HL60.BCR-ABL e HeLa.BCR-ABL, em relação às suas contrapartes infectadas apenas com o vetor vazio e cuja expressão não esteja alterada nas células SKW.6.4.BCR-ABL, em relação à sua contraparte infectada apenas com o vetor vazio. Esta abordagem nos permitiu identificar 465 genes cuja expressão está aumentada e 70 genes cuja expressão está diminuída (Figura 2). Estes genes potencialmente poderiam participar no fenótipo de resistência à apoptose, induzido pela proteína BCR-ABL.

Dentre estes genes, encontram-se os genes que codificam as proteínas SH3BGRL2 (*SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 2*); TPD52L1 (*tumor protein D52-like 1*), também conhecida como D53; PRAME (*preferentially expressed antigen in melanoma*); DAP 12, também conhecido como TYROBP (*tyro protein tyrosine kinase binding protein*) e calcineurina A beta. Os três primeiros apresentaram uma expressão aumentada e os dois últimos apresentaram uma expressão diminuída. Estes genes foram selecionados para posterior validação devido à dois fatores. Primeiro, foram genes que apresentaram grande variação de expressão, de no mínimo quatro vezes; segundo, foram genes que participam de processos que potencialmente poderiam interferir no fenótipo de resistência à apoptose.

Para a validação dos resultados de Microarray, foi escolhida a técnica de RT-PCR em tempo real, pois este é um método rápido, que requer pouca amostra e é



bastante sensível. A validação foi feita em diversas linhagens, com o intuito de verificar se as alterações encontradas seria um processo universal da transformação mediada pelo BCR-ABL ou se seria um processo dependente do contexto celular. Por fim, ainda na etapa de validação, foi feita uma análise da expressão gênica destas moléculas em amostras obtida de pacientes com LMC, nas diversas fases da doença, para poder verificar se a mudança no perfil de expressão destes genes poderia se correlacionar com a progressão da doença e a fim de tentar se identificar possíveis marcadores de prognóstico ou alvos terapêuticos.

Dentre os genes estudados, a *CALCINEURINA A BETA*, o *DAP12*, *D53* e *SH3BGRL2* não apresentaram resultados muito promissores na etapa de validação, pois as alterações na expressão destes genes mediada por BCR-ABL parece ser extremamente dependente do contexto celular, isso reflete nos dados obtidos em células de pacientes, onde não foi possível observar uma correlação estatisticamente significativa entre a expressão destes genes e a progressão da doença e, portanto, não se correlaciona diretamente com o nível de expressão de *BCR-ABL*, já que este aumenta conforme a doença progride (BARNES *et al.*, 2005).

O gene que apresentou resultados mais promissores na fase de validação dos resultados foi o *PRAME*. Este teve um aumento de aproximadamente 13,5 vezes em HL60 transfectada com o *BCR-ABL* em relação ao vetor vazio (tabela 1). Na validação deste dado por RT-PCR em tempo real, foi observado um aumento de 48,33 vezes na HL60.BCR-ABL em relação à HL60. Porém, o aumento da expressão de *PRAME* mediado por *BCR-ABL* não é visto nas linhagens HeLa, THP1 e SKW6.4, após a transfecção com este gene. Por outro lado, existem evidências na literatura que *PRAME* possa ser um gene induzido por *BCR-ABL*, tendo em vista que ao se transfectar a linhagem celular humana TF-1 com *BCR-ABL*, ocorre um aumento da expressão de *PRAME* (WATARI *et al.*, 2000). Estes dados sugerem que o aumento da expressão de *PRAME*, mediado por *BCR-ABL*, é um evento dependente do contexto celular. Por fim, ao compararmos a expressão de *PRAME* em linhagens celulares, derivadas de leucemias, que não expressam *BCR-ABL* com linhagens leucêmicas que o expressam de forma endógena, é possível observar que as células *BCR-ABL*<sup>+</sup> apresentam uma maior expressão de *PRAME* (Figura 14). Condizente com estes dados, ao avaliarmos a expressão deste gene nos pacientes com LMC, foi

possível observar um aumento significativo da sua expressão em pacientes quando comparado à expressão dos controles saudáveis (Figura 25). Do mesmo modo, é possível observar um aumento da expressão deste gene conforme a doença progride e uma redução para níveis semelhantes aos indivíduos saudáveis após a remissão citogenética completa (Figura 26 e 45), sendo que a expressão de *PRAME* se correlaciona de forma significativa com a expressão de *BCR-ABL* (Figura 27). Estes dados sugerem que *PRAME* seja um gene regulado por *BCR-ABL*, apesar de que em alguns contextos celulares a simples presença deste neo-oncogene não seja capaz de aumentar a expressão de *PRAME*, provavelmente devido ao fato deste gene já apresentar alta expressão em diversas linhagens tumorais. Existe uma sugestão na literatura de que a expressão de *PRAME* aumente conforme a LMC progride da fase crônica para a crise blástica (RADICH *et al.*, 2006), porém este dado foi obtido através de técnica de Microarray em pacientes com LMC, sem uma posterior validação experimental. Assim, os nossos dados validam também este estudo, mostrando definitivamente um aumento da expressão de *PRAME* conforme a progressão da doença (Figura 26).

O próximo passo foi verificar se a atividade tirosina quinase do BCR-ABL teria um papel fundamental no aumento da expressão de *PRAME*, para isso foi feito um tratamento com 10 $\mu$ M de Imatinibe por 8 e por 24 horas. Este tratamento foi capaz de inibir a atividade tirosina quinase do BCR-ABL (Figura 15), porém não foi capaz de reduzir a expressão de *PRAME* (Figura 16), sugerindo que apesar de BCR-ABL ser capaz de induzir a expressão de *PRAME*, este mecanismo é independente de sua atividade tirosina-quinase desregulada, ou que este mecanismo seja inicialmente dependente da atividade tirosina-quinase, porém a manutenção da alta expressão de *PRAME* seja independente. Condizente com esta segunda hipótese, tem sido demonstrado que a alta expressão de *PRAME* em linhagens celulares derivadas de pacientes com LMC ocorra devido a hipometilação de ilhas CpG no promotor deste gene (ROMAN-GOMEZ *et al.*, 2007). Assim, é possível formular a hipótese de que a presença de BCR-ABL altera vias de sinalização que irão gerar uma hipometilação de ilhas CpG no gene *PRAME*, revertendo a inibição da expressão deste gene, o que permitiria que a sua expressão permaneça elevada, mesmo após o bloqueio da atividade tirosina-quinase do BCR-ABL, após o tratamento com Mesilato de Imatinibe.

Neste ponto, surge a questão se o aumento da expressão de *PRAME* tem uma função na transformação celular, mediada ou não por BCR-ABL, e/ou na progressão da LMC - e possivelmente outros tumores - ou se é meramente um marcador da progressão. Evidências recentes sugerem a primeira hipótese, já que foi demonstrado que a proteína PRAME é capaz de inibir a diferenciação mielóide em células hematopoiéticas progenitoras, tanto normais quanto leucêmicas, e que pacientes na fase crônica da LMC que apresentam maior expressão de *PRAME* têm maiores chances de não responder à terapia com Mesilato de Imatinibe e de apresentarem mutações no domínio tirosina quinase do BCR-ABL (OEHLER *et al.*, 2009).

Outra evidência de que esta proteína tem um papel ativo na transformação tumoral é a sua atividade como um repressor dominante do receptor do ácido retinóico (RAR), bloqueando a expressão dos genes alvos deste receptor nuclear (EPPING *et al.*, 2005). Acredita-se que a via do ácido retinóico seja uma importante via supressora de tumores, pois a ligação do ácido retinóico com o RAR permite a ligação deste receptor à elementos responsivos (RARE – *retinoic acid responsive element*) no promotor dos genes alvos, induzindo a transcrição destes genes. Entre estes alvos, encontram-se genes relacionados à diferenciação celular, controle do ciclo celular e apoptose. O PRAME é uma proteína nuclear que é capaz de se ligar ao RAR, mesmo na presença do ácido retinóico, e recrutar a proteína EZH2, uma enzima pertencente ao grupo dos polycombs, capaz de di e tri-metilar lisina 27 da histona H3 e, assim, promover um silenciamento epigenético dos genes alvos (EPPING *et al.*, 2005). Porém, o modelo usado para descrever esta função foi o melanoma, não existindo ainda evidências que esta proteína tenha esta função em outros tipos tumorais e os únicos genes alvos do ácido retinóico que já foram descritos como sendo inibidos na presença de PRAME foram *p21* e *RARβ*.

Para tentarmos entender se a alta expressão de *PRAME* poderia ter um papel na fisiopatologia da LMC, foi realizada uma análise *in silico* dos dados de Microarray, buscando-se genes que apresentaram uma expressão reduzida nas células HL60.BCR-ABL e HeLa.BCR-ABL em relação às suas contrapartes e, dentre estes genes, quais apresentam uma regulação pelo ácido retinóico. Esta análise nos permitiu identificar o gene *TRAIL*, que apresentou uma menor expressão nestas células *BCR-ABL*<sup>+</sup>.

Diversas evidências na literatura sugerem que *TRAIL* possa ser um gene regulado por *PRAME*: (1) *PRAME* é um repressor dominante do ácido retinóico (EPPING *et al.*, 2005) e *TRAIL* é um gene induzido pelo ácido retinóico (ALTUCCI *et al.*, 2001); (2) tem sido demonstrado que o *PRAME* é capaz de inibir a apoptose induzida por inibidores de HDAC (EPPING *et al.*, 2007), por outro lado, tem sido demonstrado que um dos eventos mais importantes na indução de apoptose pelos inibidores de HDAC é a indução de *TRAIL* (INSINGA *et al.*, 2005; NEBBIOSO *et al.*, 2005); (3) apesar do RNA mensageiro de *TRAIL* ser expresso de forma constitutiva na maioria dos tecidos, vários trabalhos avaliando o perfil global de expressão gênica em tecidos humanos saudáveis revelam que os testículos são o sítio com menor expressão deste gene, por outro lado, apenas neste órgão é possível encontrar, em condições fisiológicas, alta expressão de *PRAME* (EPPING e BERNARDS, 2006; ROTH *et al.*, 2006; SHYAMSUNDAR *et al.*, 2005; SU *et al.*, 2002; SU *et al.*, 2004). Apesar destas diversas evidências, não existe nenhum trabalho mostrando diretamente que *TRAIL* possa ser regulado por *PRAME*.

Ao analisarmos a expressão de *PRAME* e de *TRAIL* em células *BCR-ABL* positivas e negativas, observa-se uma maior expressão de *PRAME* nas células positivas enquanto o *TRAIL* apresenta uma maior expressão nas células negativas (Figura 28), sugerindo que exista uma correlação inversa na expressão destes dois genes. De fato, ao correlacionarmos a expressão destes dois genes nos pacientes com LMC, encontramos uma correlação negativa, moderada ( $rs=-0,497$ ) e estatisticamente significativa ( $p=0,0009$ ) entre eles (Figura 29), corroborando ainda mais a hipótese de que a alta expressão de *PRAME* diminui a expressão de *TRAIL*, provavelmente por interferir na via do ácido retinóico.

Apesar de ser sabido que o ácido retinóico é capaz de induzir a expressão de *TRAIL* (ALTUCCI *et al.*, 2001), nunca foi demonstrado que o promotor deste gene apresente um elemento responsivo ao ácido retinóico. Para confirmar a nossa hipótese de que, na presença de *PRAME*, o RAR se assentaria no promotor de *TRAIL*, em um RARE, e bloquearia a expressão deste gene por recrutar EZH2, avaliamos a região promotora de *TRAIL*. Para isso, foi utilizado o programa Gene2Promoter, disponível na página da web: [www.genomatix.de](http://www.genomatix.de), e foi encontrada a seqüência `tgtgagggtgggaagAGGGcagggt`, na qual observa-se um sítio DR1 (*Direct*

*Repeat 1*), de ligação ao heterodímero RAR-RXR, com matrix de similaridade 0,819 (Figura 30). É importante ressaltar que o valor máximo para esta matrix é 1, onde cada posição na seqüência corresponde ao nucleotídeo mais conservado na matrix e que este resultado de 0,819 é considerado como um ótimo valor de sobreposição.

Em seguida, para provarmos a existência de uma regulação de *TRAIL* mediada por *PRAME* e por *EZH2*, foi utilizada uma abordagem mais direta, onde células K562, derivadas de pacientes com LMC na crise blástica, foram infectadas com shRNA para *PRAME*, sendo feita duas infecções distintas, com o mesmo plasmídeo. Após o estabelecimento das linhagens, foi verificada por RT-PCR em tempo real a expressão de *PRAME*, observando-se uma diminuição de aproximadamente três vezes na expressão deste gene, em ambas as infecções (Figura 31A). Também foi analisado o nível protéico de *PRAME*, podendo ser observado uma clara redução desta proteína após o silenciamento (Figura 31B). Confirmando nossa hipótese, estas linhagens K562 com o *PRAME* silenciado apresentaram um aumento de aproximadamente 11 vezes na expressão de *TRAIL* (Figura 32). Da mesma forma, ao se inibir a expressão, por RNA de interferência, de *EZH2*, em linhagem K562 (Figura 33), é possível observar um aumento significativo na expressão de *TRAIL* (Figura 34).

Estes experimentos demonstram claramente que a alta expressão de *PRAME* é responsável por diminuir a expressão de *TRAIL*, no contexto da transformação mediada pelo BCR-ABL. Isto tem diversas implicações no entendimento da fisiopatologia da leucemia mielóide crônica e na terapêutica desta patologia.

O *TRAIL* é um ligante de morte, membro da superfamília do TNF, que foi inicialmente identificado e clonado baseado na sua homologia com o CD95L e com o TNF (WILEY *et al.*, 1995). Esta proteína apresenta a característica de ser citotóxica para células tumorais, sem afetar células normais (WALCZAK *et al.*, 1999). O *TRAIL* induz a apoptose após se ligar aos receptores DR-4 ou DR-5, o que resulta na trimerização do receptor e formação do complexo indutor da sinalização de morte (DISC - *death-inducing signalling complex*). Em seguida, ocorre o recrutamento e a clivagem da pro-caspase-8 em caspase 8, que irá ativar as caspases efetoras, como a caspase-3, levando à morte celular (ASHKENAZI *et al.*, 1999; AZA-BLANC *et al.*, 2003). A caspase-8 ativa também pode clivar BID, um membro pró-apoptótico da

família Bcl-2, ligando a via extrínseca de indução de morte com a via intrínseca (LUO *et al.*, 1998).

Existem diversas evidências de que o TRAIL pode agir como uma proteína supressora de tumores. Camundongos *knockout* para *TRAIL* são mais susceptíveis à tumorigênese induzida por carcinógenos químicos e à metástases (CRETNEY *et al.*, 2002; SEDGER *et al.*, 2002). Outras evidências de que TRAIL possa agir como um supressor de tumor são os experimentos utilizando anticorpos neutralizantes de TRAIL em camundongos, que significativamente aumentam as metástases no fígado (CLARKE *et al.*, 2004; CRETNEY *et al.*, 2002). Corroborando com estes dados, diversos estudos de expressão gênica global em tumores têm demonstrado que a expressão de *TRAIL* diminui durante a progressão do câncer (DANIELS *et al.*, 2005; POPNIKOLOV *et al.*, 2006; VIGNESWARAN *et al.*, 2007). Além disto, existem estudos demonstrando que a indução da expressão de *TRAIL* é um mediador central da apoptose em diversos tratamentos para o câncer, como o ácido retinóico, os inibidores de HDAC e o interferon (ALTUCCI *et al.*, 2001; CLARKE *et al.*, 2004; INSINGA *et al.*, 2005; NEBBIOSO *et al.*, 2005). Além disto, o TRAIL também aparenta ser um importante mediador na apoptose, em células derivadas de LMC, induzida pelo Mesilato de Imatinibe, sendo importante ressaltar que a indução deste é capaz de reverter o fenótipo de resistência ao STI571 (KIKUCHI *et al.*, 2007). Estes dados sugerem que a diminuição da expressão de *TRAIL* tem uma função central na iniciação e/ou progressão do câncer, e a re-expressão de *TRAIL* é uma opção terapêutica muito interessante a fim de induzir apoptose nas células transformadas, sem afetar as células normais.

De fato, existe uma quantidade enorme de grupos de pesquisa buscando desenvolver uma terapia anti-tumoral baseada no TRAIL, entre estas terapias pode-se citar o TRAIL humano recombinante e solúvel, anti-corpos agonistas dos receptores de TRAIL (DR4 e DR5), terapia gênica utilizando-se adenovírus capazes de expressar *TRAIL* sob promotores específicos para o tecido de origem do tumor (GRIFFITH *et al.*, 2009). Os primeiros trabalhos examinando a atividade anti-tumoral de TRAIL *in vivo* também avaliaram a sua toxicidade à tecidos normais. Por exemplo, a administração intravenosa de TRAIL (200 ug) recombinante solúvel em camundongos não resultou em nenhum efeito tóxico observável, mesmo o tratamento

diário por longos períodos (14 dias) não apresentou toxicidade, enquanto que a administração de FasL (50 ug) é capaz de matar os animais em uma hora (WALCZAK *et al.*, 1999). Estudos com primatas também demonstraram a segurança da administração de TRAIL por longos períodos (ASHKENAZI e DIXIT, 1999). Estes estudos claramente demonstram que o TRAIL apresenta baixa toxicidade.

Porém, apesar da baixa toxicidade e da sua atividade anti-tumoral *in vitro* e *in vivo*, o tratamento de humanos com TRAIL dependeria da administração sistêmica e repetida de grandes doses de TRAIL solúvel para ser efetiva. Isto pode ser problemático, do ponto de vista da farmacodinâmica, já que iria requerer repetidas injeções para manter uma concentração plasmática suficientemente alta para ter uma potencial resposta terapêutica. Uma alternativa seria a indução da expressão de *TRAIL*, que poderia ser obtida de forma exógena, utilizando-se vetores adenovirais não-replicativos. De fato, diversos estudos pré-clínico e clínicos tem demonstrado a eficiência deste método para induzir a expressão deste gene e para induzir a apoptose nestes tumores (GRIFFITH *et al.*, 2009). o grande problema deste método é a utilização de vetores adenovirais, já que adenovírus são altamente imunogênicos e a maioria das pessoas já foram expostas à adenovírus em algum momento de sua vida (COLLINS *et al.*, 2008; KAPLAN, 2005). Baseado nos dados apresentados nesta tese, uma outra terapia anti-tumoral baseada em TRAIL poderia ser proposta, visando a indução da expressão de *TRAIL* endógeno pela inibição do seu repressor, o complexo PRAME/EZH2. Esta possível terapia teria a vantagem da baixíssima toxicidade de TRAIL, devido este ser bastante seletivo para células tumorais, sem os problemas farmacodinâmicos da terapêutica com TRAIL solúvel ou anticorpos agonistas dos receptores de TRAIL, nem os problemas imunológicos da utilização de vetores virais. Ainda neste sentido, o alvo ideal seria o PRAME, pois sabe-se que este gene praticamente não é expresso em células normais (EPPING e BERNARDS, 2006), o que limitaria o aparecimento de efeitos adversos no caso de sua inibição. Alternativamente, poderia se buscar moléculas capazes de inibir a ligação entre PRAME e EZH2 ou a atividade enzimática de EZH2.

Estes dados têm grande relevância na terapêutica da LMC, pois se sabe que o TRAIL é capaz de induzir apoptose em diversas linhagens celulares BCR-ABL<sup>+</sup>, já que estas células freqüentemente expressam os receptores de morte DR-4 e DR-5.

Além disto, células leucêmicas primárias, de pacientes com leucemia linfoblástica aguda, positiva para o cromossomo Filadélfia, também são sensíveis à morte por TRAIL. Outro dado interessante é que as linhagens celulares estudadas que se demonstraram resistentes à apoptose induzida pelo Mesilato de Imatinibe, o inibidor seletivo da atividade tirosina-quinase de BCR-ABL, são sensíveis ao TRAIL e vice-versa, sendo que nenhuma linhagem estudada se mostrou resistente aos dois estímulos de morte (UNO *et al.*, 2003). Isto sugere que o co-tratamento com TRAIL, ou a re-expressão deste gene, possa ter uma função importante na erradicação das células resistentes ao Mesilato de Imatinibe, a terapia de escolha para a LMC atualmente.

Além disto, nós demonstramos que o co-tratamento com Mesilato de Imatinibe aumenta a morte induzida por TRAIL nas células BCR-ABL<sup>+</sup>, K562, que são normalmente resistentes à esta proteína. Sabe-se, também, que o co-tratamento com 0,25µM do inibidor da atividade tirosina quinase do BCR-ABL aumenta significativamente a morte induzida por 100 ng/ml de TRAIL solúvel nestas linhagens celulares (NIMMANAPALLI *et al.*, 2001). É possível notar nas linhagens K562, tanto com o *PRAME* silenciado, tanto com o *EZH2* silenciado, onde ambas apresentam alta expressão de *TRAIL*, não existem diferenças basais na taxa de apoptose (Figuras 40-43), o que está de acordo com estes dados da literatura de que a linhagem K562 é resistente à morte por TRAIL. Porém, após o tratamento com Mesilato de Imatinibe, as linhagens K562 *PRAME*<sup>KD</sup> e *EZH2*<sup>KD</sup> apresentaram maiores taxas de apoptose do que as células infectadas apenas com o vetor vazio (Figuras 40-43). Estes dados sugerem que novas estratégias terapêuticas podem ser adotadas para o tratamento da LMC, visando inibir a expressão de *PRAME* e/ou de *EZH2* ou inibir a atividade destas proteínas, como por exemplo desenvolvendo novas drogas que sejam capazes de inibir a atividade metil-transferase de *EZH2* ou a utilização de DZNep, uma droga capaz de diminuir os níveis celulares de *EZH2* e dos seus co-fatores EED e SUZ12 (TAN *et al.*, 2007). Porém, como dito anteriormente, o *PRAME* seria um alvo ainda mais interessante. Neste sentido, tem-se buscado desenvolver imunoterapias utilizando-se *PRAME* como alvo, sendo que a indução de clones de linfócitos T citotóxicos contra *PRAME* são capazes de lisar células derivadas de tumores sólidos e são capazes de reconhecer e responder à células primárias de pacientes com LMC (KESSLER *et al.*, 2001; QUINTARELLI *et al.*, 2008; REZVANI *et al.*, 2009). Isso nos



permite vislumbrar uma terapêutica para a LMC que consistiria na combinação da imunoterapia contra PRAME combinada como o tratamento com Mesilato de Imatinibe, onde as células que são resistentes a esta droga seriam lisadas pelas células CTLs e as células com baixa expressão de PRAME e, portanto, resistentes à imunoterapia seriam mortas pelo tratamento com STI571, já que foi demonstrado aqui que as células com menor expressão de PRAME são mais sensíveis a esta droga.

Também foi demonstrado que apesar da reduzida expressão de *TRAIL* na linhagem K562 ser dependente de EZH2, já que o silenciamento deste por shRNA foi capaz de restaurar a expressão de TRAIL (Figura 34), aparentemente a expressão de *EZH2* não é dependente de BCR-ABL, já que células positivas e negativas para o cromossomo Filadélfia expressam níveis semelhantes de *EZH2* (Figura 35). Semelhantemente, não foi possível encontrar diferença na expressão de *EZH2* nas diferentes fases da LMC (Figura 36), nem tampouco uma correlação entre a expressão deste com a expressão de *TRAIL* em pacientes com LMC e em indivíduos saudáveis (Figura 37).

Isto sugere que o processo de regulação da expressão de *TRAIL*, que vai gerar o bloqueio da expressão deste gene na LMC, é dependente do aumento da expressão de *PRAME* e não de *EZH2*. Este PRAME, que fisiologicamente não estaria presente nestas células é, então, capaz de recrutar o EZH2 para alvos que normalmente não seriam silenciados por EZH2, neste caso o promotor de *TRAIL* e, possivelmente, outros promotores responsivos ao ácido retinóico, gerando então o silenciamento observado, provavelmente através da sua atividade metilar a histona H3 no resíduo de lisina 27.

Assim, fomos avaliar a expressão dos genes que codificam as proteínas UTX e JMJD3, que são responsáveis por remover o grupo metil da lisina 27 di- ou trimetilada, na histona H3 (AGGER *et al.*, 2007; DE SANTA *et al.*, 2007; LAN *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2007) e notamos que ambos apresentam uma expressão reduzida na fase blástica da LMC, sendo que *JMJD3* apresenta uma redução na sua expressão conforme a doença progride (Figura 44). Isto sugere que os genes silenciados por metilação da lisina 27 de histona H3 vão apresentar uma diminuição da expressão de forma mais estável. É, então, coerente sugerir que a diminuição da

expressão de *TRAIL*, dependente de EZH2, será ainda mais estável na fase blástica, onde ocorre uma menor expressão de *UTX* e *JMJD3*.

Recentemente o gene *UTX* foi descrito como um novo gene supressor de tumor, este gene foi descrito como sendo inativado por mutações somáticas em diversos tipos de tumores sólidos, o que interfere na regulação da metilação da histona H3 em resíduos de lisina. Sendo que a reintrodução de *UTX* em células tumorais que apresentavam este gene mutado resultou em uma diminuição da proliferação celular e mudança no perfil de transcrição gênica (VAN HAAFTEN *et al.*, 2009). Este dado sugere que a inibição do gene *UTX* tem um papel importante no processo tumoral e, tendo em vista a baixa expressão deste gene em pacientes (Figura 44), possivelmente na patologia da LMC.

Da mesma forma, a proteína JMJD3 também tem sido implicada como sendo importante para evitar a tumorigênese, pois tem um papel ativo na ativação do locus gênico INK4-ARF. Este locus está epigeneticamente silenciado em células normais e se torna ativado em resposta ao estresse oncogênico, o que induz a senescência, impedindo, assim, a formação do tumor. Esta indução ocorre devido à atividade demetilase de JMJD3. Assim, a inibição da expressão de *JMJD3* em fibroblastos embrionários de camundongos resulta na immortalização destas células (AGGER *et al.*, 2009; BARRADAS *et al.*, 2009). Importante notar que leucemias linfocíticas agudas positivas para o cromossomo Filadélfia geralmente apresentam deleção do locus INK4-ARF, porém em pacientes com LMC, mesmo na crise blástica, não costumam apresentar esta deleção. Além disto, em modelos animais de leucemia BCR-ABL positiva, a inativação de ARF atenua a responsividade a inibidores da atividade tirosina-quinase de BCR-ABL, aumenta a manutenção de células tronco leucêmicas, e facilita o surgimento de clones resistentes ao Mesilato de Imatinibe com mutações no domínio quinase de BCR-ABL (WILLIAMS e SHERR, 2008). Assim, a baixa expressão de *JMJD3* em pacientes com LMC (Figura 44), possivelmente tem um papel importante na patologia desta leucemia, por impedir a ativação do locus INK4-ARF.

Na última etapa deste projeto buscamos por evidências de que este processo de inibição da expressão de *TRAIL*, mediado por PRAME, possa ser um fenômeno mais geral da transformação tumoral pois se sabe que *PRAME* apresenta-se

altamente expresso em diversos tipos de tumores, como por exemplo carcinomas de pulmão; mama; renal; tumores de cabeça e pescoço; linfomas de Hodgkin's; sarcomas; tumores de Wilm, melanoma, neuroblastoma e meduloblastoma (EPPING e BERNARDS, 2006). Assim, utilizamos meta-análises de dados de microarray obtidos na base de dados <[WWW.oncomine.org](http://WWW.oncomine.org)>, de tumores de mama, pulmão e melanoma. Analisamos ao todo 186 amostras tumorais e 49 saudáveis e, em todos estes tumores, foi possível observar uma redução estatisticamente significativa na expressão de *TRAIL* acompanhado por um aumento também significativo na expressão de *PRAME*, sugerindo, assim, que esta via possa ser responsável pela reduzida expressão de *TRAIL* também em tumores sólidos. Isso também reforça a possibilidade de utilizar o PRAME como um alvo na terapia contra diversos outros tipos tumorais.

## 6 CONCLUSÕES

Identificamos um novo mecanismo de regulação da expressão de *TRAIL*, dependente da alta expressão de *PRAME* e da presença de EZH2. Esta via foi demonstrada como sendo responsável pela diminuição de expressão de *TRAIL* em pacientes com LMC e sugerida como sendo responsável por este processo em outros tumores.

O *PRAME* é um potencial biomarcador de progressão tumoral na LMC.

O *PRAME* e o EZH2 são dois interessantes alvos terapêuticos na LMC, e possivelmente em outros tumores, devido à sua capacidade de bloquear a expressão de *TRAIL*.

A inibição de *PRAME* ou de *EZH2* é capaz aumentar a capacidade tumoricida do Mesilato de Imatinibe, *in vitro*. Reforçando a teoria de que estas moléculas são dois importantes alvos terapêuticos na LMC.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

ACCILI, D.; ARDEN, K. C. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. **Cell**, volume, 4, 421-426, 2004.

AGGER, K.; CLOOS, P. A.; CHRISTENSEN, J.; PASINI, D.; ROSE, S.; RAPPSILBER, J.; ISSAEVA, I.; CANAANI, E.; SALCINI, A. E.; HELIN, K. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. **Nature**, volume, 7163, 731-734, 2007.

AGGER, K.; CLOOS, P. A.; RUDKJAER, L.; WILLIAMS, K.; ANDERSEN, G.; CHRISTENSEN, J.; HELIN, K. The H3K27me3 demethylase JMJD3 contributes to the activation of the INK4A-ARF locus in response to oncogene- and stress-induced senescence. **Genes Dev**, volume, 10, 1171-1176, 2009.

AICHBERGER, K. J.; MAYERHOFER, M.; KRAUTH, M. T.; SKVARA, H.; FLORIAN, S.; SONNECK, K.; AKGUL, C.; DERDAK, S.; PICKL, W. F.; WACHECK, V.; SELZER, E.; MONIA, B. P.; MORIGGL, R.; VALENT, P.; SILLABER, C. Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of Imatinib and mcl-1 antisense oligonucleotides. **Blood**, volume, 8, 3303-3311, 2005.

ALTUCCI, L.; ROSSIN, A.; RAFFELSBERGER, W.; REITMAIR, A.; CHOMIENNE, C.; GRONEMEYER, H. Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. **Nat Med**, volume, 6, 680-686, 2001.

ARNER, E. S.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **Eur J Biochem**, volume, 20, 6102-6109, 2000.

ASADA, A.; ZHAO, Y.; KONDO, S.; IWATA, M. Induction of thymocyte apoptosis by Ca<sup>2+</sup>-independent protein kinase C (nPKC) activation and its regulation by calcineurin activation. **J Biol Chem**, volume, 43, 28392-28398, 1998.

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Apoptosis control by death and decoy receptors. **Curr Opin Cell Biol**, volume, 2, 255-260, 1999.

ASHKENAZI, A.; PAI, R. C.; FONG, S.; LEUNG, S.; LAWRENCE, D. A.; MARSTERS, S. A.; BLACKIE, C.; CHANG, L.; MCMURTREY, A. E.; HEBERT, A.; DEFORGE, L.; KOUMENIS, I. L.; LEWIS, D.; HARRIS, L.; BUSSIÈRE, J.;

---

\* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

KOEPPEN, H.; SHAHROKH, Z.; SCHWALL, R. H. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. **J Clin Invest**, volume, 2, 155-162, 1999.

AZA-BLANC, P.; COOPER, C. L.; WAGNER, K.; BATALOV, S.; DEVERAUX, Q. L.; COOKE, M. P. Identification of modulators of TRAIL-induced apoptosis via RNAi-based phenotypic screening. **Mol Cell**, volume, 3, 627-637, 2003.

BARNES, D. J.; SCHULTHEIS, B.; ADEDEJI, S.; MELO, J. V. Dose-dependent effects of BCR-ABL in cell line models of different stages of chronic myeloid leukemia. **Oncogene**, volume, 42, 6432-6440, 2005.

BARRADAS, M.; ANDERTON, E.; ACOSTA, J. C.; LI, S.; BANITO, A.; RODRIGUEZ-NIEDENFUHR, M.; MAERTENS, G.; BANCK, M.; ZHOU, M. M.; WALSH, M. J.; PETERS, G.; GIL, J. Histone demethylase JMJD3 contributes to epigenetic control of INK4a/ARF by oncogenic RAS. **Genes Dev**, volume, 10, 1177-1182, 2009.

BEDI, A.; ZEHNBAUER, B. A.; BARBER, J. P.; SHARKIS, S. J.; JONES, R. J. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. **Blood**, volume, 8, 2038-2044, 1994.

BEER, D. G.; KARDIA, S. L.; HUANG, C. C.; GIORDANO, T. J.; LEVIN, A. M.; MISEK, D. E.; LIN, L.; CHEN, G.; GHARIB, T. G.; THOMAS, D. G.; LIZYNESS, M. L.; KUICK, R.; HAYASAKA, S.; TAYLOR, J. M.; IANNETTONI, M. D.; ORRINGER, M. B.; HANASH, S. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. **Nat Med**, volume, 8, 816-824, 2002.

BEN-NERIAH, Y.; DALEY, G. Q.; MES-MASSON, A. M.; WITTE, O. N.; BALTIMORE, D. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/ABL hybrid gene. **Science**, volume, 4760, 212-214, 1986.

BIRTLE, Z.; GOODSTADT, L.; PONTING, C. Duplication and positive selection among hominin-specific PRAME genes. **BMC Genomics**, volume, 120, 2005.

BOON, K.; EDWARDS, J. B.; SIU, I. M.; OLSCHNER, D.; EBERHART, C. G.; MARRA, M. A.; STRAUSBERG, R. L.; RIGGINS, G. J. Comparison of medulloblastoma and normal neural transcriptomes identifies a restricted set of activated genes. **Oncogene**, volume, 48, 7687-7694, 2003.

BOUTROS, R.; BYRNE, J. A. D53 (TPD52L1) is a cell cycle-regulated protein maximally expressed at the G2-M transition in breast cancer cells. **Exp Cell Res**, volume, 1, 152-165, 2005.

BOYUM, A. Separation of lymphocytes, lymphocyte subgroups and monocytes: a review. **Lymphology**, volume, 2, 71-76, 1977.

BURGERING, B. M.; MEDEMA, R. H. Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/AKT is off duty. **J Leukoc Biol**, volume, 6, 689-701, 2003.

BYRNE, J. A.; MATTEI, M. G.; BASSET, P. Definition of the tumor protein D52 (TPD52) gene family through cloning of D52 homologues in human (hD53) and mouse (mD52). **Genomics**, volume, 3, 523-532, 1996.

BYRNE, J. A.; NOURSE, C. R.; BASSET, P.; GUNNING, P. Identification of homo- and heteromeric interactions between members of the breast carcinoma-associated D52 protein family using the yeast two-hybrid system. **Oncogene**, volume, 7, 873-881, 1998.

CAO, R.; TSUKADA, Y.; ZHANG, Y. Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. **Mol Cell**, volume, 6, 845-854, 2005.

CARDONE, M. H.; ROY, N.; STENNICKE, H. R.; SALVESEN, G. S.; FRANKE, T. F.; STANBRIDGE, E.; FRISCH, S.; REED, J. C. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. **Science**, volume, 5392, 1318-1321, 1998.

CARLESSO, N.; FRANK, D. A.; GRIFFIN, J. D. Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/ABL. **J Exp Med**, volume, 3, 811-820, 1996.

CHEN, Q.; GONG, B.; MAHMOUD-AHMED, A. S.; ZHOU, A.; HSI, E. D.; HUSSEIN, M.; ALMASAN, A. Apo2L/TRAIL and Bcl-2-related proteins regulate type I interferon-induced apoptosis in multiple myeloma. **Blood**, volume, 7, 2183-2192, 2001.

CHIOREAN, E. G.; DYLLA, S. J.; OLSEN, K.; LENVIK, T.; SOIGNIER, Y.; MILLER, J. S. BCR/ABL alters the function of NK cells and the acquisition of killer immunoglobulin-like receptors (KIRs). **Blood**, volume, 9, 3527-3533, 2003.

CHUAQUI, R. F.; BONNER, R. F.; BEST, C. J.; GILLESPIE, J. W.; FLAIG, M. J.; HEWITT, S. M.; PHILLIPS, J. L.; KRIZMAN, D. B.; TANGREA, M. A.; AHAM, M.; LINEHAN, W. M.; KNEZEVIC, V.; EMMERT-BUCK, M. R. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. **Nat Genet**, volume, 509-514, 2002.

CHUNTHARAPAI, A.; DODGE, K.; GRIMMER, K.; SCHROEDER, K.; MARSTERS, S. A.; KOEPPEN, H.; ASHKENAZI, A.; KIM, K. J. Isotype-dependent inhibition of tumor growth in vivo by monoclonal antibodies to death receptor 4. **J Immunol**, volume, 8, 4891-4898, 2001.

CLARKE, N.; JIMENEZ-LARA, A. M.; VOLTZ, E.; GRONEMEYER, H. Tumor suppressor IRF-1 mediates retinoid and interferon anticancer signaling to death ligand TRAIL. **Embo J**, volume, 15, 3051-3060, 2004.

COLLINS, S. A.; GUINN, B. A.; HARRISON, P. T.; SCALLAN, M. F.; O'SULLIVAN, G. C.; TANGNEY, M. Viral vectors in cancer immunotherapy: which vector for which strategy? **Curr Gene Ther**, volume, 2, 66-78, 2008.

CRETNEY, E.; TAKEDA, K.; YAGITA, H.; GLACCUM, M.; PESCHON, J. J.; SMYTH, M. J. Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. **J Immunol**, volume, 3, 1356-1361, 2002.

DAI, Z.; QUACKENBUSH, R. C.; COURTNEY, K. D.; GROVE, M.; CORTEZ, D.; REUTHER, G. W.; PENDERGAST, A. M. Oncogenic ABL and Src tyrosine kinases elicit the ubiquitin-dependent degradation of target proteins through a Ras-independent pathway. **Genes Dev**, volume, 10, 1415-1424, 1998.

DANIELS, R. A.; TURLEY, H.; KIMBERLEY, F. C.; LIU, X. S.; MONGKOLSAPAYA, J.; CH'EN, P.; XU, X. N.; JIN, B. Q.; PEZZELLA, F.; SCREATON, G. R. Expression of TRAIL and TRAIL receptors in normal and malignant tissues. **Cell Res**, volume, 6, 430-438, 2005.

DATTA, S. R.; DUDEK, H.; TAO, X.; MASTERS, S.; FU, H.; GOTOH, Y.; GREENBERG, M. E. AKT phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. **Cell**, volume, 2, 231-241, 1997.

DE NAPOLES, M.; MERMOUD, J. E.; WAKAO, R.; TANG, Y. A.; ENDOH, M.; APPANAH, R.; NESTEROVA, T. B.; SILVA, J.; OTTE, A. P.; VIDAL, M.; KOSEKI, H.; BROCKDORFF, N. Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. **Dev Cell**, volume, 5, 663-676, 2004.

DE SANTA, F.; TOTARO, M. G.; PROSPERINI, E.; NOTARBARTOLO, S.; TESTA, G.; NATOLI, G. The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. **Cell**, volume, 6, 1083-1094, 2007.

DEININGER, M. W. Basic science going clinical: molecularly targeted therapy of chronic myelogenous leukemia. **J Cancer Res Clin Oncol**, volume, 2, 59-72, 2004.

DEININGER, M. W.; VIEIRA, S.; MENDIOLA, R.; SCHULTHEIS, B.; GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. **Cancer Res**, volume, 7, 2049-2055, 2000.

DIJKERS, P. F.; MEDEMA, R. H.; LAMMERS, J. W.; KOENDERMAN, L.; COFFER, P. J. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. **Curr Biol**, volume, 19, 1201-1204, 2000.

DROIN, N. M.; PINKOSKI, M. J.; DEJARDIN, E.; GREEN, D. R. Egr family members regulate nonlymphoid expression of Fas ligand, TRAIL, and tumor necrosis factor during immune responses. **Mol Cell Biol**, volume, 21, 7638-7647, 2003.



DRUKER, B. J.; TAMURA, S.; BUCHDUNGER, E.; OHNO, S.; SEGAL, G. M.; FANNING, S.; ZIMMERMANN, J.; LYDON, N. B. Effects of a selective inhibitor of the ABL tyrosine kinase on the growth of BCR-ABL positive cells. **Nat Med**, volume, 5, 561-566, 1996.

EMANUEL, P. D.; BATES, L. J.; CASTLEBERRY, R. P.; GUALTIERI, R. J.; ZUCKERMAN, K. S. Selective hypersensitivity to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by juvenile chronic myeloid leukemia hematopoietic progenitors. **Blood**, volume, 5, 925-929, 1991.

EPPING, M. T.; BERNARDS, R. A causal role for the human tumor antigen preferentially expressed antigen of melanoma in cancer. **Cancer Res**, volume, 22, 10639-10642, 2006.

EPPING, M. T.; WANG, L.; EDEL, M. J.; CARLEE, L.; HERNANDEZ, M.; BERNARDS, R. The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. **Cell**, volume, 6, 835-847, 2005.

EPPING, M. T.; WANG, L.; PLUMB, J. A.; LIEB, M.; GRONEMEYER, H.; BROWN, R.; BERNARDS, R. A functional genetic screen identifies retinoic acid signaling as a target of histone deacetylase inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, volume, 45, 17777-17782, 2007.

FADERL, S.; KANTARJIAN, H. M.; TALPAZ, M. Chronic myelogenous leukemia: update on biology and treatment. **Oncology (Williston Park)**, volume, 2, 169-180; discussion 181, 184, 1999.

FALSCHLEHNER, C.; EMMERICH, C. H.; GERLACH, B.; WALCZAK, H. TRAIL signalling: decisions between life and death. **Int J Biochem Cell Biol**, volume, 7-8, 1462-1475, 2007.

FANGER, N. A.; MALISZEWSKI, C. R.; SCHOOLEY, K.; GRIFFITH, T. S. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). **J Exp Med**, volume, 8, 1155-1164, 1999.

GAMBACORTI-PASSERINI, C.; LE COUTRE, P.; MOLOGNI, L.; FANELLI, M.; BERTAZZOLI, C.; MARCHESI, E.; DI NICOLA, M.; BIONDI, A.; CORNEO, G. M.; BELOTTI, D.; POGLIANI, E.; LYDON, N. B. Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. **Blood Cells Mol Dis**, volume, 3, 380-394, 1997.

GESBERT, F.; GRIFFIN, J. D. Bcr/ABL activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. **Blood**, volume, 6, 2269-2276, 2000.

GHAFFARI, S.; JAGANI, Z.; KITIDIS, C.; LODISH, H. F.; KHOSRAVI-FAR, R. Cytokines and BCR-ABL mediate suppression of TRAIL-induced apoptosis through inhibition of forkhead FOXO3a transcription factor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, volume, 11, 6523-6528, 2003.

GOLDMAN, J. M.; DRUKER, B. J. Chronic myeloid leukemia: current treatment options. **Blood**, volume, 7, 2039-2042, 2001.

GORDON, M. Y.; DOWDING, C. R.; RILEY, G. P.; GOLDMAN, J. M.; GREAVES, M. F. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. **Nature**, volume, 6128, 342-344, 1987.

GORRE, M. E.; SAWYERS, C. L. Molecular mechanisms of resistance to STI571 in chronic myeloid leukemia. **Curr Opin Hematol**, volume, 4, 303-307, 2002.

GREINER, J.; RINGHOFFER, M.; TANIGUCHI, M.; LI, L.; SCHMITT, A.; SHIKU, H.; DOHNER, H.; SCHMITT, M. mRNA expression of leukemia-associated antigens in patients with acute myeloid leukemia for the development of specific immunotherapies. **Int J Cancer**, volume, 5, 704-711, 2004.

GRIFFITH, T. S.; STOKES, B.; KUCABA, T. A.; EAREL, J. K., JR.; VANOOSTEN, R. L.; BRINCK, E. L.; NORIAN, L. A. TRAIL gene therapy: from preclinical development to clinical application. **Curr Gene Ther**, volume, 1, 9-19, 2009.

HAMDANE, M.; DAVID-CORDONNIER, M. H.; D'HALLUIN, J. C. Activation of p65 NF-kappaB protein by p210BCR-ABL in a myeloid cell line (P210BCR-ABL activates p65 NF-kappaB). **Oncogene**, volume, 19, 2267-2275, 1997.

HAQQ, C.; NOSRATI, M.; SUDILOVSKY, D.; CROTHERS, J.; KHODABAKHSH, D.; PULLIAM, B. L.; FEDERMAN, S.; MILLER, J. R., 3RD; ALLEN, R. E.; SINGER, M. I.; LEONG, S. P.; LJUNG, B. M.; SAGEBIEL, R. W.; KASHANI-SABET, M. The gene expression signatures of melanoma progression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, volume, 17, 6092-6097, 2005.

HOCHHAUS, A.; KREIL, S.; CORBIN, A. S.; LA ROSEE, P.; MULLER, M. C.; LAHAYE, T.; HANFSTEIN, B.; SCHOCH, C.; CROSS, N. C.; BERGER, U.; GSCHAIDMEIER, H.; DRUKER, B. J.; HEHLMANN, R. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to Imatinib (STI571) therapy. **Leukemia**, volume, 11, 2190-2196, 2002.

HOEK, K. S.; SCHLEGEL, N. C.; BRAFFORD, P.; SUCKER, A.; UGUREL, S.; KUMAR, R.; WEBER, B. L.; NATHANSON, K. L.; PHILLIPS, D. J.; HERLYN, M.; SCHADENDORF, D.; DUMMER, R. Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. **Pigment Cell Res**, volume, 4, 290-302, 2006.

HORITA, M.; ANDREU, E. J.; BENITO, A.; ARBONA, C.; SANZ, C.; BENET, I.; PROSPER, F.; FERNANDEZ-LUNA, J. L. Blockade of the BCR-ABL kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. **J Exp Med**, volume, 6, 977-984, 2000.

IKEDA, H.; LETHE, B.; LEHMANN, F.; VAN BAREN, N.; BAURAIN, J. F.; DE SMET, C.; CHAMBOST, H.; VITALE, M.; MORETTA, A.; BOON, T.; COULIE, P. G. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. **Immunity**, volume, 2, 199-208, 1997.

ILARIA, R. L., JR.; VAN ETEN, R. A. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. **J Biol Chem**, volume, 49, 31704-31710, 1996.

INSINGA, A.; MONESTIROLI, S.; RONZONI, S.; GELMETTI, V.; MARCHESI, F.; VIALE, A.; ALTUCCI, L.; NERVI, C.; MINUCCI, S.; PELICCI, P. G. Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. **Nat Med**, volume, 1, 71-76, 2005.

JAGANI, Z.; SINGH, A.; KHOSRAVI-FAR, R. FoxO tumor suppressors and BCR-ABL-induced leukemia: a matter of evasion of apoptosis. **Biochim Biophys Acta**, volume, 1, 63-84, 2008.

JAYARAMAN, T.; MARKS, A. R. Calcineurin is downstream of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the apoptotic and cell growth pathways. **J Biol Chem**, volume, 9, 6417-6420, 2000.

KALIDAS, M.; KANTARJIAN, H.; TALPAZ, M. Chronic myelogenous leukemia. **Jama**, volume, 8, 895-898, 2001.

KAPLAN, J. M. Adenovirus-based cancer gene therapy. **Curr Gene Ther**, volume, 6, 595-605, 2005.

KAYAGAKI, N.; YAMAGUCHI, N.; NAKAYAMA, M.; ETO, H.; OKUMURA, K.; YAGITA, H. Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. **J Exp Med**, volume, 9, 1451-1460, 1999.

KESSLER, J. H.; BEEKMAN, N. J.; BRES-VLOEMANS, S. A.; VERDIJK, P.; VAN VEELLEN, P. A.; KLOOSTERMAN-JOOSTEN, A. M.; VISSERS, D. C.; TEN BOSCH, G. J.; KESTER, M. G.; SIJTS, A.; WOUTER DRIJFHOUT, J.; OSSENDORP, F.; OFFRINGA, R.; MELIEF, C. J. Efficient identification of novel HLA-A(\*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. **J Exp Med**, volume, 1, 73-88, 2001.

KIKUCHI, S.; NAGAI, T.; KUNITAMA, M.; KIRITO, K.; OZAWA, K.; KOMATSU, N. Active FKHRL1 overcomes Imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia-derived cell lines via the production of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. **Cancer Sci**, volume, 12, 1949-1958, 2007.

KONTOU, M.; WILL, R. D.; ADELFAK, C.; WITTIG, R.; POUSTKA, A.; HIRSCH-KAUFFMANN, M.; SCHWEIGER, M. Thioredoxin, a regulator of gene expression. **Oncogene**, volume, 12, 2146-2152, 2004.

LAN, F.; BAYLISS, P. E.; RINN, J. L.; WHETSTINE, J. R.; WANG, J. K.; CHEN, S.; IWASE, S.; ALPATOV, R.; ISSAEVA, I.; CANAANI, E.; ROBERTS, T. M.; CHANG, H. Y.; SHI, Y. A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. **Nature**, volume, 7163, 689-694, 2007.

LANIER, L. L. NK cell recognition. **Annu Rev Immunol**, volume, 225-274, 2005.

LEE, M. G.; VILLA, R.; TROJER, P.; NORMAN, J.; YAN, K. P.; REINBERG, D.; DI CROCE, L.; SHIEKHATTAR, R. Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. **Science**, volume, 5849, 447-450, 2007.

LIM, S. H.; COLEMAN, S. Chronic myeloid leukemia as an immunological target. **Am J Hematol**, volume, 1, 61-67, 1997.

LOTEM, J.; KAMA, R.; SACHS, L. Suppression or induction of apoptosis by opposing pathways downstream from calcium-activated calcineurin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, volume, 21, 12016-12020, 1999.

LUO, X.; BUDIARDJO, I.; ZOU, H.; SLAUGHTER, C.; WANG, X. BID, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. **Cell**, volume, 4, 481-490, 1998.

MAHON, F. X.; DEININGER, M. W.; SCHULTHEIS, B.; CHABROL, J.; REIFFERS, J.; GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. **Blood**, volume, 3, 1070-1079, 2000.

MAYO, L. D.; DONNER, D. B. A phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, volume, 20, 11598-11603, 2001.

MAZZOCCO, M.; MAFFEI, M.; EGEO, A.; VERGANO, A.; ARRIGO, P.; DI LISI, R.; GHIOTTO, F.; SCARTEZZINI, P. The identification of a novel human homologue of the SH3 binding glutamic acid-rich (SH3BGR) gene estABLishes a new family of highly conserved small proteins related to Thioredoxin Superfamily. **Gene**, volume, 1-2, 233-239, 2002.

MCGAHON, A.; BISSONNETTE, R.; SCHMITT, M.; COTTER, K. M.; GREEN, D. R.; COTTER, T. G. BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. **Blood**, volume, 5, 1179-1187, 1994.

MCLAUGHLIN, J.; CHIANESE, E.; WITTE, O. N. In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the P210 BCR/ABL oncogene product of the Philadelphia chromosome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, volume, 18, 6558-6562, 1987.

MELO, J. V. The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. **Leukemia**, volume, 5, 751-756, 1996.

MODUR, V.; NAGARAJAN, R.; EVERS, B. M.; MILBRANDT, J. FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer. **J Biol Chem**, volume, 49, 47928-47937, 2002.

NAKAMURA, H.; NAKAMURA, K.; YODOI, J. Redox regulation of cellular activation. **Annu Rev Immunol**, volume, 351-369, 1997.

NEBBIOSO, A.; CLARKE, N.; VOLTZ, E.; GERMAIN, E.; AMBROSINO, C.; BONTEMPO, P.; ALVAREZ, R.; SCHIAVONE, E. M.; FERRARA, F.; BRESCIANI, F.; WEISZ, A.; DE LERA, A. R.; GRONEMEYER, H.; ALTUCCI, L. Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. **Nat Med**, volume, 1, 77-84, 2005.

NEUMANN, E.; ENGELSBERG, A.; DECKER, J.; STORKEL, S.; JAEGER, E.; HUBER, C.; SELIGER, B. Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies? **Cancer Res**, volume, 18, 4090-4095, 1998.

NEVIANI, P.; SANTHANAM, R.; TROTTA, R.; NOTARI, M.; BLASER, B. W.; LIU, S.; MAO, H.; CHANG, J. S.; GALIETTA, A.; UTTAM, A.; ROY, D. C.; VALTIERI, M.; BRUNER-KLISOVIC, R.; CALIGIURI, M. A.; BLOOMFIELD, C. D.; MARCUCCI, G.; PERROTTI, D. The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. **Cancer Cell**, volume, 5, 355-368, 2005.

NIEBOROWSKA-SKORSKA, M.; HOSER, G.; KOSSEV, P.; WASIK, M. A.; SKORSKI, T. Complementary functions of the antiapoptotic protein A1 and serine/threonine kinase pim-1 in the BCR/ABL-mediated leukemogenesis. **Blood**, volume, 12, 4531-4539, 2002.

NIMMANAPALLI, R.; POROSNICU, M.; NGUYEN, D.; WORTHINGTON, E.; O'BRYAN, E.; PERKINS, C.; BHALLA, K. Cotreatment with STI-571 enhances tumor necrosis factor alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL or apo-2L)-induced apoptosis of BCR-ABL-positive human acute leukemia cells. **Clin Cancer Res**, volume, 2, 350-357, 2001.

OBERTHURER, A.; HERO, B.; SPITZ, R.; BERTHOLD, F.; FISCHER, M. The tumor-associated antigen PRAME is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome. **Clin Cancer Res**, volume, 13, 4307-4313, 2004.

OEHLER, V. G.; GUTHRIE, K. A.; CUMMINGS, C. L.; SABO, K.; WOOD, B. L.; GOOLEY, T.; YANG, T.; EPPING, M. T.; SHOU, Y.; POGOSOVA-AGADJANYAN, E.; LADNE, P.; STIREWALT, D. L.; ABKOWITZ, J. L.; RADICH, J. P. The preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME) inhibits myeloid differentiation in normal hematopoietic and leukemic progenitor cells. **Blood**, volume, 2009.

OHM, J. E.; MCGARVEY, K. M.; YU, X.; CHENG, L.; SCHUEBEL, K. E.; COPE, L.; MOHAMMAD, H. P.; CHEN, W.; DANIEL, V. C.; YU, W.; BERMAN, D. M.; JENUWEIN, T.; PRUITT, K.; SHARKIS, S. J.; WATKINS, D. N.; HERMAN, J. G.; BAYLIN, S. B. A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. **Nat Genet**, volume, 2, 237-242, 2007.

OHNO, R. Treatment of chronic myeloid leukemia with Imatinib mesylate. **Int J Clin Oncol**, volume, 3, 176-183, 2006.

PANE, F.; INTRIERI, M.; QUINTARELLI, C.; IZZO, B.; MUCCIOLI, G. C.; SALVATORE, F. BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations. **Oncogene**, volume, 56, 8652-8667, 2002.

PAYDAS, S.; TANRIVERDI, K.; YAVUZ, S.; DISEL, U.; BASLAMISLI, F.; BURGUT, R. PRAME mRNA levels in cases with acute leukemia: clinical importance and future prospects. **Am J Hematol**, volume, 4, 257-261, 2005.

PENDERGAST, A. M.; QUILLIAM, L. A.; CRIPE, L. D.; BASSING, C. H.; DAI, Z.; LI, N.; BATZER, A.; RABUN, K. M.; DER, C. J.; SCHLESSINGER, J.; ET AL. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. **Cell**, volume, 1, 175-185, 1993.

PITTI, R. M.; MARSTERS, S. A.; RUPPERT, S.; DONAHUE, C. J.; MOORE, A.; ASHKENAZI, A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. **J Biol Chem**, volume, 22, 12687-12690, 1996.

POPNIKOLOV, N. K.; GATALICA, Z.; ADEGBOYEGA, P. A.; NORRIS, B. A.; PASRICHA, P. J. Downregulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L in Barrett's esophagus with dysplasia and adenocarcinoma. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, volume, 2, 161-165, 2006.

PUIL, L.; LIU, J.; GISH, G.; MBAMALU, G.; BOWTELL, D.; PELICCI, P. G.; ARLINGHAUS, R.; PAWSON, T. BCR-ABL oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. **Embo J**, volume, 4, 764-773, 1994.

QUINTARELLI, C.; DOTTI, G.; DE ANGELIS, B.; HOYOS, V.; MIMS, M.; LUCIANO, L.; HESLOP, H. E.; ROONEY, C. M.; PANE, F.; SAVOLDO, B. Cytotoxic T lymphocytes directed to the preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) target chronic myeloid leukemia. **Blood**, volume, 5, 1876-1885, 2008.

RADICH, J. P.; DAI, H.; MAO, M.; OEHLER, V.; SCHELTER, J.; DRUKER, B.; SAWYERS, C.; SHAH, N.; STOCK, W.; WILLMAN, C. L.; FRIEND, S.; LINSLEY, P. S. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, volume, 8, 2794-2799, 2006.

REN, R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. **Nat Rev Cancer**, volume, 3, 172-183, 2005.

REUTHER, J. Y.; REUTHER, G. W.; CORTEZ, D.; PENDERGAST, A. M.; BALDWIN, A. S., JR. A requirement for NF-kappaB activation in BCR-ABL-mediated transformation. **Genes Dev**, volume, 7, 968-981, 1998.

REZVANI, K.; YONG, A. S.; TAWAB, A.; JAFARPOUR, B.; ENIAFE, R.; MIELKE, S.; SAVANI, B. N.; KEYVANFAR, K.; LI, Y.; KURLANDER, R.; BARRETT, A. J. Ex vivo characterization of polyclonal memory CD8+ T-cell responses to PRAME-specific peptides in patients with acute lymphoblastic leukemia and acute and chronic myeloid leukemia. **Blood**, volume, 10, 2245-2255, 2009.

RHODES, D. R.; YU, J.; SHANKER, K.; DESHPANDE, N.; VARAMBALLY, R.; GHOSH, D.; BARRETTE, T.; PANDEY, A.; CHINNAIYAN, A. M. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. **Neoplasia**, volume, 1, 1-6, 2004.

RICHARDSON, A. L.; WANG, Z. C.; DE NICOLO, A.; LU, X.; BROWN, M.; MIRON, A.; LIAO, X.; IGLEHART, J. D.; LIVINGSTON, D. M.; GANESAN, S. X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. **Cancer Cell**, volume, 2, 121-132, 2006.

RODRIGUEZ, C.; CAUSSE, A.; URSULE, E.; THEILLET, C. At least five regions of imbalance on 6q in breast tumors, combining losses and gains. **Genes Chromosomes Cancer**, volume, 1, 76-84, 2000.

ROKMAN, A.; KOIVISTO, P. A.; MATIKAINEN, M. P.; KUUKASJARVI, T.; POUTIAINEN, M.; HELIN, H. J.; KARHU, R.; KALLIONIEMI, O. P.; SCHLEUTKER, J. Genetic changes in familial prostate cancer by comparative genomic hybridization. **Prostate**, volume, 3, 233-239, 2001.

ROMAN-GOMEZ, J.; JIMENEZ-VELASCO, A.; AGIRRE, X.; CASTILLEJO, J. A.; NAVARRO, G.; JOSE-ENERIZ, E. S.; GARATE, L.; CORDEU, L.; CERVANTES, F.; PROSPER, F.; HEINIGER, A.; TORRES, A. Epigenetic regulation of PRAME gene in chronic myeloid leukemia. **Leuk Res**, volume, 11, 1521-1528, 2007.

ROTH, R. B.; HEVEZI, P.; LEE, J.; WILLHITE, D.; LECHNER, S. M.; FOSTER, A. C.; ZLOTNIK, A. Gene expression analyses reveal molecular relationships among 20 regions of the human CNS. **Neurogenetics**, volume, 2, 67-80, 2006.

SAKAKURA, C.; HAGIWARA, A.; TANIGUCHI, H.; YAMAGUCHI, T.; YAMAGISHI, H.; TAKAHASHI, T.; KOYAMA, K.; NAKAMURA, Y.; ABE, T.; INAZAWA, J. Chromosomal aberrations in human hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus infection detected by comparative genomic hybridization. **Br J Cancer**, volume, 12, 2034-2039, 1999.

SATO, K.; HIDA, S.; TAKAYANAGI, H.; YOKOCHI, T.; KAYAGAKI, N.; TAKEDA, K.; YAGITA, H.; OKUMURA, K.; TANAKA, N.; TANIGUCHI, T.; OGASAWARA, K. Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. **Eur J Immunol**, volume, 11, 3138-3146, 2001.

SATTLER, M.; MOHI, M. G.; PRIDE, Y. B.; QUINNAN, L. R.; MALOUF, N. A.; PODAR, K.; GESBERT, F.; IWASAKI, H.; LI, S.; VAN ETTEN, R. A.; GU, H.; GRIFFIN, J. D.; NEEL, B. G. Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. **Cancer Cell**, volume, 5, 479-492, 2002.

SAWYERS, C. Targeted cancer therapy. **Nature**, volume, 7015, 294-297, 2004.  
SAWYERS, C. L. Chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med**, volume, 17, 1330-1340, 1999.

SAWYERS, C. L.; MCLAUGHLIN, J.; WITTE, O. N. Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the BCR-ABL oncogene. **J Exp Med**, volume, 1, 307-313, 1995.

SCHENK, T.; STENGEL, S.; GOELLNER, S.; STEINBACH, D.; SALUZ, H. P. Hypomethylation of PRAME is responsible for its aberrant overexpression in human malignancies. **Genes Chromosomes Cancer**, volume, 9, 796-804, 2007.

SCHLESINGER, Y.; STRAUSSMAN, R.; KESHET, I.; FARKASH, S.; HECHT, M.; ZIMMERMAN, J.; EDEN, E.; YAKHINI, Z.; BEN-SHUSHAN, E.; REUBINOFF, B. E.; BERGMAN, Y.; SIMON, I.; CEDAR, H. Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. **Nat Genet**, volume, 2, 232-236, 2007.

SCHMALTZ, C.; ALPDOGAN, O.; KAPPEL, B. J.; MURIGLAN, S. J.; ROTOLO, J. A.; ONGCHIN, J.; WILLIS, L. M.; GREENBERG, A. S.; ENG, J. M.; CRAWFORD, J. M.; MURPHY, G. F.; YAGITA, H.; WALCZAK, H.; PESCHON, J. J.; VAN DEN BRINK, M. R. T cells require TRAIL for optimal graft-versus-tumor activity. **Nat Med**, volume, 12, 1433-1437, 2002.

SCHUETTENGRUBER, B.; CHOURROUT, D.; VERVOORT, M.; LEBLANC, B.; CAVALLI, G. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. **Cell**, volume, 4, 735-745, 2007.

SEDDER, L. M.; GLACCUM, M. B.; SCHUH, J. C.; KANALY, S. T.; WILLIAMSON, E.; KAYAGAKI, N.; YUN, T.; SMOLAK, P.; LE, T.; GOODWIN, R.; GLINIAK, B. Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice. **Eur J Immunol**, volume, 8, 2246-2254, 2002.



SHEHATA, M.; BIECHE, I.; BOUTROS, R.; WEIDENHOFER, J.; FANAYAN, S.; SPALDING, L.; ZEPS, N.; BYTH, K.; BRIGHT, R. K.; LIDEREAU, R.; BYRNE, J. A. Nonredundant functions for tumor protein D52-like proteins support specific targeting of TPD52. **Clin Cancer Res**, volume, 16, 5050-5060, 2008.

SHUAI, K.; HALPERN, J.; TEN HOEVE, J.; RAO, X.; SAWYERS, C. L. Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. **Oncogene**, volume, 2, 247-254, 1996.

SHYAMSUNDAR, R.; KIM, Y. H.; HIGGINS, J. P.; MONTGOMERY, K.; JORDEN, M.; SETHURAMAN, A.; VAN DE RIJN, M.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P. O.; POLLACK, J. R. A DNA microarray survey of gene expression in normal human tissues. **Genome Biol**, volume, 3, R22, 2005.

SIEGMUND, D.; HAUSSER, A.; PETERS, N.; SCHEURICH, P.; WAJANT, H. Tumor necrosis factor (TNF) and phorbol ester induce TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) under critical involvement of NF-kappa B essential modulator (NEMO)/IKKgamma. **J Biol Chem**, volume, 47, 43708-43712, 2001.

SKORSKI, T.; BELLACOSA, A.; NIEBOROWSKA-SKORSKA, M.; MAJEWSKI, M.; MARTINEZ, R.; CHOI, J. K.; TROTTA, R.; WLODARSKI, P.; PERROTTI, D.; CHAN, T. O.; WASIK, M. A.; TSICHLIS, P. N.; CALABRETTA, B. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/AKT-dependent pathway. **Embo J**, volume, 20, 6151-6161, 1997.

SKORSKI, T.; KANAKARAJ, P.; NIEBOROWSKA-SKORSKA, M.; RATAJCZAK, M. Z.; WEN, S. C.; ZON, G.; GEWIRTZ, A. M.; PERUSSIA, B.; CALABRETTA, B. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. **Blood**, volume, 2, 726-736, 1995.

SOVERINI, S.; MARTINELLI, G.; AMABILE, M.; POERIO, A.; BIANCHINI, M.; ROSTI, G.; PANE, F.; SAGLIO, G.; BACCARANI, M. Denaturing-HPLC-based assay for detection of ABL mutations in chronic myeloid leukemia patients resistant to Imatinib. **Clin Chem**, volume, 7, 1205-1213, 2004.

STAHL, M.; DIJKERS, P. F.; KOPS, G. J.; LENS, S. M.; COFFER, P. J.; BURGERING, B. M.; MEDEMA, R. H. The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. **J Immunol**, volume, 10, 5024-5031, 2002.

STEARMAN, R. S.; DWYER-NIELD, L.; ZERBE, L.; BLAINE, S. A.; CHAN, Z.; BUNN, P. A., JR.; JOHNSON, G. L.; HIRSCH, F. R.; MERRICK, D. T.; FRANKLIN, W. A.; BARON, A. E.; KEITH, R. L.; NEMENOFF, R. A.; MALKINSON, A. M.; GERACI, M. W. Analysis of orthologous gene expression between human pulmonary adenocarcinoma and a carcinogen-induced murine model. **Am J Pathol**, volume, 6, 1763-1775, 2005.

STEINBACH, D.; HERMANN, J.; VIEHMANN, S.; ZINTL, F.; GRUHN, B. Clinical implications of PRAME gene expression in childhood acute myeloid leukemia. **Cancer Genet Cytogenet**, volume, 2, 118-123, 2002a.

STEINBACH, D.; VIEHMANN, S.; ZINTL, F.; GRUHN, B. PRAME gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Genet Cytogenet**, volume, 1, 89-91, 2002b.

STERNBERG, D. W.; GILLILAND, D. G. The role of signal transducer and activator of transcription factors in leukemogenesis. **J Clin Oncol**, volume, 2, 361-371, 2004.

SU, A. I.; COOKE, M. P.; CHING, K. A.; HAKAK, Y.; WALKER, J. R.; WILTSHIRE, T.; ORTH, A. P.; VEGA, R. G.; SAPINOSO, L. M.; MOQRICH, A.; PATAPOUTIAN, A.; HAMPTON, G. M.; SCHULTZ, P. G.; HOGENESCH, J. B. Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, volume, 7, 4465-4470, 2002.

SU, A. I.; WILTSHIRE, T.; BATALOV, S.; LAPP, H.; CHING, K. A.; BLOCK, D.; ZHANG, J.; SODEN, R.; HAYAKAWA, M.; KREIMAN, G.; COOKE, M. P.; WALKER, J. R.; HOGENESCH, J. B. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, volume, 16, 6062-6067, 2004.

TAKEDA, K.; SMYTH, M. J.; CRETNEY, E.; HAYAKAWA, Y.; KAYAGAKI, N.; YAGITA, H.; OKUMURA, K. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. **J Exp Med**, volume, 2, 161-169, 2002.

TAKEDA, K.; SMYTH, M. J.; CRETNEY, E.; HAYAKAWA, Y.; YAMAGUCHI, N.; YAGITA, H.; OKUMURA, K. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. **Cell Immunol**, volume, 2, 194-200, 2001.

TAKEDA, K.; YAMAGUCHI, N.; AKIBA, H.; KOJIMA, Y.; HAYAKAWA, Y.; TANNER, J. E.; SAYERS, T. J.; SEKI, N.; OKUMURA, K.; YAGITA, H.; SMYTH, M. J. Induction of tumor-specific T cell immunity by anti-DR5 antibody therapy. **J Exp Med**, volume, 4, 437-448, 2004.

TAN, J.; YANG, X.; ZHUANG, L.; JIANG, X.; CHEN, W.; LEE, P. L.; KARUTURI, R. K.; TAN, P. B.; LIU, E. T.; YU, Q. Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. **Genes Dev**, volume, 9, 1050-1063, 2007.

TOMASELLO, E.; VIVIER, E. KARAP/DAP12/TYROBP: three names and a multiplicity of biological functions. **Eur J Immunol**, volume, 6, 1670-1677, 2005. TOMBAL, B.; WEERARATNA, A. T.; DENMEADE, S. R.; ISAACS, J. T. Thapsigargin induces a calmodulin/calcineurin-dependent apoptotic cascade

responsible for the death of prostatic cancer cells. **Prostate**, volume, 4, 303-317, 2000.

TRAN, H.; BRUNET, A.; GRENIER, J. M.; DATTA, S. R.; FORNACE, A. J., JR.; DISTEFANO, P. S.; CHIANG, L. W.; GREENBERG, M. E. DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. **Science**, volume, 5567, 530-534, 2002.

UNO, K.; INUKAI, T.; KAYAGAKI, N.; GOI, K.; SATO, H.; NEMOTO, A.; TAKAHASHI, K.; KAGAMI, K.; YAMAGUCHI, N.; YAGITA, H.; OKUMURA, K.; KOYAMA-OKAZAKI, T.; SUZUKI, T.; SUGITA, K.; NAKAZAWA, S. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) frequently induces apoptosis in Philadelphia chromosome-positive leukemia cells. **Blood**, volume, 9, 3658-3667, 2003.

VAN 'T VEER, L. J.; DAI, H.; VAN DE VIJVER, M. J.; HE, Y. D.; HART, A. A.; MAO, M.; PETERSE, H. L.; VAN DER KOOY, K.; MARTON, M. J.; WITTEVEEN, A. T.; SCHREIBER, G. J.; KERKHOVEN, R. M.; ROBERTS, C.; LINSLEY, P. S.; BERNARDS, R.; FRIEND, S. H. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, volume, 6871, 530-536, 2002.

VAN BAREN, N.; CHAMBOST, H.; FERRANT, A.; MICHAUX, L.; IKEDA, H.; MILLARD, I.; OLIVE, D.; BOON, T.; COULIE, P. G. PRAME, a gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells, is expressed in acute leukaemia cells. **Br J Haematol**, volume, 5, 1376-1379, 1998.

VAN HAAFTEN, G.; DALGLIESH, G. L.; DAVIES, H.; CHEN, L.; BIGNELL, G.; GREENMAN, C.; EDKINS, S.; HARDY, C.; O'MEARA, S.; TEAGUE, J.; BUTLER, A.; HINTON, J.; LATIMER, C.; ANDREWS, J.; BARTHORPE, S.; BEARE, D.; BUCK, G.; CAMPBELL, P. J.; COLE, J.; FORBES, S.; JIA, M.; JONES, D.; KOK, C. Y.; LEROY, C.; LIN, M. L.; MCBRIDE, D. J.; MADDISON, M.; MAQUIRE, S.; MCLAY, K.; MENZIES, A.; MIRONENKO, T.; MULDERRIG, L.; MUDIE, L.; PLEASANCE, E.; SHEPHERD, R.; SMITH, R.; STEBBINGS, L.; STEPHENS, P.; TANG, G.; TARPEY, P. S.; TURNER, R.; TURRELL, K.; VARIAN, J.; WEST, S.; WIDAA, S.; WRAY, P.; COLLINS, V. P.; ICHIMURA, K.; LAW, S.; WONG, J.; YUEN, S. T.; LEUNG, S. Y.; TONON, G.; DEPINHO, R. A.; TAI, Y. T.; ANDERSON, K. C.; KAHNOSKI, R. J.; MASSIE, A.; KHOO, S. K.; TEH, B. T.; STRATTON, M. R.; FUTREAL, P. A. Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. **Nat Genet**, volume, 5, 521-523, 2009.

VIGNESWARAN, N.; BAUCUM, D. C.; WU, J.; LOU, Y.; BOUQUOT, J.; MULLER, S.; ZACHARIAS, W. Repression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) but not its receptors during oral cancer progression. **BMC Cancer**, volume, 108, 2007.

WALCZAK, H.; MILLER, R. E.; ARIAIL, K.; GLINIAK, B.; GRIFFITH, T. S.; KUBIN, M.; CHIN, W.; JONES, J.; WOODWARD, A.; LE, T.; SMITH, C.; SMOLAK, P.; GOODWIN, R. G.; RAUCH, C. T.; SCHUH, J. C.; LYNCH, D. H.

Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. **Nat Med**, volume, 2, 157-163, 1999.

WANG, H.; WANG, L.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; VIDAL, M.; TEMPST, P.; JONES, R. S.; ZHANG, Y. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. **Nature**, volume, 7010, 873-878, 2004.

WANG, H. G.; PATHAN, N.; ETHELL, I. M.; KRAJEWSKI, S.; YAMAGUCHI, Y.; SHIBASAKI, F.; MCKEON, F.; BOBO, T.; FRANKE, T. F.; REED, J. C. Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. **Science**, volume, 5412, 339-343, 1999.

WANG, S.; EL-DEIRY, W. S. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. **Oncogene**, volume, 53, 8628-8633, 2003.

WATARI, K.; TOJO, A.; NAGAMURA-INOUE, T.; NAGAMURA, F.; TAKESHITA, A.; FUKUSHIMA, T.; MOTOJI, T.; TANI, K.; ASANO, S. Identification of a melanoma antigen, PRAME, as a BCR/ABL-inducible gene. **FEBS Lett**, volume, 2-3, 367-371, 2000.

WIDSCHWENDTER, M.; FIEGL, H.; EGGLE, D.; MUELLER-HOLZNER, E.; SPIZZO, G.; MARTH, C.; WEISENBERGER, D. J.; CAMPAN, M.; YOUNG, J.; JACOBS, I.; LAIRD, P. W. Epigenetic stem cell signature in cancer. **Nat Genet**, volume, 2, 157-158, 2007.

WILEY, S. R.; SCHOOLEY, K.; SMOLAK, P. J.; DIN, W. S.; HUANG, C. P.; NICHOLL, J. K.; SUTHERLAND, G. R.; SMITH, T. D.; RAUCH, C.; SMITH, C. A.; ET AL. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. **Immunity**, volume, 6, 673-682, 1995.

WILLENBROCK, K.; KUPPERS, R.; RENNE, C.; BRUNE, V.; ECKERLE, S.; WEIDMANN, E.; BRAUNINGER, A.; HANSMANN, M. L. Common features and differences in the transcriptome of large cell anaplastic lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. **Haematologica**, volume, 5, 596-604, 2006.

WILLIAMS, R. T.; SHERR, C. J. The INK4-ARF (CDKN2A/B) locus in hematopoiesis and BCR-ABL-induced leukemias. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, volume, 461-467, 2008.

ZHAO, Y.; TOZAWA, Y.; ISEKI, R.; MUKAI, M.; IWATA, M. Calcineurin activation protects T cells from glucocorticoid-induced apoptosis. **J Immunol**, volume, 12, 6346-6354, 1995.

**ANEXO I**

**ARTIGO SUBMETIDO**

**BCR-ABL-mediated up-regulation of *PRAME* is responsible for knocking down *TRAIL* in CML patients**

Daniel D. Carvalho<sup>1,2</sup>; Janine M. G. Leroy<sup>1,2</sup>; Jacqueline F. Jacysyn<sup>1,2</sup>; Maria Dulce Colassanti<sup>3</sup>; Rodrigo Proto-Siqueira<sup>4</sup>; Welbert O. Pereira<sup>1,2</sup>; Ana Elisa B. Bueno-Da-Silva<sup>1,2</sup>; Marco Antonio Zago<sup>4</sup>; Maria Aparecida Zanichelli<sup>3</sup>; Fabiola A. Castro<sup>2,5</sup>; Gustavo P. Amarante-Mendes<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brazil; <sup>2</sup>Instituto de Investigação em Imunologia, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, Brazil; <sup>3</sup>Hospital Brigadeiro, São Paulo, Brazil; <sup>4</sup>Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil; and <sup>5</sup>Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil

Corresponding author:

Gustavo P. Amarante-Mendes, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 1730 - Cidade Universitária, São Paulo, SP - 05508-900 - BRAZIL.  
Direct line: 55-11-3091-7362. FAX: 55-11-3091-7224.  
E-mail: gpam@usp.br

Abstract: 199 words

Text: 2750 words

7 figures

51 references

Short title: PRAME-mediated down-regulation of TRAIL in CML

Scientific category: MYELOID NEOPLASIA

## ABSTRACT

TRAIL, a member of the TNF- $\alpha$  family and a death receptor ligand, was shown to selectively kill tumor cells. Not surprisingly, TRAIL is down-regulated in a variety of tumor cells, including BCR-ABL-positive leukemia. Although we know much about the molecular basis of TRAIL-mediated cell killing, the mechanism responsible for TRAIL inhibition in tumors remains elusive. Because a) *TRAIL* can be regulated by retinoic acid; b) *PRAME* was shown to inhibit transcription of retinoic acid receptor target genes through the polycomb protein *EZH2*; and c) we have found that *TRAIL* is inversely correlated with *BCR-ABL* in CML patients, we decided to investigate the association of *PRAME*, *EZH2* and *TRAIL* in BCR-ABL-positive leukemia. Here, we demonstrate that *PRAME*, but not *EZH2*, is up-regulated in BCR-ABL cells and is associated with the progression of disease in CML patients. There is a positive correlation between *PRAME* and *BCR-ABL* and an inverse correlation between *PRAME* and *TRAIL* in these patients. Importantly, knocking down of *PRAME* or *EZH2* by RNA interference in a BCR-ABL-positive cell line restores *TRAIL* expression. Our data reveal a novel regulatory mechanism responsible for lowering *TRAIL* expression and provide the basis of alternative targets for combined therapeutic strategies for CML.

## INTRODUCTION

Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal myeloproliferative disorder of transformed hematopoietic progenitor cells. It is characterized by the Philadelphia chromosome (Ph), which is generated by a t(9;22)(q34;q11) translocation<sup>1,2</sup>. This translocation results in the appearance of the constitutively active chimeric protein tyrosine-kinase BCR-ABL, a hallmark of CML<sup>3</sup>. Expression of BCR-ABL activates multiple signaling pathways leading to proliferation, reduced growth factor-dependence, abnormal interaction with bone marrow extra-cellular matrix, and to an state of extreme resistance to apoptosis<sup>4-8</sup>. While the development of tyrosine-kinase inhibitors (TKIs) have revolutionized the treatment of BCR-ABL-positive leukemia, it has become increasingly clear that TKI treatment alone will not be curative in many cases, in particular in the advanced phase of the disease<sup>9</sup>. Thus, proper knowledge of molecular alterations triggered by the expression of BCR-ABL, especially during the disease progression, should provide rationale for the development of novel therapeutics strategies for CML.

TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) is a type II transmembrane protein belonging to the TNF- $\alpha$  family that is constitutively expressed in a wide range of tissues<sup>10</sup>. TRAIL is critically involved in anti-cancer surveillance by immune cells<sup>11-14</sup> and has also the ability to trigger apoptosis in a cell autonomous way, in a variety of tumor cell lines but not in most normal cells<sup>15,16</sup>. Importantly, TRAIL<sup>-/-</sup> mice display an increased susceptibility to tumor initiation and metastasis<sup>17,18</sup>, highlighting the importance of TRAIL in the defense against tumors. Therefore, it is not surprising that one of the key mechanisms of tumor escape is a general down-regulation of TRAIL. Despite the enormous amount of knowledge gained in the last few years on TRAIL regulation and TRAIL-mediated cell death, the molecular basis of TRAIL inhibition in tumors is poorly understood.

PRAME (preferentially expressed antigen of melanoma) is overexpressed in a variety of neoplasia, such as melanoma, breast carcinomas, renal cell carcinomas, non-small cell lung



carcinomas, head and neck cancers, Hodgkin's lymphomas, medulloblastomas, sarcomas, Wilm's tumors, myelocytic and lymphocytic leukemia<sup>19</sup>, but its expression is low or absent in normal tissues<sup>20</sup>. Although PRAME can triggers autologous cytotoxic T cell-mediated immune responses, its expression is preserved in several tumors cells, suggesting that *PRAME* expression can confer a selective advantage that outweighs its role in CTL-mediated tumor killing<sup>19,20</sup>. The way(s) *PRAME* overexpression contributes for the tumorigenic process still remains elusive.

We have recently observed that TRAIL is downregulated by BCR-ABL in cell lines as well as in PBMC obtained from CML patients (J.M.G.L and G.P.A.M., manuscript in preparation). Importantly, we found that decreased levels of TRAIL were associated with the progression of the disease. Because it is known that *TRAIL* can respond to retinoic acid (RA)<sup>15,21,22</sup> and that PRAME can act as a repressor of RA/retinoic acid receptor signaling<sup>23</sup>, we decided to investigate a possible association between upregulation of PRAME and decreased levels of TRAIL in CML.

We report here that BCR-ABL-mediated upregulation of PRAME is the molecular event responsible for knocking down TRAIL in Philadelphia chromosome-positive leukemia. The polycomb protein EZH2, which is necessary for PRAME-mediated transcriptional inhibition of *TRAIL*, is not a target of BCR-ABL. Finally, *in silico* analysis of gene-expression profiling studies suggest that the downregulation of TRAIL by PRAME may be a more general phenomenon characteristic of a variety of tumors. This implicates the transcription repressive activity of the PRAME/EZH2/RA/RAR complex in the *TRAIL* promoter as a possible major target for novel anti-cancer therapies.

## **Materials and Methods**

**Patient Samples.** All samples were obtained under protocols approved by all Hospitals and Institutional Ethics Committees after patient's written informed consent. Peripheral blood was

collected from 10 healthy individuals, 40 CML patients (11 chronic phase (CP), 10 accelerated phase (AP), 10 blastic phase (BP) and 09 with complete cytogenetic remission (CCyR) post- imatinib mesylate (Gleevec®) (400mg/day)). CML diagnosis of the patients enrolled in this study was confirmed by Ph chromosome and *BCR-ABL* rearrangement detection. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients and controls were isolated according to standard protocol with *Ficoll-Hypaque* 1,077 density technique.

**Plasmid construction and Antibodies.** *PRAME* and *EZH2* shRNA vectors were kind gifts of Dr. R. Bernards (Amsterdam, The Netherlands) and were generated as previously described<sup>23</sup>. Antibodies against *EZH2* (4905), and phospho-FOXO3a (9465) were from Cell Signaling. Anti-*PRAME* was from Abcam (ab32185), and anti-ACTIN was from ICN Biomedicals Inc (C4).

**Cell Culture and Cell Lines.** All cells were cultured in RPMI medium 1640 supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 25 mM Hepes, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin, except for Phoenix packaging cell, which were grown in DMEM medium supplemented with 10% FBS, 25 mM Hepes, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin and for KBM7 cell line which were grown in IMDM supplemented with 20% FBS, 25 mM Hepes, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. HL-60 and K562 cells were obtained from ATCC. LAMA-84 was kindly provided by James Griffin (Dana-Farber Cancer Institute, MA, USA). HL-60.Bcr-Abl cells were derived from wild-type HL-60 by retroviral transfection with pSRαMSVp185<sup>bcr-abl</sup>tkneo<sup>24,25</sup>. SKW6.4 cells were kindly provided by Dr. Henning Walczak (German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany). Phoenix packaging cells were transfected with retroviral plasmids to generate amphotropic retroviruses. K562 were infected with pRS or pRS-*PRAME* or pRS-*EZH2* #3 or pRS-*EZH2* #4 retrovirus and selected for puromycin resistance.

**Western-Blot.** Protein samples were resolved under reducing conditions as previously described<sup>26</sup>. Separated proteins were blotted onto polyvinylidene difluoride membranes and reactions

were detected with suitable secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA and Amersham, Arlington, IL, USA) using enhanced chemiluminescence (Pierce, Rockford, IL, USA).

**Quantitative PCR.** Total RNA was extracted using Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA concentration and purity were determined spectrophotometrically by measuring fluorescence at 260 nm and 280 nm. Three microgram of RNA was reverse transcribed into cDNA in a total volume of 20 µl using Superscript III (Invitrogen) transcription reagents according to the manufacturer's instructions. After obtaining the cDNA, genes expression was quantified by qPCR methodology using Platinum SYBRGreen Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in Mx3005P detector equipment (Stratagene, USA). qPCR conditions were as follows: enzyme activation at 94 °C for 15 min, initial denaturation at 94 °C for 15 s, annealing temperature specific for each gene during 25 s and extension at 72 °C for 30 s (50 cycles). The following primers, with its respective annealing temperature, were used: *BCR-ABL* 5'-GGG GTC CAG CGA GAA GGT T-3' (forward) and 5'-GCA TTC CGC TGA CCA TCA AT-3' (reverse), 60°C; *GAPDH* 5'-GGA GAA GGC TGG GGC TCA T-3' (forward) and 5'-GTC CTT CCA CGA TAC CAA AGT T-3' (reverse), 60°C; *TRAIL* 5'- AAG GCT CTG GGC CGC AAA ATA AAC-3' (forward) and 5'-GCC AAC TAA AAA GGC CCC GAA AAA-3' (reverse), 59°C; *EZH2* 5'-AGG ACG GCT CCT CTA ACC AT-3' (forward) and 5'-CTT GGT GTT GCA CTG TGC TT-3' (reverse), 56°C. Results were given as relative expression, *amplicon* ratio: investigated *gene/gapdh* housekeeping gene. The PRAME quantitative PCR was performed using TaqMan PCR master mix as previously described<sup>27</sup>.

**Meta-analysis.** Patient information and gene expression data was obtained from and analyzed using Oncomine. The microarray meta-analysis algorithms and statistical analysis used were as previously described<sup>28</sup>. p-values were calculated as described at <http://www.oncomine.org>, using adjustment for multiple testing and false discovery<sup>28</sup>.

**Statistical Analysis.** Experiments were performed always in triplicates and at least three times. Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison tests were used to compare gene expression data from controls and CML patients in different phases of the disease. Associations between *BCR-ABL* and *PRAME* or between *PRAME* and *TRAIL* mRNA levels were assessed through non-parametric Spearman's rank correlation test. One-way ANOVA and Tukey's post-test were used to compare gene expression data from knockdown cell lines. Differences between experimental groups were considered significant when  $p < 0,05$ . All statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

## RESULTS

### ***PRAME* but not *EZH2* is a BCR-ABL induced gene**

We first surveyed human leukemia cell lines for expression of *PRAME* and *EZH2* and verified that cell lines endogenously expressing BCR-ABL, such as KBM7, LAMA8.4 and K562, showed higher expression of *PRAME* than the BCR-ABL-negative cell lines, SKW6.4, THP1 e HL60 (Fig. 1A). The expression of *EZH2* was not significantly different between BCR-ABL-positive and -negative cells (Fig. 1B). To confirm that the relatively higher level of *PRAME* is a direct consequence of the expression of BCR-ABL we compared the mRNA levels of *PRAME* in our HL-60.vector and HL-60.Bcr-Abl cell line and verified that the ectopic expression of BCR-ABL dramatically up-regulated *PRAME* (Fig. 1C).

Next, we quantitatively determined the mRNA of *PRAME* and *EZH2* in PBMC from healthy individuals and CML patients in different phases of the disease. We found that *PRAME* (Fig. 1D), but not *EZH2* (Fig. 1E), was up-regulated in CML patients when compared to the healthy controls. In addition, there was significant positive correlation between levels of *PRAME* and *BCR-ABL* (Fig. 1F;  $P < 0.0001$ ,  $r_s = 0.6117$ ). Altogether, these data confirm that

PRAME, but not EZH2 is a transcriptional target for BCR-ABL and its higher expression correlates with the progression of the disease.

#### **PRAME is responsible for BCR-ABL-mediated repression of TRAIL**

In the light that PRAME acts as a dominant repressor of RA/RAR signaling<sup>23</sup> and that TRAIL can be induced by retinoic acid treatment<sup>21,22</sup> we established a relationship analysis between PRAME and TRAIL in our cohort of CML patients. We found out a moderate but significant inverse correlation ( $P=0.0009$ ,  $rs=-0.4971$ ) between the expression of these two genes (Fig. 2A). In addition, we found no correlation between EZH2 and TRAIL (Fig. 2B).

To further confirm that the downregulation of TRAIL detected in BCR-ABL-positive cells is a direct consequence of Bcr-Abl-mediated upregulation of PRAME, we generated a CML blastic crisis-derived cell line, namely K562, stably infected with a shRNA against PRAME. The sequence-specific short hairpin RNA vector pRS-PRAME significantly reduced endogenous PRAME mRNA (Fig. 2C) and protein (Fig. 2D) in K562 cells. As we expected, knocking-down of PRAME significantly reverted the low levels of TRAIL found in wild-type K562 cells (Fig. 2E). This result is in agreement with a direct role of PRAME as a repressor of TRAIL in BCR-ABL-positive leukemia cell lines.

#### **EZH2 is required for PRAME-mediated repression of TRAIL**

Despite the fact that the expression of EZH2 is not modulated by BCR-ABL, EZH2 was shown to be required for the transcriptional repression activity of PRAME<sup>23</sup>. Therefore, we test the functional relevance of EZH2 in PRAME-mediated repression of TRAIL. We inhibited endogenous EZH2 in K562 cells using two specific shRNAs vectors (Figs. 3A,B) and verified that, as a result, TRAIL expression increased significantly (Fig. 3C). These data argue that although EZH2 does not seem to be a target for BCR-ABL, it is still an important mediator of PRAME-dependent repression of TRAIL.

#### **PRAME-induced downregulation of *TRAIL* is independent of FOXO3a phosphorylation state**

It was demonstrated that BCR-ABL-mediated inhibition of *TRAIL* is partially mediated via phosphorylation of FOXO3a, a member of FoxO family of transcription factors <sup>29</sup>. The members of the FoxO family are regulated by AKT-mediated phosphorylation which cause their re-localization to the cytoplasm, thereby preventing FoxO-dependent transcription <sup>30</sup>. To verify the possibility that the knocking down of *PRAME* or *EZH2* was interfering somehow with the activity of FOXO3a, we looked at the phosphorylation state of FOXO3a by western blot. We found out that in both cases it remained unchanged (Fig. 4A-B), suggesting that the upregulation of *TRAIL* observed after *PRAME* or *EZH2* knockdown (Fig. 2E and 3C) is independent of re-activation of FOXO3a.

#### ***Inverse correlation between PRAME and TRAIL in different tumors***

Finally, we addressed the question as whether downregulation of *TRAIL* by *PRAME* is a more general phenomenon in cancer patients, we performed a meta-analysis using the ONCOMINE platform (<http://www.oncomine.org>). By assessing 6 studies and more than 200 samples of lung adenocarcinoma, melanoma, breast carcinoma and matched healthy tissues (Figs. 5-7), we could find several situations where the expression of *PRAME* was inversely correlated with the expression of *TRAIL*, suggesting that *TRAIL* could be indeed a target for transcriptional regulation by *PRAME* in a variety of cancer.

## **DISCUSSION**

There are several evidences that *TRAIL* can act as a tumor suppressor. First, *TRAIL* knockout mice are more susceptible to tumorigenesis induced by chemical carcinogens and metastasis <sup>17,18</sup>. Second, experiments that used neutralizing antibodies against *TRAIL*

Q

demonstrated that it could significantly increase liver metastases in mice <sup>17,22</sup>. Indeed, several expression profiling surveys in cancer have shown that TRAIL expression is lost upon cancer progression <sup>31-33</sup> and there are diverse studies demonstrating that TRAIL expression is a central mediator of apoptosis in some cancer treatments such as retinoic acid, HDAC inhibitors and interferon <sup>21,22,34,35</sup>. These data suggest that TRAIL down-regulation has a central role in tumor initiation and/or progression, and that TRAIL re-expression is a promising therapeutic avenue to kill transformed cell lines without affecting normal cells.

PRAME is frequently expressed in many different cancers, <sup>19</sup>, including BCR-ABL-positive leukemia<sup>36-38</sup>. We confirmed that PRAME is a target for BCR-ABL tyrosine-kinase and showed that PRAME expression correlates well with BCR-ABL in CML patients, in particular as a marker of disease progression. Importantly, our results corroborate the suggestion that PRAME overexpression is involved in tumorigenesis, possibly by suppressing the retinoic acid signaling <sup>23</sup>. PRAME can bind to the retinoic acid receptor in the presence of retinoic acid and prevent receptor activation and target gene transcription. This mechanism seems to require the histone methyltransferase activity of the polycomb protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), which forms a complex with PRAME and mediate the epigenetic silence of the retinoic acid target genes <sup>23</sup>. As a result, PRAME may be able to confer growth or survival advantages to cancer cells. However, this mechanism has been well established only in melanoma and, presently, it is not clear whether PRAME inhibits RA signaling in other forms of cancer. In fact, PRAME expression was not found associated with down-regulation of the retinoic acid signaling in acute myeloid leukemia (AML)<sup>39</sup>. Interestingly, although PRAME is an independent prognostic marker of poor clinical outcome in different solid tumors <sup>40,41</sup>, in childhood AML patients, PRAME was shown to be rather a marker of favorable prognosis <sup>42</sup>.

Another important point that remains obscure is the nature of target genes that are repressed by the PRAME-EZH2-RAR-RA system and vital for one of more aspects of

tumorigenesis. At the moment, only the *p21* and the *RAR $\beta$*  expression were shown to be down-regulated in melanoma cells in a PRAME-mediated way<sup>23</sup>. Some evidences suggested that *TRAIL* expression could be regulated by PRAME. First, PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling<sup>23</sup>, whereas *TRAIL* is a gene inducible by retinoic acid treatment. Second, PRAME is capable of inhibiting the induction of apoptosis by HDAC inhibitors in a concentration-dependent manner<sup>43</sup>, an event shown to be modulated, at least in leukemia, by *TRAIL*<sup>34,35</sup>. Indeed, our results clearly showed that in the CML line K562, downregulation of either PRAME or EZH2 resulted in upregulation of *TRAIL*. Because *TRAIL* frequently induces apoptosis in BCR-ABL-positive leukemia<sup>44</sup> and it was suggested that *TRAIL* production can overcome imatinib mesylate resistance in CML cell lines<sup>45</sup>, we strongly believe that our results open new therapeutic possibilities for combined treatment of CML patients. In fact, co-treatment with imatinib mesylate enhances *TRAIL*-induced apoptosis of BCR-ABL positive cell lines, even in K562, a *TRAIL*-resistant cell line<sup>46</sup>. Therefore, interference in the expression of PRAME or in the activity of histone methyltransferase of EZH2 may be a good alternative or adjuvant strategy for CML.

Finally, by analyzing the expression changes in cancer microarray databases, using the Oncomine platform, we found out that several forms of cancer, such as lung adenocarcinomas, melanomas, and breast carcinomas show a higher *PRAME* expression associated with a lower *TRAIL* expression when compared to matched healthy tissues. These data associated with our *in vitro* knockdown results suggest that PRAME may be involved in the tumorigenic process in a wide range of cancer, at least in part by blocking the tumor suppressor pathway mediated by *TRAIL* expression.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**



D.D.C., J.M.G.L., W.O.P. and A.E.B.B.S. were recipients of fellowships from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Brazil). This work was supported by grants from FAPESP and from the Brazilian Research Council (CNPq - Brazil).

#### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

D.D.C. designed and performed the experiments, interpreted the results and contributed to writing the paper. G.P.A.M. designed the experiments, interpreted the results and contributed to writing the paper. J.M.G.L., J.F.J., M.D.C., R.P.S., W.O.P., A.E.B.B.S., M.A.Z., M.A.Z. and F.A.C. assisted with performing the experiments and interpreting the results. The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med.* 1988;319:990-998.
2. Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999;340:1330-1340.
3. Sawyers CL. Signal transduction pathways involved in BCR-ABL transformation. *Baillieres Clin Haematol.* 1997;10:223-231.
4. Bedi A, Zehnbauser BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 1994;83:2038-2044.
5. Amarante-Mendes GP, Jascur T, Nishioka WK, Mustelin T, Green DR. Bcr - Abl-mediated resistance to apoptosis is independent of PI 3-kinase activity. *Cell Death Differ.* 1997;4:548-554.
6. Brumatti G, Weinlich R, Chehab CF, Yon M, Amarante-Mendes GP. Comparison of the anti-apoptotic effects of Bcr-Abl, Bcl-2 and Bcl-x(L) following diverse apoptogenic stimuli. *FEBS Lett.* 2003;541:57-63.
7. McGahon AJ, Brown DG, Martin SJ, et al. Downregulation of Bcr-Abl in K562 cells restores susceptibility to apoptosis: characterization of the apoptotic death. *Cell Death Differ.* 1997;4:95-104.
8. Amarante-Mendes GP, Naekyung Kim C, Liu L, et al. Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3. *Blood.* 1998;91:1700-1705.
9. Melo JV, Barnes DJ. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:441-453.
10. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity.* 1995;3:673-682.
11. Takeda K, Yamaguchi N, Akiba H, et al. Induction of tumor-specific T cell immunity by anti-DR5 antibody therapy. *J Exp Med.* 2004;199:437-448.
12. Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, et al. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. *Cell Immunol.* 2001;214:194-200.
13. Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, et al. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med.* 2002;195:161-169.
14. Schmaltz C, Alpdogan O, Kappel BJ, et al. T cells require TRAIL for optimal graft-versus-tumor activity. *Nat Med.* 2002;8:1433-1437.
15. Walczak H, Miller RE, Ariail K, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med.* 1999;5:157-163.
16. Wang S, El-Deiry WS. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene.* 2003;22:8628-8633.
17. Cretney E, Takeda K, Yagita H, Glaccum M, Peschon JJ, Smyth MJ. Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol.* 2002;168:1356-1361.
18. Sedger LM, Glaccum MB, Schuh JC, et al. Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice. *Eur J Immunol.* 2002;32:2246-2254.
19. Epping MT, Bernards R. A causal role for the human tumor antigen preferentially expressed antigen of melanoma in cancer. *Cancer Res.* 2006;66:10639-10642.

20. Ikeda H, Lethe B, Lehmann F, et al. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity*. 1997;6:199-208.
21. Altucci L, Rossin A, Raffelsberger W, Reitmair A, Chomienne C, Gronemeyer H. Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. *Nat Med*. 2001;7:680-686.
22. Clarke N, Jimenez-Lara AM, Voltz E, Gronemeyer H. Tumor suppressor IRF-1 mediates retinoid and interferon anticancer signaling to death ligand TRAIL. *Embo J*. 2004;23:3051-3060.
23. Epping MT, Wang L, Edel MJ, Carlee L, Hernandez M, Bernards R. The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell*. 2005;122:835-847.
24. Amarante-Mendes GP, McGahon AJ, Nishioka WK, Afar DE, Witte ON, Green DR. Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL. *Oncogene*. 1998;16:1383-1390.
25. Bueno-da-Silva AE, Brumatti G, Russo FO, Green DR, Amarante-Mendes GP. Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis is independent of constant tyrosine-kinase activity. *Cell Death Differ*. 2003;10:592-598.
26. Souza-Fagundes EM, Brumatti G, Martins-Filho OA, Correa-Oliveira R, Zani CL, Amarante-Mendes GP. Myriadenolide, a labdane diterpene isolated from *Alomia myriadenia* (asteraceae) induces depolarization of mitochondrial membranes and apoptosis associated with activation of caspases-8, -9, and -3 in Jurkat and THP-1 cells. *Exp Cell Res*. 2003;290:420-426.
27. Proto-Siqueira R, Figueiredo-Pontes LL, Panepucci RA, et al. PRAME is a membrane and cytoplasmic protein aberrantly expressed in chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Leuk Res*. 2006;30:1333-1339.
28. Rhodes DR, Yu J, Shanker K, et al. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia*. 2004;6:1-6.
29. Ghaffari S, Jagani Z, Kitidis C, Lodish HF, Khosravi-Far R. Cytokines and BCR-ABL mediate suppression of TRAIL-induced apoptosis through inhibition of forkhead FOXO3a transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:6523-6528.
30. Jagani Z, Singh A, Khosravi-Far R. FoxO tumor suppressors and BCR-ABL-induced leukemia: a matter of evasion of apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1785:63-84.
31. Vigneswaran N, Baucum DC, Wu J, et al. Repression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) but not its receptors during oral cancer progression. *BMC Cancer*. 2007;7:108.
32. Popnikolov NK, Gatalica Z, Adegboyega PA, Norris BA, Pasricha PJ. Downregulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L in Barrett's esophagus with dysplasia and adenocarcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006;14:161-165.
33. Daniels RA, Turley H, Kimberley FC, et al. Expression of TRAIL and TRAIL receptors in normal and malignant tissues. *Cell Res*. 2005;15:430-438.
34. Insinga A, Monestiroli S, Ronzoni S, et al. Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med*. 2005;11:71-76.
35. Nebbioso A, Clarke N, Voltz E, et al. Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nat Med*. 2005;11:77-84.
36. Yong AS, Keyvanfar K, Eniafe R, et al. Hematopoietic stem cells and progenitors of chronic myeloid leukemia express leukemia-associated antigens: implications for the graft-versus-leukemia effect and peptide vaccine-based immunotherapy. *Leukemia*. 2008;22:1721-1727.
37. Radich JP, Dai H, Mao M, et al. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:2794-2799.
38. Watari K, Tojo A, Nagamura-Inoue T, et al. Identification of a melanoma antigen, PRAME, as a BCR/ABL-inducible gene. *FEBS Lett*. 2000;466:367-371.

39. Steinbach D, Pfaffendorf N, Wittig S, Gruhn B. PRAME expression is not associated with down-regulation of retinoic acid signaling in primary acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007;177:51-54.
40. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002;415:530-536.
41. Oberthuer A, Hero B, Spitz R, Berthold F, Fischer M. The tumor-associated antigen PRAME is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome. *Clin Cancer Res.* 2004;10:4307-4313.
42. Tajeddine N, Louis M, Vermylen C, Gala JL, Tombal B, Gailly P. Tumor associated antigen PRAME is a marker of favorable prognosis in childhood acute myeloid leukemia patients and modifies the expression of S100A4, Hsp 27, p21, IL-8 and IGFBP-2 in vitro and in vivo. *Leuk Lymphoma.* 2008;49:1123-1131.
43. Epping MT, Wang L, Plumb JA, et al. A functional genetic screen identifies retinoic acid signaling as a target of histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:17777-17782.
44. Uno K, Inukai T, Kayagaki N, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) frequently induces apoptosis in Philadelphia chromosome-positive leukemia cells. *Blood.* 2003;101:3658-3667.
45. Kikuchi S, Nagai T, Kunitama M, Kirito K, Ozawa K, Komatsu N. Active FKHRL1 overcomes imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia-derived cell lines via the production of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Sci.* 2007;98:1949-1958.
46. Nimmanapalli R, Porosnicu M, Nguyen D, et al. Cotreatment with STI-571 enhances tumor necrosis factor alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL or apo-2L)-induced apoptosis of Bcr-Abl-positive human acute leukemia cells. *Clin Cancer Res.* 2001;7:350-357.
47. Stearman RS, Dwyer-Nield L, Zerbe L, et al. Analysis of orthologous gene expression between human pulmonary adenocarcinoma and a carcinogen-induced murine model. *Am J Pathol.* 2005;167:1763-1775.
48. Beer DG, Kardia SL, Huang CC, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med.* 2002;8:816-824.
49. Hoek KS, Schlegel NC, Brafford P, et al. Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res.* 2006;19:290-302.
50. Haqq C, Nosrati M, Sudilovsky D, et al. The gene expression signatures of melanoma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:6092-6097.
51. Richardson AL, Wang ZC, De Nicolo A, et al. X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer Cell.* 2006;9:121-132.

## LEGENDS

**Figure 1. *PRAME*, but not *EZH2*, is a BCR-ABL induced gene and is up-regulated during the disease progression.** (A) RT-qPCR analysis of *PRAME* mRNA in different leukemia cell lines that endogenously express BCR-ABL or not. The BCR-ABL<sup>+</sup> cells show higher *PRAME* expression than the BCR-ABL<sup>-</sup> cells. (B) RT-qPCR analysis of *EZH2* mRNA in different leukemia cell lines that endogenously express BCR-ABL or not. There is no difference on *EZH2* expression between the BCR-ABL positive and negative cells. (C) RT-qPCR analysis of *PRAME* expression in HL-60 empty vector (HL60) and HL60.BCR-ABL, which ectopically expresses *BCR-ABL*, cell lines. The graph shows a dramatic up-regulation of *PRAME* after the *BCR-ABL* transfection. (D) Relative expression of *PRAME* in healthy individuals (control) and CML patients in chronic (CP), accelerated (AP), blastic phase (BP), and patients who achieved complete cytogenetic remission (CCyR). The lines represent the median values. (E) Relative expression of *EZH2* in healthy individuals (control) and CML patients in chronic (CP), accelerated (AP), blastic phase (BP), and patients who achieved complete cytogenetic remission (CCyR). (F) Correlation between *PRAME* and *BCR-ABL* in all CML patients. Spearman R=0.6117, P<0.0001. \*\*, P<0,01.

**Figure 2. *PRAME* is responsible for knocking-down *TRAIL* expression in CML.** Correlation between *PRAME* and *TRAIL* (A) and *EZH2* and *TRAIL* (B) in all CML patients. RT-qPCR (C) and Western Blot (D) analysis of *PRAME* expression in K562 wild type (WT) or stably transfected with pRS (empty vector) or two infections with pRS-*PRAME* to knock down endogenous *PRAME* and are indicated as *PRAME*<sup>KD</sup>. (E) RT-qPCR analysis of *TRAIL* mRNA in K562 cell lines before and after *PRAME* knockdown. \*, P<0,05; \*\*, P<0,01.

**Figure 3. *EZH2* Knockdown restores *TRAIL* expression.** RT-qPCR (A) and Western Blot (B) analysis of *EZH2* expression in K562 wild type (WT) or stably transfected with pRS (empty vector) or pRS-*EZH2* #3 (shRNA 1) or pRS-*EZH2* #4 (shRNA 2), two different shRNAs to knock down endogenous *EZH2* (indicated as *EZH2*<sup>KD</sup>). (C) RT-qPCR analysis of *TRAIL* mRNA in K562 cell lines before and after *EZH2* knockdown. \*, P<0,05; \*\*, P<0,01.

**Figure 4. The *PRAME*<sup>KD</sup> and *EZH2*<sup>KD</sup> did not change *FOXO3a* phosphorylation state.** (A) Western Blot analysis of phospho-*FOXO3a* at Ser 318/321 in K562 wild type (WT) or stably transfected with pRS (empty vector) or two infection with pRS-*PRAME* (Infec. 1 and Infec. 2),

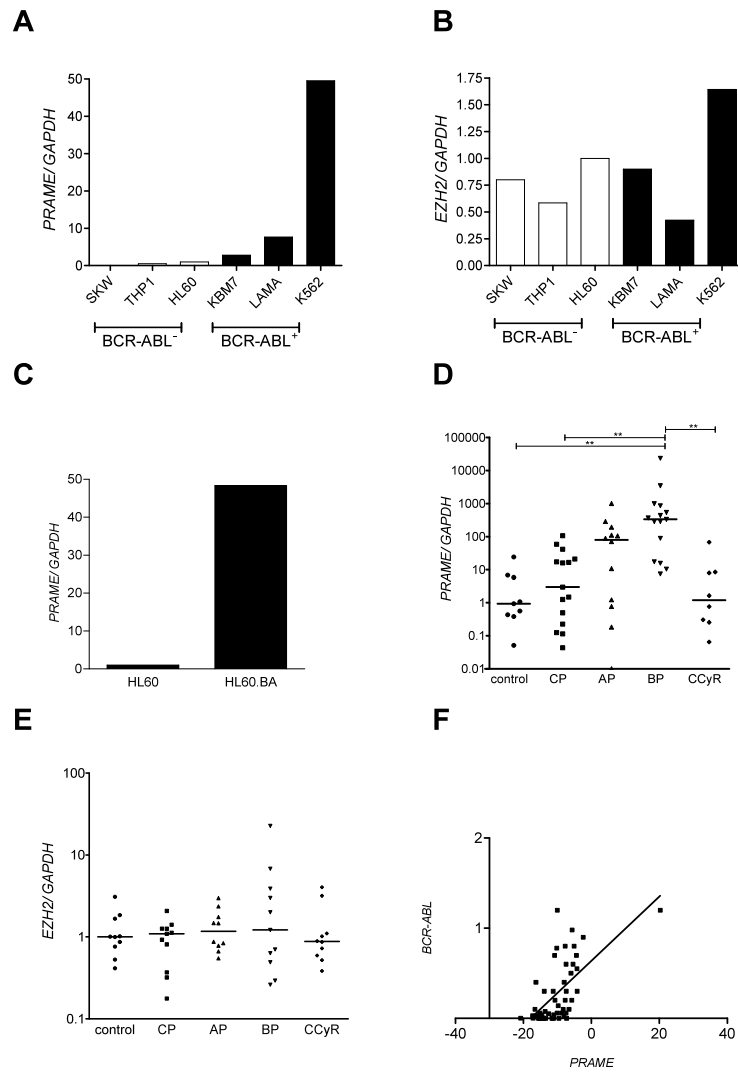
to knock down endogenous *PRAME* and are indicated as *PRAME*<sup>KD</sup>. (B) Western Blot analysis of phospho-FOXO3a at Ser 318/321 in K562 wild type (WT) or stably transfected with pRS (empty vector) or pRS-EZH2 #3 (shRNA 1) or pRS-EZH2 #4 (shRNA 2), two different shRNAs to knock down endogenous *EZH2* (indicated as *EZH2*<sup>KD</sup>).

**Figure 5. *TRAIL* is down-modulated in lung adenocarcinoma while *PRAME* is up-regulated.** Box-plots showing decreased expression of *TRAIL* and increased expression of *PRAME* on datasets performed on the reference <sup>47</sup> (A) and <sup>48</sup> (B). The y-axis represents normalized expression. Shaded boxes represent the interquartile range (25th-75th percentile). Whiskers represent the 10th-90th percentile. The bars denote the median.

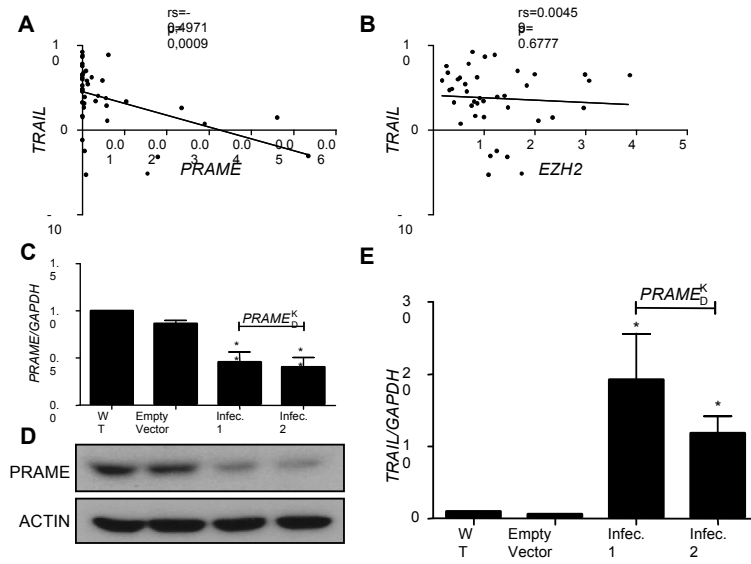
**Figure 6. *TRAIL* is down-modulated in melanoma while *PRAME* is up-regulated.** Box-plots showing decreased expression of *TRAIL* and increased expression of *PRAME* on datasets performed on the reference <sup>49</sup> (A) and <sup>50</sup> (B). The y-axis represents normalized expression. Shaded boxes represent the interquartile range (25th-75th percentile). Whiskers represent the 10th-90th percentile. The bars denote the median.

**Figure 7. *TRAIL* is down-modulated in breast carcinoma while *PRAME* is up-regulated.** Box-plots showing decreased expression of *TRAIL* and increased expression of *PRAME* on datasets performed on the reference <sup>51</sup>. The y-axis represents normalized expression. Shaded boxes represent the interquartile range (25th-75th percentile). Whiskers represent the 10th-90th percentile. The bars denote the median.

Carvalho et. al. - Figure 1

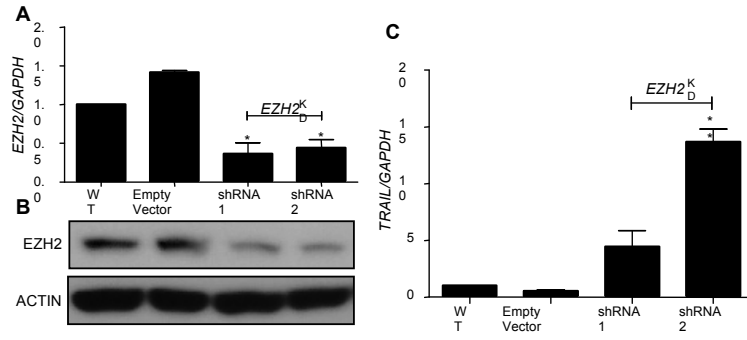


Carvalho et. al. - Figure 2

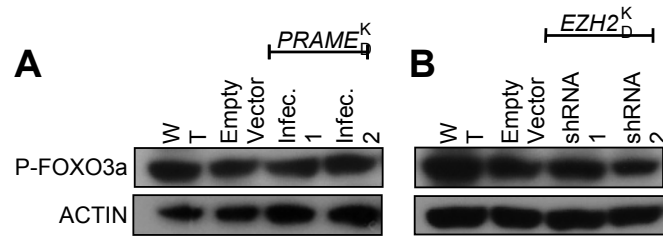




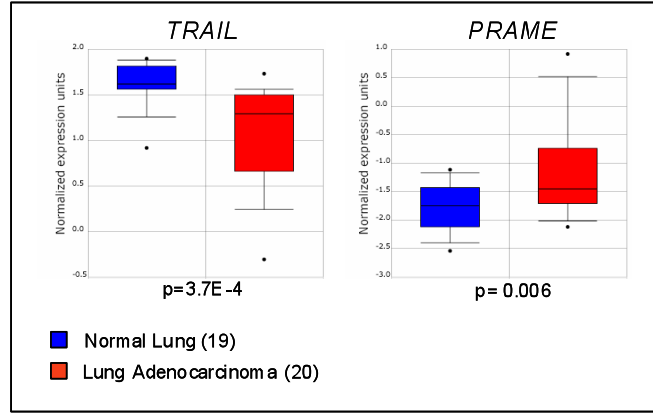
Carvalho et. al. - Figure 3



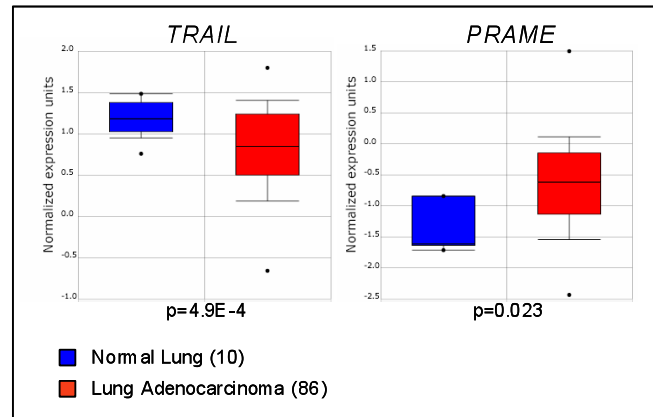
Carvalho et. al. - Figure 4



**A**

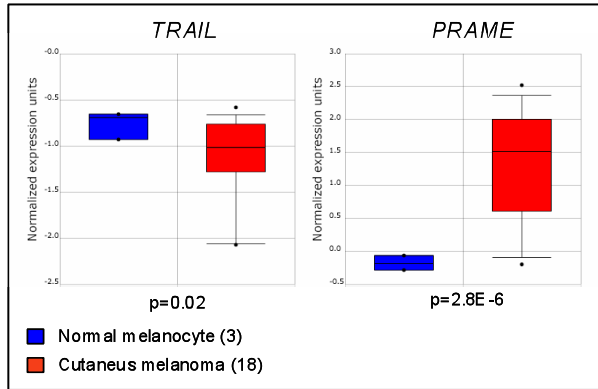


**B**

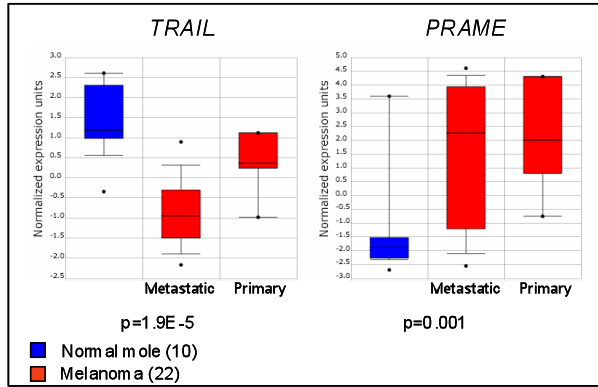


Carvalho et. al. - Figure 6

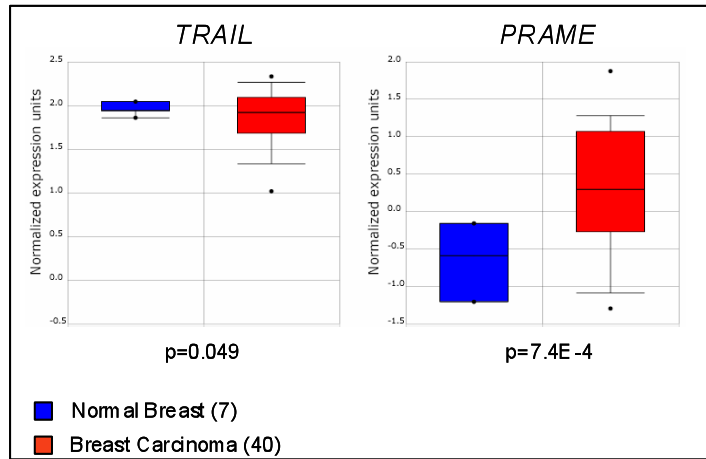
**A**



**B**



Carvalho et. al. - Figure 7



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)