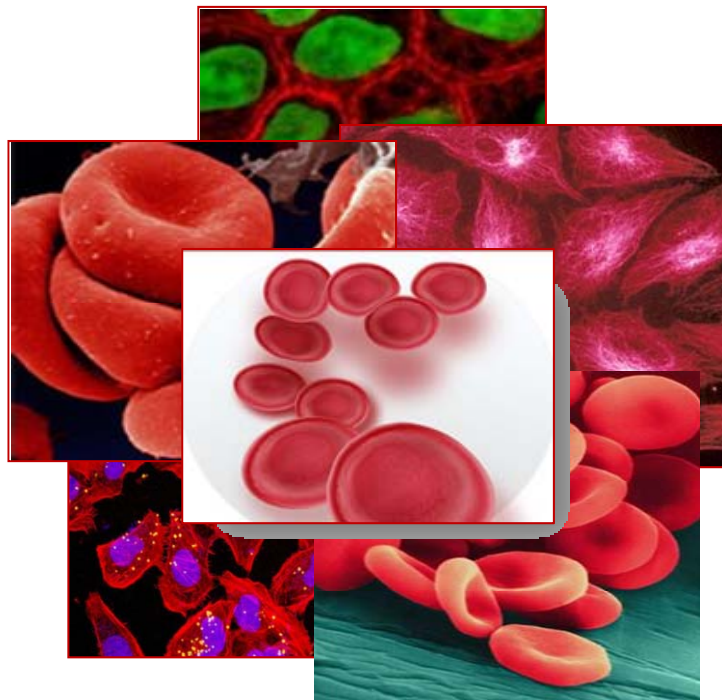


UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**CONTROLO TRANSCRICIONAL DE *PIGM*: MECANISMO DE
EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM CÉLULAS SANGUÍNEAS
NA INSUFICIÊNCIA HEREDITÁRIA DE GPI**



**MADALENA TAVARES FESTAS DE SOUSA NOLASCO
MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA**

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



CONTROLO TRANSCRICIONAL DE *PIGM*: MECANISMO DE
EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM CÉLULAS SANGUÍNEAS NA
INSUFICIÊNCIA HEREDITÁRIA DE GPI

MADALENA TAVARES FESTAS DE SOUSA NOLASCO

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA

**DISSERTAÇÃO ORIENTADA PELO PROFESSOR DOUTOR ANTÓNIO MEDINA DE ALMEIDA
E PELA PROFESSORA DOUTORA RITA ZILHÃO**

NOVEMBRO DE 2009

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Prof. Doutor António Medina de Almeida pela oportunidade que me deu em participar neste projecto, pelos conhecimentos transmitidos, pelo apoio, incentivo e orientação e pela confiança que depositou em mim ao longo de todo o trabalho.

Um agradecimento muito especial à Joana Costa pela sua paciência, partilha, ensinamentos e força e pelos convites para me integrar no grupo. Ao Doutor Sérgio Dias pelo apoio e motivação. A todos os colegas do laboratório, que me apoiaram e motivaram: Rita F., Marta, Jú, Catarina, Ana G., Ana C., Francisco, Tânia, Carlinha, Carla, Rute, Jaime, Sofia e Lara e um agradecimento especial às Jacinta, Cheila, Cátia F., Maria João e Rita Domingues por me terem respondido a tantas perguntas, muitas vezes repetidas, pela interminável ajuda e pelos conselhos preciosos. À Joaquina e à Fátima, sem as quais o laboratório não seria o mesmo.

À Prof. Doutora Rita Zilhão por servir de modelo, desde que a conheci, aos Prof. Graça Vieira, Céu Correia, Filomena Caeiro, Rogério Tenreiro, Lélia Chambel, Mário Santos, Francisco Dionísio, Manuel do Carmo Gomes e também ao Prof. Luís Pedro, por me terem feito acreditar que nunca é tarde demais e ao Prof. Doutor Dinis Pestana pela preciosa ajuda no tratamento dos resultados e por me ter Ensinado estatística.

Aos meus amigos do curso, principalmente ao meu padrinho Ricardo, Pepé, Papá, Catarina, Germana, Afonso, Ana Luísa e Filipa Nunes, mas principalmente ao Tiago, sem o qual não estaria neste patamar.

Finalmente, gostaria de agradecer a toda a família por me terem apoiado e encorajado, estando sempre presentes quando preciso.

Mas o meu maior agradecimento dirijo-o à Kaki e aos meus pais e irmãos, que fizeram este caminho comigo.

ABSTRACT

Inherited glycosylphosphatidylinositol (GPI) deficiency (IGD), characterized by thrombosis and epilepsy, but not hemolysis, is caused by a mutation that disrupts binding of the transcription factor (TF) Sp1 to the core promoter of the mannosyltransferase-encoding gene *PIGM*. The level of GPI expression in affected children varies between cells of the same and different tissues. While GPI expression in erythrocytes is close to normal, granulocytes are severely deficient, suggesting erythroid-specific regulation of *PIGM*. To investigate whether this difference could be due to transcriptional control of this housekeeping gene by the tissue-specific TF GATA-1, bioinformatic analysis of the *PIGM* promoter was carried out and revealed 3 putative GATA binding sites. Electromobility shift assays with nuclear extracts from K562, and anti-GATA-1 antibody confirmed that GATA-1 binds to those sequences. In chromatin immune-precipitation assays, precipitation of nuclear extract of K562 cells with anti-GATA-1 antibody resulted in enrichment of DNA sequences containing the binding sites, indicating that GATA-1 binding to the *PIGM* promoter occurs *in vivo*. The functional effect of GATA-1 was tested by means of reporter assays using HeLa cells. Constructs, which were wild type and mutant for the Sp1 site mutation were used. Co-transfection of reporter plasmids with a GATA-1 containing plasmid enhanced Luciferase activity, an effect which was reduced when the GATA sites were absent, as in the short constructs, but not when totally abolished by site-directed mutagenesis. Comparison of the wild type and mutant construct activities revealed that the effect of GATA-1 on this promoter region is more potent by the presence on an intact Sp1 site. Our results show that GATA-1 enhances transcriptional activity of *PIGM* promoter both in a Sp1-dependent and -independent manner. In IGD, the latter mechanism ensures adequate transcription of *PIGM*, GPI biosynthesis and expression of CD59 in erythroid cells and thus lack of intravascular hemolysis and anemia.

KEYWORDS

Inherited GPI deficiency (IGD); Glycosylphosphatidylinositol (GPI); *PIGM*; Sp1; GATA-1;

RESUMO

A deficiência hereditária de glicosilfosfatidilinositol (IGD) é causada pela presença de uma transversão C>G na posição -270 do promotor do gene da manosiltransferase-I PIGM. Esta mutação leva à disrupção do local de reconhecimento do factor de transcrição (FT) Sp1 no promotor de *PIGM*, o que se traduz na biossíntese deficiente da âncora GPI. Na IGD, o nível de expressão de *PIGM* varia entre as diversas linhagens hematopoiéticas - enquanto se apresenta praticamente normal em eritrócitos, é altamente afectado em granulócitos, o que sugere a ocorrência de uma regulação transcripcional específica de linhagem neste gene. Para testar a hipótese do FT específico da linhagem eritróide/megacariocítica, GATA-1, ser o regulador crítico desta expressão, recorreu-se à análise bioinformática do promotor em estudo e identificaram-se 3 locais GATA-1 putativos. Ensaio de alteração da mobilidade electroforética (EMSA), utilizando extractos nucleares de células eritroleucémicas K562 e um anticorpo anti-GATA-1, confirmaram a ligação de GATA-1 às sequências esperadas *in vitro*. Ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP), recorrendo a um anticorpo anti-GATA-1, resultaram num enriquecimento da precipitação destas sequências, indicando que este se liga também *in vivo*. Ensaio repórter com a Luciferasa, realizados em células HeLa, revelaram um aumento da actividade transcripcional na presença de GATA-1, permitindo confirmar o efeito activador deste FT na sequência promotora. Os resultados demonstraram que GATA-1 activa a transcrição de *PIGM* de forma dependente e independente de Sp1. Na IGD, este último mecanismo assegura a transcrição adequada de *PIGM*, a biossíntese completa de GPI e a expressão de CD59 nos eritrócitos, explicando também a ausência de hemólise e anemia.

PALAVRAS-CHAVE

Deficiência hereditária de GPI (IGD); Glicosilfosfatidilinositol (GPI); PIGM; Sp1; GATA-1;

Índice

Agradecimentos.....	III
Abstract	I
Resumo	II
Introdução.....	1
A âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI).....	1
Estrutura da âncora GPI.....	1
Biossíntese da âncora GPI.....	2
Patologias associadas à âncora GPI	5
Hemoglobinúria Paroxística Nocturna (PNH).....	5
Deficiência Hereditária de GPI (IGD)	6
Sp1	9
GATA-1.....	11
Objectivos.....	13
Materiais e Métodos	13
Cultura de Células	13
Métodos Bioinformáticos	13
Ensaio de Alteração da Mobilidade Electroforética (EMSA).....	14
Ensaio de Imunoprecipitação de Cromatina (ChIP).....	14
Mutagénese Sítio-Dirigida	16
Ensaio Repórter.....	16
Resultados.....	17
Estratégia	17
Caracterização do Promotor de <i>PIGM</i> por análise <i>in silico</i>	18
GATA-1 reconhece <i>in vitro</i> as sequências previstas	18
GATA-1 liga-se <i>in vivo</i> ao promotor de <i>PIGM</i>	19
Activação Sinérgica do promotor por Sp1 e GATA-1.....	21
Discussão	25
Conclusão.....	29
Bibliografia.....	30
Anexo I - Mecanismo Molecular de Sp1 e Potencial Terapêutico	I
Perspectivas Futuras.....	I
Anexo II – Meios e Reagentes	II
Anexo III – Tabelas	V

INTRODUÇÃO

A ÂNCORA DE GLICOSILFOSFATIDILINOSITOL (GPI)

A apresentação de proteínas à superfície da célula ocorre de diversas formas e, consoante a natureza das interações que estas estabelecem com a membrana, são classificadas em três categorias: proteínas integrais, ou transmembranares, se atravessam a bicamada fosfolipídica, através de domínios hidrofóbicos e estendem os seus domínios hidrofílicos para o interior e o exterior da célula; proteínas periféricas, se se ligam à membrana por interações indirectas, estabelecendo pontes através de proteínas integrais, ou directas, pela associação às cabeças polares dos fosfolípidos membranares; e, por último, proteínas ancoradas a fosfolípidos, se estabelecem ligações covalentes com um ou mais complexos lipídicos, denominados de âncoras lipídicas¹.

Na última classe de proteínas, as cadeias hidrocarbonadas encontram-se embebidas na membrana, mas a proteína que carregam não se integra na bicamada lipídica. Um destes tipos de âncora é o complexo glicosilfosfatidilinositol, também denominado âncora GPI (Fig.1.1). Diversos estudos demonstraram que a âncora GPI é necessária e suficiente para que ocorra ancoragem de proteínas à superfície da célula, as quais têm um papel vital na comunicação da célula com o meio que a rodeia². As proteínas ancoradas a GPI são denominadas de GPI-APs (*GPI-anchored-proteins*). A sua ligação à âncora GPI consiste, portanto, num processo de modificação pós-traducional, que é estruturalmente muito complexo³. No entanto, muitas questões permanecem por responder no que respeita as suas actividades biológicas.

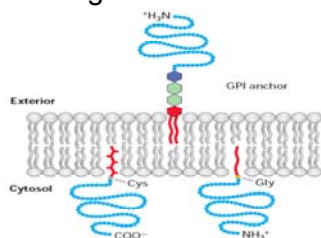


Fig.1.1: Ancoragem de proteínas à membrana citoplasmática. A âncora GPI encontra-se na camada exoplasmática da membrana celular. A porção de fosfatidilinositol (vermelho) contém duas cadeias de ácidos gordos que se estendem para o interior da bicamada lipídica. Um resíduo de fosfoetanolamina (roxo) liga o lípido à extremidade carboxílica da proteína. Os hexágonos a verde representam as unidades glicosídicas da molécula, que podem variar em número e organização nas diferentes formas da âncora GPI. [Imagem adaptada de Sprong, H., *et al.*, 2001⁴]

ESTRUTURA DA ÂNCORA GPI

Caracterizada pela primeira vez há 20 anos^{5, 6}, a âncora GPI é um glicolípido cuja estrutura básica tem permanecido altamente conservada ao longo da evolução, apresentando-se praticamente inalterada em diversos grupos de *Archaeobacteria* e em todos os grupos de bactérias e eucariotas^{2-4, 7-10}. A estrutura deste complexo consiste invariavelmente num resíduo de fosfatidilinositol (PI), com duas cadeias de ácidos gordos, que se estendem para o interior da bicamada lipídica, ao qual estão sequencialmente ligados uma molécula de glucosamina e um grupo trimanosídico. Cada um dos resíduos manosídicos está ligado a uma molécula de fosfoetanolamina (PEtn). A PEtn terminal estabelece a ligação covalente à extremidade carboxílica da GPI-AP^{2, 7-10} (Fig.1.2).

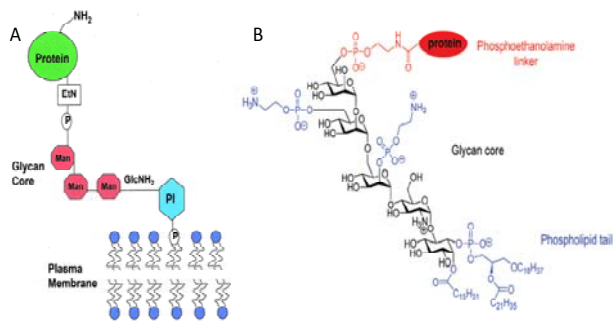


Fig.1.2: Estrutura da âncora GPI. (A) Estrutura conservada da molécula de GPI, que consiste num resíduo de fosfatidilinositol (PI), uma molécula de glucosamina (GlcN), três resíduos de manose (Man) e um ou mais resíduos de fosfoetanolamina (PEtn) [Imagem adaptada de *ASH Educational Program Book*, 2006¹¹]; (B) Âncora GPI da acetilcolinesterase de eritrócitos humanos. Os três domínios são: a cauda fosfolipídica (azul), o centro glicídico conservado (preto) e a PEtn (vermelho) para ligação à proteína. Os grupos marcados a azul são variáveis. [Imagem adaptada de Paulick, *et.al.*,2008¹⁰].

A estrutura final da âncora apresenta, no entanto, algumas variações nos diversos organismos². O PI pode ter diferentes cadeias de ácidos gordos e a glucosamina e os resíduos de manose podem ser modificados por um número variável de resíduos de PEtn, ou por outros açúcares (galactose, ácido siálico), consoante o organismo em que ocorrem. Uma característica única da âncora GPI nas células de mamífero é a adição de um resíduo de PEtn a cada resíduo de manose^{2, 10, 12}. No entanto, o GPI está, sem excepção, ligado covalentemente à extremidade carboxilica da proteína que ancora. Na sua orientação final, a âncora encontra-se embebida na bicamada fosfolipídica através das caudas aciladas do PI e os resíduos glicídicos encontram-se voltados para a superfície exterior da célula³.

BIOSSÍNTESE DA ÂNCORA GPI

Sendo a estrutura central da âncora GPI tão conservada nas diversas espécies, não é de estranhar que a sua via biossintética tenha também permanecido praticamente inalterada. A primeira fase desta via ocorre no citoplasma e termina no lúmen do retículo endoplasmático (RE), onde o precursor GPI é ligado covalentemente à proteína nascente, portadora de um péptido-sinal específico na sua extremidade C-terminal. Esta ligação ocorre por uma reacção de transamidação, na qual o péptido-sinal é clivado e degradado. De seguida, todo o complexo é exportado para a membrana plasmática, por um processo de exocitose, através da via secretora¹³ (Fig.1.3).

A síntese da âncora GPI tem início na transferência de uma unidade de N-acetilglucosamina (GlcNAc), da UDP-GlcNAc para o PI, que se encontra ancorado ao folheto citosólico da membrana do RE. Este passo é catalisado pelo complexo enzimático GPI-acetilglucosaminatransferase (GPI-GnT)¹³, que compreende a subunidade catalítica PIGA¹⁴⁻¹⁷, as subunidades estabilizadoras PIGC¹⁸, PIGH¹⁹, PIGQ²⁰, PIGP²¹ e PIGY²² e a subunidade reguladora DPM2²¹. O segundo passo consiste na desacetilação do composto N-acetilglucosamina-fosfoinositol (GlcNAc-PI) para formar N-glucosaminafosfoinositol (GlcN-PI). A enzima responsável por este passo é a N-desacetilase PIGL^{23, 24}. A sua regulação é efectuada por GTP, sendo também dele dependente^{25, 26}. O terceiro passo corresponde à acilação do anel inositol de GlcN-PI. PIGW²⁷ é a enzima que possui actividade de aciltransferase. Os passos seguintes da via consistem na trimanosilação sequencial do complexo lipídico formado e ocorrem logo após a sua translocação para o lúmen do RE e, muito

embora apresente 13 domínios transmembranares que atravessam a membrana do RE, PIGW não é responsável pela translocação do complexo já formado para o lado luminal do RE. Esta reacção de “flip-flop” sabe-se ser da responsabilidade de uma flipase, que não foi, no entanto, identificada ainda²⁸.

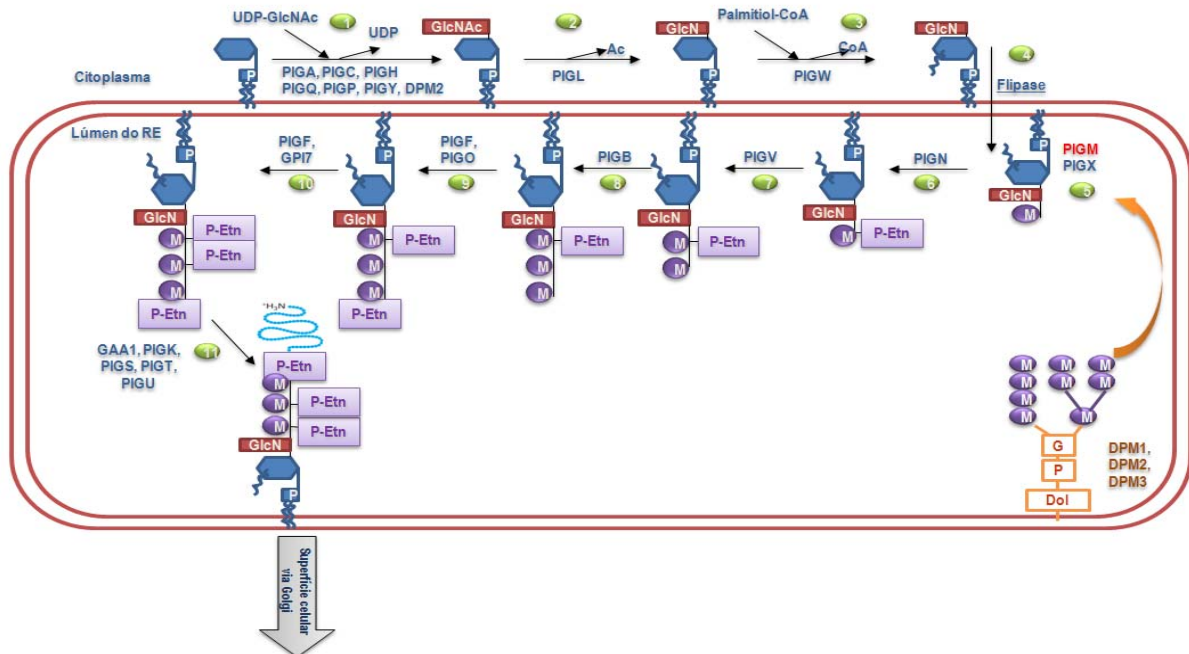


Fig.1.3: Representação esquemática da via biossintética da âncora GPI. Os primeiros passos ocorrem no citoplasma. De seguida uma flipase introduz o complexo glucosaminafosfatidilinositol no lúmen do retículo endoplasmático, onde têm lugar as restantes reacções da via, até à transamidação, que liga a extremidade carboxilica da proteína à âncora GPI (modificação pós-traducional). Este complexo é depois transportado até à superfície celular pela via vesicular. (GlcN) - glucosamina, (Man) – manose, (PEtn) – fosfoetanolamina, (Dol PGM) – dolicolfosfatomanose [Imagem adaptada de Almeida *et al.*, 2006¹²].

Os resíduos de manose são fornecidos pelo composto dolicolfosfatomanose (DPM). O DPM é sintetizado inicialmente no lado citosólico do RE, a partir da GDP-manose, pela GDP-Man:Dol-P-manosiltransferase¹³. Tal como o GPI, a molécula de DPM recém-sintetizada sofre uma translocação para o lado luminal por acção de uma flipase e é depois utilizada como o único dador de grupos manosil identificado até à data²⁸. A adição da primeira manose (Man1) ao GlcN-PI é executada pela GPI-manosiltransferase-I PIGM²⁹, a qual necessita da subunidade PIGX³⁰. Ashida *et al* (2005) observaram que PIGX se liga especificamente a PIGM e que a expressão de PIGM em células CHO era extremamente reduzida na ausência de PIGX, sugerindo que PIGX estabiliza a expressão de PIGM³⁰. Após a adição da primeira manose, a âncora GPI sofre uma modificação catalisada por PIGN³¹, que resulta na adição de um resíduo de PEtn à Man1. Esta adição não parece ser essencial à formação de GPI, já que Hong *et al.* (1999) conseguiram obter proteínas ancoradas a GPI à superfície de células *knockout* para este gene. No entanto, a sua ausência causa uma deficiência parcial na apresentação das GPI-APs²⁰. É interessante notar que este passo é característico de células de mamífero. O sétimo passo consiste na adição do segundo resíduo de manose (Man2) ao complexo em crescimento e é catalisado pela GPI-manosiltransferase-II³², também

denominada PIGV. O oitavo passo é protagonizado por PIGB³³, uma enzima hexamérica identificada como GPI-manosiltransferase-III, cuja função é a adição do terceiro e último resíduo de manose (Man3) à âncora GPI. Os dois passos seguintes consistem na modificação das manoses - Man3 e Man2, respectivamente - pela adição de um resíduo de PEtn a cada uma. A adição de PEtn terminal à Man3 é crucial à formação correcta da âncora³⁴, já que vai estabelecer a ligação à proteína no passo de transamidação. Esta reacção é catalisada por PIGO³⁴ e PIGF³⁴⁻³⁶, que estabiliza o complexo e activa a transcrição de *PIGO*. A ausência do segundo resíduo de PEtn resulta numa redução parcial da âncora GPI^{20, 35}. Esta é, ainda assim, a forma de GPI maioritariamente apresentada às proteínas nas células de mamífero e é denominada de H7. A adição de PEtn à Man2 é catalisada pela versão humana de GPI7³⁰ e gera o complexo H8, que para além de existir minoritariamente como âncora lipídica, pode ainda apresentar-se livre à superfície da célula³⁵. A GPI7 compete com PIGO para a subunidade estabilizadora PIGF. A transferência do precursor GPI maduro envolve uma reacção de transamidação no lúmen do RE. Esta transferência é executada por um complexo enzimático que forma uma ligação peptídica entre a pro-proteína e o composto PEtn:Man3 da âncora GPI¹³. O sinal de ligação ao GPI consiste em 3 segmentos sensivelmente conservados entre as várias espécies, e muito embora não tenha aparentemente uma sequência *consensus*, a eficiência desta ligação é, não só específica de espécie, mas também dependente da sua dimensão e hidrofobicidade³⁷. O péptido-sinal hidrofóbico N-terminal da proteína é também necessário à sua translocação através da membrana do RE^{38, 39}. A reacção de transamidação, em si, é executada por um complexo multi-proteico constituído por GPI8, PIGS, PIGT, PIGU e GAA1³⁸⁻⁴⁰. A subunidade GPI8 forma, com PIGT, o centro catalítico, também denominado GPIT. PIGT tem um papel estabilizador do centro activo e mantém o complexo ligado ao RE. GAA1 está envolvida no reconhecimento da âncora GPI, juntamente com PIGU. PIGS tem um papel desconhecido⁴¹. Este complexo reconhece a extremidade C-terminal da pro-proteína, efectua a clivagem proteolítica do péptido-sinal e liga, de seguida, o grupo carboxilo do aminoácido C-terminal da pro-proteína ao grupo amina do resíduo de PEtn terminal da âncora. Assim que todo o complexo GPI-Proteína fica completo, o anel inositol é desacetilado pela PGAP1⁴² (*post GPI attachment to proteins 1*) e o complexo pode ser transportado para a superfície celular pela via de secreção⁴³⁻⁴⁵. Recentemente, Tashima *et al.* identificaram uma nova enzima, PGAP2, responsável pelo encaminhamento das GPI-APs para o transporte vesicular. De acordo com os autores, as GPI-APs não têm tendência para se ancorar a vesículas de clatrina, associando-se normalmente a vesículas de pinocitose e ficando assim concentradas em domínios lipídicos específicos - *lipid rafts*⁴⁶. O controlo da qualidade do *folding* das proteínas é feito antes do transporte para a membrana. Uma proteína mal estruturada é mantida no RE e, mesmo estando ligada a

uma âncora GPI, é rapidamente degradada pelo proteossoma. A inositol-desacetilase Bst1p parece ter um papel importante na iniciação do processo degradativo⁴⁴.

As GPI-APs são funcionalmente muito variadas e já foram identificadas em todos os tipos de células e tecidos e em todos os grupos de organismos¹⁰. As GPI-APs variam muito em dimensão e desempenham funções importantes na célula, tais como de receptores e co-receptores em vias de transdução de sinal (FOLR1, 2 e 3 – receptores de folato), apresentação de antígenos para resposta imunitária (CD24 – antígeno de superfície de granulócitos e Thy-1/CD90 - *Thymocyte antigen 1*), regulação do sistema do complemento (DAF/CD55– *decay accelerating factor* e CD59 - protectina), contacto intercelular (LFA-3 – *Lymphocyte function-associated antigen*), adesão celular (NCAM – *neural cell adhesion molecule*), e outros^{3, 10, 13}. Deste modo, as GPI-APs são essenciais à viabilidade dos organismos.

PATOLOGIAS ASSOCIADAS À ÂNCORA GPI

Apesar de, no processo biossintético da âncora GPI, estarem envolvidas mais de 20 enzimas, até à data só foram identificados dois genes cuja alteração resulta numa patologia provocada por deficiências na síntese deste glicolípido.

HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA (PNH)

A PNH é uma doença crónica adquirida, que se deve à ocorrência de uma ou mais mutações somáticas no gene *PIGA*, localizado no cromossoma X e que está envolvido no primeiro passo da via biossintética da âncora GPI (Fig.1.3). É uma doença rara, com uma incidência estimada em 1 caso por cada 1.000.000 de pessoas e afecta principalmente adultos (90% dos casos)¹². Clinicamente, a PNH apresenta três características principais: um quadro de anemia, propensão para trombooses venosas e hipoplasia medular. A anemia é provocada por hemólise intravascular mediada pelo sistema do complemento, já que os eritrócitos afectados falham a apresentação dos antígenos CD55 e CD59 à superfície, tornando-se, por isso, muito sensíveis à acção do complemento⁴⁷. Os episódios de trombose, cuja fisiopatologia está ainda por esclarecer, são os principais responsáveis pela morbidade e mortalidade da doença^{48, 49} e ocorrem sobretudo nas veias hepáticas. Por último, para explicar a hipoplasia medular, central na fisiopatologia desta doença, crê-se que as células estaminais hematopoiéticas GPI⁺ (HSC-GPI⁺) são selectivamente destruídas num processo auto-imune, mediado pelas células T e dirigido contra um antígeno associado a GPI, permitindo a proliferação de clones GPI⁻. A identidade do antígeno é desconhecida, postulando-se que possa ser a própria âncora GPI a suscitar a reacção auto-imune⁵⁰⁻⁵³. A PNH é uma doença exclusivamente hematopoiética. Os clones com mutações no gene *PIGA* têm origem numa ou mais HSC^{16, 17, 54, 55} ou noutras células hematopoiéticas progenitoras⁵⁶. As células eritróides, mielóides e linfóides que advêm da célula progenitora afectada deixam de apresentar, total ou parcialmente, as GPI-APs. O teste de *Ham* utilizado no diagnóstico desta doença foi suplan-

tado pela citometria de fluxo, que representa actualmente o teste *gold standard* para esta patologia, já que permite identificar e quantificar o tamanho do clone deficiente^{57, 58}. Recentemente, foi produzido o FLAER, uma aerolisina inactivada, marcada com fluoresceína, que se liga à componente glicídica do esqueleto de GPI permitindo detectar directamente a âncora à superfície da célula. Os eritrócitos são a excepção neste teste, já que quer as células GPI⁺, quer as GPI⁻, apresentam uma grande quantidade de glicoforina (proteína com a qual o FLAER tem afinidade) à superfície, produzindo diversos falsos positivos. O padrão de expressão de GPI na PNH tem a forma de mosaico - padrão bi ou trimodal – já que as células normais (GPI⁺) coexistem sempre com os clones GPI⁻, apesar das últimas poderem chegar a constituir 99% da hematopoiese.

DEFICIÊNCIA HEREDITÁRIA DE GPI (IGD)

Muito recentemente, Almeida *et.al*¹², descreveram a Deficiência Hereditária de GPI (*Inherited GPI Deficiency* ou IGD). Dos casos identificados faziam parte três crianças descendentes de dois casamentos consanguíneos, não relacionados entre si. As crianças afectadas apresentavam um quadro clínico distinto do da PNH, na medida em que os pacientes manifestavam sintomas de trombose venal hepática e intra-abdominal, mas também epilepsia e ausência de sintomas de hemólise intravascular.

Padrão de Hereditariedade da IGD

A análise dos pedigrees de ambas as famílias revelou um padrão característico de hereditariedade autossômica recessiva na IGD (Fig.1.4). Os casos índice apresentaram-se com trombose na veia hepática. O irmão mais novo da família Mediterrânica foi diagnosticado precocemente, antes ainda de apresentar os sintomas da IGD.

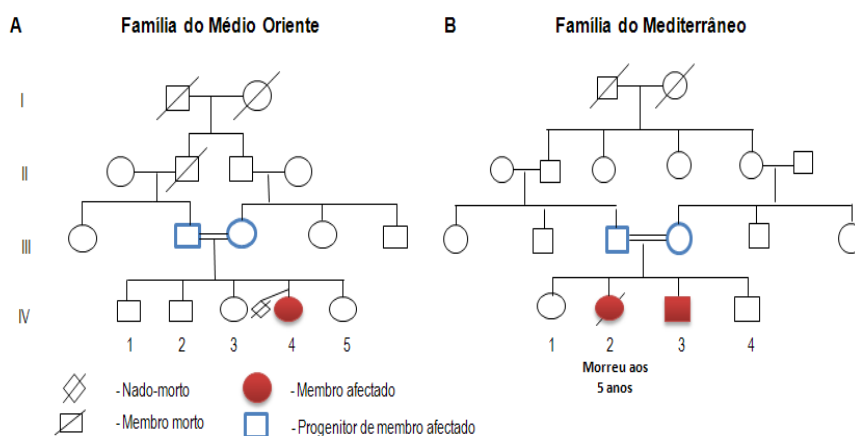


Fig.1.4: Pedigrees das famílias afectadas pela IGD. As crianças doentes de ambas as famílias são filhas de casamentos consanguíneos. Na família A a criança afectada é a IV4. Esta criança tinha um irmão gémeo que morreu no útero materno. Na família B o caso índice (IV2) morreu aos 5 anos. O irmão mais novo (IV3) apresentou a mesma patologia, embora sem sintomas na altura do diagnóstico. O padrão de hereditariedade revelou que a IGD é uma doença autossômica recessiva. [Imagem adaptada de Almeida, *et.al*(2006)¹²].

A identificação de factores trombofílicos levou os investigadores a fazer uma análise completa do padrão de expressão da âncora GPI, recorrendo à citometria de fluxo em células hematopoiéticas tratadas com FLAER e anticorpos anti-GPI-APs, nomeadamente anti-CD59 e anti-CD24¹² (Fig.1.5). Os padrões obtidos revelaram-se distintos, tanto dos de indivíduos saudáveis, como dos de doentes com PNH. Na IGD, a expressão de CD59 em eritrócitos

revelou um padrão unimodal contínuo, em que a maioria dos eritrócitos era GPI⁺, aparecendo sempre uma pequena percentagem (2 a 5%) de células GPI⁻ (Fig.1.5A). Na PNH, apresentam-se geralmente populações bi- ou trimodais de clones GPI⁺ e GPI⁻. As plaquetas revelaram um padrão semelhante ao dos eritrócitos quanto à apresentação de CD59 à superfície. A maioria era GPI⁺ nas crianças afectadas, mas a população apresentava um deficit significativo relativamente às populações de indivíduos normais e dos progenitores (Fig.1.5B). Um padrão completamente diferente foi observado nos granulócitos das crianças afectadas, que apresentaram uma percentagem de células maioritariamente GPI⁻, contrastando com o dos indivíduos normais e dos pacientes de PNH, que apresentam padrões bimodais característicos. Este tipo de distribuição foi manifestado tanto na marcação com FLAER, como na marcação com anticorpos anti-CD59 e anti-CD24 (Fig.1.5C). Os monócitos das crianças afectadas mostraram um padrão unimodal semelhante ao normal e uma redução pouco significativa do número de células. Relativamente aos linfócitos, mais concretamente no caso dos linfócitos B, surgiu um padrão claramente bimodal na expressão de GPI e de GPI-APs, na medida em que a maioria das células era GPI⁻, tendo o fenómeno oposto sido observado no caso dos linfócitos T (dados não mostrados). A natureza constitutiva da deficiência de GPI foi comprovada pela análise de fibroblastos, que mostrou uma redução unimodal da expressão de GPI, tanto com a marcação anti-CD59, como com FLAER (Fig.1.5D).

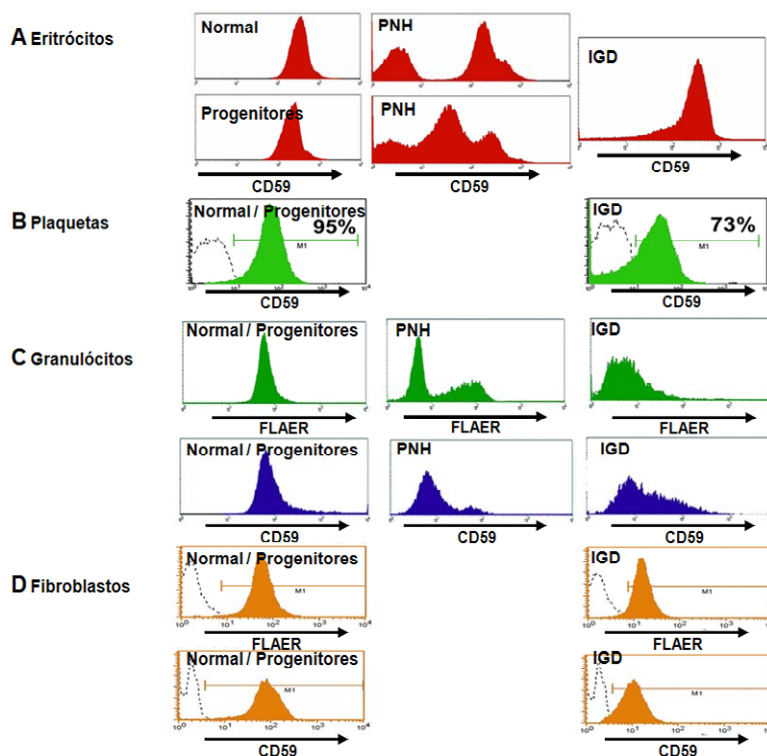


Fig.1.5: Expressão de GPI e do antígeno CD59 em diversos tipos de células humanas. Imagens de citometria de fluxo de células tratadas com FLAER conjugado com Alexa 488, para detecção directa da âncora GPI e de células tratadas com um anticorpo monoclonal anti-CD59 conjugado com isotiocianato de fluoresceína (mAb-antiCD59:FITC), para detecção de CD59 à superfície da célula. (A) Análise de eritrócitos. Não podem ser tratados com FLAER, pelo que a análise se refere apenas ao tratamento com mAb-antiCD59:FITC. (B) Análise de plaquetas. Resultados de células tratadas com mAb-antiCD59:FITC. (C) Análise de granulócitos. Padrões observáveis em células tratadas com FLAER e mAb-antiCD59:FITC. (D) Análise de fibroblastos. A natureza constitutiva da mutação causadora da IGD foi confirmada pela observação dos padrões obtidos para células tratadas com FLAER e mAb-antiCD59:FITC [Imagem adaptada de Almeida, *et.al.*(2006)¹²].

Embora seja produzida numa das mais complexas vias biossintéticas existentes, a âncora GPI, ao contrário de outras vias, para as quais têm sido reportados casos de anomalias em

praticamente todas as enzimas envolvidas, não tinha, até recentemente, estado associada a qualquer doença hereditária detectada. Tentativas para gerar ratinhos *knockout* para o gene *PIGA* resultaram em falhas sucessivas devido à elevada taxa de letalidade causada por problemas no desenvolvimento neuronal durante a embriogénese⁵⁹⁻⁶¹. É sabido que diversas GPI-APs interferem no desenvolvimento do sistema nervoso central, nomeadamente nos processos de mielinização e astrogénese⁶². No entanto, o mesmo não sucedeu quando se criaram ratinhos *knockout* para o gene *PIGA* apenas em HSC. Conjuntamente, estes resultados comprovam a importância da âncora GPI no desenvolvimento neuronal embrionário, mas não na hematopoiese^{48, 63}, sendo esta provavelmente a principal razão para a ausência de casos reportados de doenças hereditárias associadas a GPI.

Na IGD, a proporção de plaquetas deficientes em CD59, um inibidor do sistema do complemento, levaria à sua activação, o que poderia explicar a existência de trombozes nos pacientes com esta doença. Por outro lado, a deficiência de CD59 num número limitado de eritrócitos, explicaria a ausência de hemólise. No entanto, a existência de uma pequena percentagem de eritrócitos GPI⁻ foi suficiente para detectar a ocorrência de hemólise vascular subclínica. É de frisar que, de uma forma geral, os diferentes tipos de células hematopoiéticas apresentam um quadro de deficiência parcial na expressão da âncora GPI. A natureza parcial desta deficiência pode então explicar a razão pela qual as crianças afectadas não morreram antes do nascimento, como seria espectável se a deficiência de GPI fosse total, tal como se observou nos modelos de ratinho *PIGA*⁻⁵⁹. Todos estes dados levaram os autores a postular que estariam perante uma nova patologia, de natureza constitutiva, provocada pela síntese deficiente e parcial da âncora GPI, cuja expressão não era uniforme em todos os tipos celulares e que apresentava um padrão de hereditariedade associado. Esta patologia foi denominada de Deficiência Hereditária de GPI ou IGD¹².

Base genética da IGD

Uma combinação de técnicas bioquímicas e genéticas permitiram determinar que a proteína PIGM está ausente na IGD. Esta enzima, corresponde à subunidade catalítica da primeira manosiltransferase da via (GPI-MT-I), de 423 resíduos, que actua com PIGX na adição do primeiro resíduo de manose ao acil-GlcNPI^{29, 30}, logo após a sua translocação para a face luminal do RE. Ao contrário das outras MT presentes na via de GPI, a MT-I catalisa uma ligação α -1-4-manosil à GlcN, através do motivo DXD, característico das glicosiltransferases²⁹. A ausência desta subunidade provoca o bloqueio da via, após a translocação do complexo para o lúmen do RE, o que impede o seu transporte pela via secretora e, consequentemente, a apresentação das GPI-APs à superfície da célula¹². A GPI-MT-I é codificada pelo gene *PIGM*, um gene monoexónico²⁹, localizado no braço pequeno do cromossoma 1 (1q23), que apresenta uma região codificante de 1,2Kb, ladeada por uma região 5'-UTR de 2000pb e uma região 3'-UTR de 800pb, e é transcrito no sentido *antisense* relativamente ao

centrómero. *PIG-M* tem expressão constitutiva, sendo classificado como um gene *housekeeping*. Mapeamentos de homozigotia, análises de *linkage* e a sequenciação directa de *PIGM* permitiram identificar a existência de uma mutação pontual – uma transversão C>G – na posição -270 da região promotora deste gene. Esta posição ocorre numa ilha GC e abrange uma sequência de reconhecimento do FT Sp1. Ensaio de transfecção transiente provaram que *PIGM* é o gene afectado na IGD e que a presença da mutação -270C>G provoca uma redução significativa da sua expressão (99% quantificado por qPCR)¹². As análises de sequenciação permitiram ainda observar que os progenitores das crianças afectadas são heterozigóticos para esta transversão e que as crianças afectadas são homozigóticas, o que está em conformidade com a transmissão autossómica recessiva postulada.

Regulação transcricional de *PIGM*

Tipicamente, o promotor de um gene *housekeeping*, como é o caso de *PIG-M*, não contém caixa TATA, nem caixa CAAT, pelo que a sua activação ocorre a partir de uma ou mais regiões ricas em G+C. As ilhas GC são reconhecidas pelos FT da família Sp/EKLF (*specificity protein/Erythroid Krüppel-like factor*), que, em conjunto com o elemento InR, e muitas vezes em sinergia com FT específicos, levam à activação da transcrição^{64, 65}. Estes elementos são essenciais à expressão de genes constitutivos, genes específicos de tecido e alguns genes virais. Para além disso, ocorrem frequentemente na região promotora de genes sujeitos a regulação específica, tais como os envolvidos no ciclo celular, na activação hormonal e nos padrões de desenvolvimento^{65,88}. Pensa-se, que os promotores dependentes de GC representam 62% dos genes codificantes de proteínas, sendo maioritariamente genes *housekeeping*⁶⁶.

SP1

Sp1 é um FT ubíquo, essencial à activação de inúmeros genes, nomeadamente diversos genes *housekeeping*, sendo particularmente importante na regulação da transcrição de genes que não contêm caixa TATA⁶⁷. Tal como outros FT da sua família, Sp1 contém três domínios de ligação ao DNA próximos da extremidade carboxílica, constituídos por dedos de Zn do tipo C₂H₂.(Cys₂His₂) e dois domínios ricos em glutaminas, próximos da extremidade amínica, denominados domínios de transactivação (TADs). Os domínios TAD interagem directamente com a TBP (*TATA-binding protein*) e com a TAF4 (*TBP associated factor 4*), formando o complexo TBP/TFIID, que se liga ao promotor, o que por sua vez leva ao recrutamento de TFIIA e da RNA Pol II e assim à formação do complexo de pré-iniciação da transcrição⁶⁷. Sp1 reconhece preferencialmente a sequência consensus 5'-G/T-GGGCGG-G/A-G/A-C/T-3', que se encontra normalmente à distância de 50 a 200pb do local de início da transcrição⁶⁸⁻⁷⁰. Para além disso, tem a capacidade de se ligar a caixas CT e caixas GT, mas com muito menor afinidade^{65, 67}. A actividade transcricional de Sp1 é regulada de diversas formas: pela interacção directa com os componentes da maquinaria de transcrição basal

(FT gerais e RNA Pol II); pela interacção com outros FT, nomeadamente factores específicos de tecido^{64, 71-77} pela interacção com outras proteínas (supressores de tumores e oncogenes)⁷⁸⁻⁸⁶; por modificações pós-traducionais (fosforilação por cinases dependentes de DNA⁸⁷); ou ainda pelo recrutamento de acetilases e/ou desacetilases de histonas para a região promotora⁸⁸⁻⁹³. Sp1 tem, assim, a capacidade de actuar em sinergia, directa e/ou indirecta, consigo próprio ou com outros factores⁹⁴⁻⁹⁶. Sp1 é um transactivador, que actua através dos domínios DBD, recrutando a maquinaria de transcrição basal pela ligação de uma única molécula ao local de reconhecimento no promotor, ou formando homooligómeros ou até homomultímeros⁹⁷. A interacção com outros FT pode ocorrer por ligação em cooperação ao DNA⁹⁸⁻¹⁰⁰ ou pelo recrutamento conjunto da maquinaria de transcrição basal, mesmo quando a região promotora se encontra saturada^{83, 94, 101}. Ainda assim, a ligação directa não é um pré-requisito para a ocorrência de sinergia⁶⁷. Alguns FT superactivam Sp1 quando este se encontra ligado ao DNA, sem que eles próprios entrem em contacto com o promotor. É este o caso dos factores AP-2 (*activator protein-2*), c-Jun e GATA-1 no gene EpoR (eritropoietina) e nos genes da α -globina e β -globina⁶⁷. Noutros casos tem que ocorrer a ligação de ambos os factores ao DNA para que ocorra activação da expressão. Muitas vezes ocorre simultaneamente sinergia e superactivação no mesmo promotor, dependendo da presença ou ausência de alguns locais Sp1⁶⁷. Em suma, o efeito sinérgico de Sp1 com factores específicos de tecido (e.g. GATA-1 nas células eritróides), factores indutíveis (e.g. SREBO-1 em resposta à depleção de esteróis), na regulação de grupos de genes específicos de tecido (como as globinas e o receptor EpoR) e de genes indutíveis (como as proteínas envolvidas na assimilação de colesterol, na via biossintética do colesterol e na via dos ácidos gordos), é já um tema recorrente⁶⁷. Para além disso, Sp1 está envolvido na regulação positiva da transcrição, ao estimular a actividade de acetilação de histonas do complexo CBP/p300 (p300 funciona como coactivador das TADs de Sp1), liga-se directamente a nucleossomas estabelecendo domínios de eucromatina dentro de regiões heterocromáticas e impede simultaneamente a metilação das ilhas GC⁶⁷. Pode ainda participar na regulação negativa de alguns genes, ao ligar-se directamente à desacetilase de histonas HDAC1⁶⁷ e/ou à DNA metiltransferase 1 (DNMT1)⁸⁶, bem como a diversas proteínas correpressoras. Almeida *et al.* provaram que Sp1 é necessário e suficiente à expressão normal do gene *PIGM*, pelo facto da existência da mutação causadora da IGD levar à ausência de expressão (em células linfoblastóides dos pacientes e em células HeLa), mesmo na presença de Sp1¹². No entanto, estas observações não eram consistentes com a expressão diferencial observada nos diversos tipos de células sanguíneas dos pacientes de IGD (Fig.1.5). De facto, era necessário investigar a razão pela qual *PIGM* apresenta um nível de expressão *quasi-normal* nas células da linhagem eritróide/megacariocítica, mas não nos granulócitos.

GATA-1

As células sanguíneas são continuamente repostas a partir de uma *pool* de HSC e dado o dinamismo da hematopoiese, uma elaborada rede de factores reguladores da transcrição torna-se necessária para assegurar que é gerada, e mantida em níveis constantes, uma população apropriada de células sanguíneas maduras¹⁰². Diversas publicações têm evidenciado que FT restritos de linhagem, são os responsáveis pela manutenção da homeostase do sistema hematopoiético (concertação da proliferação, diferenciação e sobrevivência celulares) e defeitos nos seus níveis e/ou actividade estão intimamente ligados à desregulação hematopoiética¹⁰². Estudos sobre a expressão das globinas na eritropoiese têm servido de modelo para compreender os mecanismos que governam a expressão génica durante o desenvolvimento eritróide⁹⁴. Inúmeros trabalhos têm revelado a existência de três aspectos críticos no que respeita a regulação da expressão destes genes: (1) as sequências mínimas que conferem especificidade na expressão incluem locais GATA, locais AP-1/NF-E2 e locais Sp1/EKLF (GC ou GT/CCACC)¹⁰³; (2) nenhum destes motivos tem a capacidade de induzir, sozinho ou em multímeros, a diferenciação de células eritróides num ratinho transgénico, sendo necessários pares ou grupos destes motivos com diferentes configurações para criar células eritróides¹⁰⁴; (3) os promotores de genes específicos do programa eritróide, demonstram a existência de um complexo equilíbrio entre elementos positivos e negativos, que actuam, de forma independente, ou em diversas formas de sinergia⁹⁴. A existência de locais GATA e Sp1 a uma distância relativamente fixa da região reguladora de um gene é, por si só, indicativa da ocorrência de cooperação funcional destas proteínas na transcrição⁹⁴. Os factores GATA constituem uma família de FT com perfis de expressão restritos, sugerindo que regulam genes específicos de tecido e, por isso, definem a sua especificidade¹⁰⁵. Esta família compreende três FT hematopoiéticos (GATA-1, 2 e 3) e três não hematopoiéticos (GATA-4, 5 e 6), que são expressos em tecidos diversos, como intestinos, pulmões, sistema endócrino, coração e células de Sertoli. Os factores GATA reconhecem a sequência *consensus* (A/T)GATA(A/G) através de dois motivos de dedos de Zn do tipo C4 (Cys-X₂-Cys-X₁₇-Cys-X₂-Cys), altamente conservados intra- e interespécies^{94, 106}. GATA-1 é o protótipo dos FT hematopoiéticos, sendo que está tipicamente envolvido na maturação das linhagens eritróide e megacariocítica, pela regulação de diversas moléculas-chave associadas à proliferação, diferenciação e apoptose^{102, 106}, tem sido implicado na reprogramação de diversos precursores hematopoiéticos e é essencial na eritropoiese¹⁰⁶ (Fig.1.6). Na realidade, HSC deficientes em GATA-1, em ratinhos quiméricos, são capazes de contribuir para o desenvolvimento de todo o tipo de tecidos, com excepção dos eritrócitos, tendo sido provado que ocorre a acumulação de proeritroblastos incapazes de amadurecer¹⁰⁷. Ensaios de *knock-down* com o intuito de diminuir em 95% a expressão de GATA-1 (*Gata1.05/Y*), em ratinhos hemizigóticos macho, causam anemia severa, que os leva à morte ao dia 12,5 do desenvol-

vimento embrionário^{102, 108, 109}. Fêmeas hemizigóticas (*Gata1.05/X*), por outro lado, sobrevivem, mas apresentam diversos graus de anemia e trombocitopenia, dependendo do alelo *GATA-1* que se encontra no cromossoma activo. O *knockdown* total leva à paragem da maturação eritróide, causando letalidade no mesmo modelo animal^{110, 111}. *GATA-1* possui três domínios activos: os dedos de Zn C- e N-terminal (ZnC e ZnN, respectivamente) e um domínio de activação N-terminal (NTD). O ZnC reconhece e liga-se à sequência *consensus* do DNA^{112, 113}, o ZnN participa na estabilização de *GATA-1*, na especificidade de reconhecimento da sequência *consensus* no DNA, medeia a formação de complexos com cofactores, como FOG1, e colabora com o dedo ZnC no reconhecimento e sinergia com outros FT^{112, 114-119}. O NTD é essencial à função de regulador transcrricional^{112, 120}.

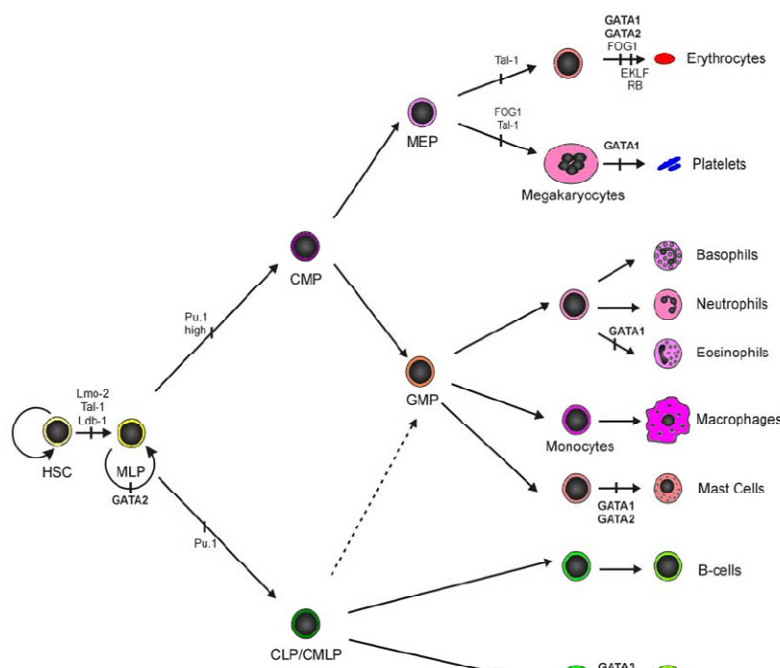


Fig.1.5: Árvore hematopoiética. Representação esquemática dos vários passos da diferenciação hematopoiética. A célula estaminal hematopoiética (HSC) está na base da hierarquia que é estabelecida na hematopoiese e dá origem ao progenitor de linhagens múltiplas (MLP). Este pode diferenciar-se em qualquer uma das linhagens hematopoiéticas. Os MLPs ficam restringidos às linhagens linfóide e mielóide quando se desenvolve o progenitor linfóide comum (CLP) ou o progenitor mielóide comum (CMP), respectivamente. Os CLPs dão origem exclusivamente a linfócitos B ou T, enquanto que os CMPs podem dar origem a progenitores eritróides/ megacariocíticos (MEP) e progenitores granulócitos/ monocíticos (GMP). Os CMLPs podem diferenciar-se em linfócitos B, linfócitos T e GMPs (tracejado). Os factores hematopoiéticos decisivos nestes processos são Pu.1, Tal-1, GATA-1, GATA-2, GATA-3 e o cofactor de GATA-1, FOG1. *GATA-1* é essencial à maturação da linhagem eritróide/megacariocítica e participa na diferenciação de eosinófilos e mastócitos. [Imagem adaptada de Ferreira, R. *et al.*(2005)¹⁰⁶].

Trabalhos recentes revelaram que a expressão ectópica de *GATA-1* leva os precursores hematopoiéticos ao *commitment* da linhagem eritróide/megacariocítica^{108, 121}. No entanto, não é claro, se esta é uma restrição causada especificamente pelo FT ou se é um efeito da expressão ectópica de um FT específico de linhagem¹²². Uma vez que *GATA-1* se situa no cromossoma X, doenças provocadas por mutações neste gene têm transmissão por via sexual e provocam o aparecimento de deficiências hematopoiéticas pleiotrópicas, dependendo da função afectada. Contudo, não são só as mutações no gene, mas também a alteração dos níveis de expressão de *GATA-1* podem provocar inúmeras doenças hematológicas¹⁰². A transcrição de *GATA-1* é regulada por um mecanismo de *feedback loop*, uma vez que o seu promotor contém múltiplos locais *GATA* que são essenciais à activação da sua expressão^{120, 123, 124}. *GATA-1* interage com diversos FT, tais como: *GATA-1*, *EKLF*, *Fli-1*, *HDACS*, *PU.1*, *RUNX1*, *CBP/p300*, *FOG-1* e *Sp1*, entre outros^{94, 106, 120, 125, 126}. Liga-se a

FOG-1 através do ZnN e esta associação é essencial à diferenciação eritróide¹²⁷, interage com Sp1 e EKLf através do ZnC^{106, 128} e reconhece RUNX1 através do NTD, sendo esta a única interacção conhecida deste FT que não envolve os dedos de Zn¹²⁹.

OBJECTIVOS

O facto da IGD ser provocada por uma mutação pontual num único gene, afectar apenas parcialmente as linhagens hematopoiéticas, o facto de Sp1 actuar muitas vezes em sinergia com FT específicos de tecido, tais como GATA-1, mas acima de tudo, o facto de ocorrerem níveis de expressão da âncora GPI distintos nos diferentes tipos de células hematopoiéticas – a expressão predominantemente positiva de GPI nos eritrócitos de doentes com IGD difere de forma marcante da ausência de GPI detectada nos granulócitos dos mesmos indivíduos - levaram a que fosse colocada a questão:

Tratando-se PIGM de um gene *housekeeping* poderia estar sujeito a uma regulação transcricional tecido-específica? E assim sendo, quais os factores implicados?

Com a intenção de obter uma resposta a esta questão, o objectivo principal deste trabalho foi:

Investigar o mecanismo de uma possível regulação transcricional do gene *PIGM* específica de linhagem eritróide/megacariocítica.

Sabendo que GATA-1 é um FT, que actua na diferenciação hematopoiética, tendo um papel preponderante na eritropoiese, mas não na granulopoiese¹⁰⁶, foi colocada a hipótese de ser este o factor diferenciador dos níveis de expressão da âncora GPI nas linhagens celulares sanguíneas. Neste contexto, a hipótese testada foi:

Verificar se GATA-1 tem um papel regulador na transcrição do gene *PIGM* e investigar como actua neste promotor em condições fisiológicas e no contexto da IGD.

MATERIAIS E MÉTODOS

CULTURA DE CÉLULAS

A realização dos ensaios inerentes ao trabalho de projecto teve como base a linha celular eritroleucémica humana (K562), proveniente de leucemia mielóide crónica (CML) e a linha celular de carcinoma do colo do útero humano (HeLa). A linha K562 foi cultivada em RPMI-1640 (1X) suplementado com 10% FBS e a linha HeLa em DMEM com 10% FBS, de acordo com procedimentos usuais. Os meios utilizados estão indicados no Anexo II.

MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS

OBTENÇÃO DE SEQUÊNCIAS

As sequências das regiões em estudo foram obtidas a partir das bases de dados *Ensembl*

Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>) e *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9606).

DESENHO DE PRIMERS

As sequências de *primers* foram desenhadas recorrendo às aplicações Primer3 (v.0.4.0) (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>), *primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e qRTDesigner1.2 (<http://bioinfo.ut.ee/gwRTqPCR/>) (Anexo III Tabelas 1, 3, 4, 5 e 6). Todos os *primers* seleccionados foram analisados pela ferramenta *UCSC In-Silico PCR* (<http://genome.cse.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) e *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGenBlastGen.cgi?taxid=9606>) para determinar a especificidade de amplificação.

ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS

A análise de locais putativos de ligação de GATA-1 à região promotora do gene *PIGM* foi feita pelas aplicações *Transcription Element Search System* (TESS) (<http://www.cbit.upenn.edu/tess/>) e *TFSearch* (v1.3, 1995, Yutaka Akiyama, Universidade de Kyoto, Japão) (<http://www.cbrc.jp/htbin/nph-tfsearch>).

ENSAIO DE ALTERAÇÃO DA MOBILIDADE ELECTROFORÉTICA (EMSA)

Extractos nucleares de K562 foram preparados por centrifugação diferencial do lisado celular e as proteínas foram quantificadas pelo método colorimétrico de Bradford. Foram utilizadas sondas oligonucleotídicas com as várias sequências reconhecimento de GATA-1 presentes no promotor de *PIGM* e sequências de controlo marcadas radioactivamente com ^{32}P pela cinase de polinucleótidos T4 (T4K). A remoção de ^{32}P livre foi realizada com o *QIAquick Gel Extraction Kit (250)* (Sondas: Tabela 1, Anexo III). Nas reacções de ligação, 4µg de extracto nuclear foram incubados durante 1 hora com sondas marcadas num tampão de ligação com excesso de sonda fria ou um anticorpo anti-GATA-1 (Santa Cruz) (Tabela 2, Anexo III). Após a incubação, as amostras foram corridas num gel de 4% poliacrilamida, secado a vácuo e visualizado por autorradiografia em película *Kodak Biomax MS Film* (Kodak) (Anexo II).

ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA (CHIP)

A imunoprecipitação de cromatina (ChIP) é apropriada à detecção, *in vivo*, da ligação de proteínas conhecidas a regiões específicas do genoma¹³⁰. Neste trabalho, foi aplicada à detecção da ligação de GATA-1 à região promotora do gene *PIGM*. O ChIP divide-se nas fases de fixação (ou *cross-linking*) por formaldeído, imunoprecipitação e quantificação do DNA precipitado. Células K562 foram incubadas com formaldeído (1%), durante 10 minutos, à temperatura ambiente (TA), com agitação moderada. Foi adicionada glicina (0,125M) e a solução foi incubada durante 5 minutos à TA, com agitação moderada. As células foram recolhidas por centrifugação a 1200 rpm. Foram lavadas com PBS (1x), mantido a 4°C,

recentrifugadas e lisadas recorrendo ao kit comercial *Red ChIP Kit™* (Diagenode), de acordo com as instruções. De seguida as amostras foram sujeitas a 15 ciclos de impulsos ultrassónicos de 30s, intervalados por períodos de repouso de 30s em gelo, na potência de 60%. No processo foi utilizado o sonicador *Sanyo Soniprep MSS 150 CX3.5*. Seguiu-se uma centrifugação a 13000 rpm, a 4°C, durante 5 min. A eficiência do processo foi verificada correndo 4µL de DNA quebrado num gel de agarose a 1,5%. Extractos de 2 milhões (60µL) de células foram incubados com 2,5µg de anticorpo *Rabbit polyclonal to GATA-1 ChIP Grade Antibody* (1,26mg/mL) (amostras IP), o/n, num *rocker*, a 4°C. Um volume igual foi incubado sem anticorpo nas mesmas condições (amostras NC ChIP). Todas as amostras foram diluídas em tampão próprio, de acordo com o protocolo do kit *OneDay ChIP Kit™* (Diagenode). Para a imunoprecipitação foram incubados 250µL de complexos anticorpo-cromatina com 500µL de *beads*, como indicado pelo fabricante. Os complexos de esferas-anticorpo-cromatina (IP e NC ChIP) foram lavados com PBS arrefecido em gelo e os *cross-links* foram revertidos por incubação em água a ferver durante 10min, seguida de incubação numa estufa de hibridação (*Thermomixer*), a 55°C, com 1,5µL de proteinase K e nova incubação, em água a ferver, durante 10min, para inactivação da enzima. Após a reversão, um volume total de 200µL de fragmentos de DNA libertados das proteínas foi recuperado por centrifugação a 12000rpm, a 4°C, por 1min. O DNA das amostras *inputs* foi purificado por precipitação com etanol absoluto. Uma alíquota de cada amostra foi amplificada por PCR convencional (Tabela 7, Anexo III). Os reagentes do ensaio são apresentados no Anexo II.

PCR QUANTITATIVO (qPCR)

A análise dos fragmentos precipitados foi realizada por qPCR com *SYBR Green I Dye* (Quanta Biosciences) (Tabelas 3 e 4, Anexo III). As curvas de calibração foram obtidas a partir da amplificação de amostras de diluições seriadas (de 10^{-1} a 10^{-4}) dos *inputs*. Foram usados como controlos: a região promotora do gene *c-Kit* - controlo positivo e duas regiões genómicas, a montante e a jusante do promotor de *PIGM* (*upstream* e *downstream*, respectivamente) - controlos negativos e os *inputs* - controlos internos. Todas as reacções foram realizadas em triplicado. Nas reacções de PCR foram utilizados 2µL de DNA, e nas reacções de qPCR foram utilizados 2,5µL de DNA, *PerfeCta™ SYBR Green® FastMix™*, *ROX* (1x) (Quanta Biosciences) e 150nM de cada *primer* (*forward* e *reverse*) num volume total de 10µL, de acordo com as indicações dos produtores. As reacções de qPCR foram seguidas de ciclos de desnaturação (Tabela 7, Anexo III). Estas reacções foram executadas com o *ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems). A eficiência de amplificação foi calculada pelo declive da curva das diluições seriadas dos *inputs*, de acordo com as instruções do fabricante¹³¹. Para a análise estatística foi realizado um teste F, para verificação das diferenças e de seguida um teste t de *Student*, para comparação de médias. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

MUTAGÉNESE SÍTIO-DIRIGIDA

A mutagénese sítio-dirigida teve como objectivo a criação de construções do promotor do gene *PIGM*, clonado a montante do gene *luc*, no plasmídeo *pGL3-Basic Vector* (Promega) para efectuar os ensaios repórter. O sistema *GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System* (Invitrogen) foi utilizado e consistiu nos seguintes passos: metilação inicial, mutagénese e transformação da estirpe competente com o produto da mutagénese. Todos os passos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante (Anexo II) e com os *primers* indicados na Tabela 5 do Anexo III. Os plasmídeos de interesse foram extraídos das culturas bacterianas utilizando o *High Pure Plasmid Isolation Kit (Miniprep)*. Para detecção e confirmação das mutações, procedeu-se à amplificação da região-alvo por PCR, usando os pares de *primers* Sp1 e M52. A reacção de PCR foi realizada com a *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen). Os produtos do PCR foram isolados e purificados de um gel de agarose a 2%, usando o *QIAquick Gel Extraction Kit (250)* e o DNA foi quantificado por comparação de intensidade das bandas com o marcador *pUC Mix Marker 8* (0,5µg/µL) (Fermentas). As reacções para a sequenciação automática dos produtos de PCR foram realizadas com o *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 6, Anexo III). As amostras foram amplificadas no *T3000 Thermocycler* (Biometra) de acordo com a Tabela 7 do Anexo III. Após purificação dos produtos de PCR, as amostras foram carregadas no sequenciador automático *ABI PRISM 310 Genetic Analyser*. As sequências obtidas pelo *software ABI PRISM 310 Data Collection Software, v2.0* foram comparadas com as sequências de referência obtidas das bases de dados *Ensembl* e NCBI. Após a verificação do sucesso da mutagénese os plasmídeos de interesse foram amplificados na estirpe bacteriana *E.coli One shot Top10* (Invitrogen), sendo depois extraídos, purificados utilizando o *QIAfilter Plasmid Midi Kit (25)* (QIAGEN), quantificados com o *NanoDrop Nd-1000 UV/Vis 1µl Spectrophotometer* e armazenados a -20°C para uso posterior nos ensaios repórter. Os reagentes estão indicados no Anexo II.

ENSAIOS REPÓRTER

Os ensaios repórter são utilizados para estudos de expressão génica e fisiologia celular em eucariotas. Neste trabalho, células HeLa foram transfectadas, por lipofecção, com o plasmídeo repórter *pGL3-Basic* (Promega) com o gene da Luciferase e conjugado com diversas versões da sequência promotora de *PIGM*. O plasmídeo pRL-CMV, com a Renilla Luciferase, foi utilizado para servir de controlo normalizador. As células foram ainda co-transfectadas com o plasmídeo de expressão de GATA-1 - pGATA-1, gentilmente cedido pelo Dr. Paresh Vyas (Univ.de Oxford, UK). Para cada transfecção, foi usada uma proporção de 1,5µL de *Lipofectamine™ 2000* (LF2000) (Invitrogen) para 800ng de DNA exógeno, sendo que 500ng correspondiam ao vector repórter *pGL3-Basic:PIGM-Luc*, 250ng ao vector pGATA-1 e 50ng ao vector repórter pRL-CMV. Cada reacção foi realizada em triplicado e de acordo com as

instruções do produtor. Após a transfecção, as placas foram incubadas a 37°C, em estufa de CO₂, durante 48h. Para a leitura da actividade enzimática, as células foram lisadas com tampão de lise *Passive Lysis Buffer* (PLB) (Promega) e 50µL de lisado foram transferidos para placas de 96 poços, às quais se adicionaram 30µL do substrato *Luciferase Assay Reagent* (LAR II) (Promega). A medição da actividade da Luciferase foi efectuada num *MicroLumatPlus LB96V Microplate Luminometer* (EG&G Berthold, Austrália) imediatamente após a adição do substrato, por um período de 10s/poço. Após a primeira leitura foram adicionados 30µL do substrato *Stop&Glo[®] Reagent* (Promega) e foi lida a luminescência por um período de 3s/poço. Os resultados obtidos foram retirados do programa *Winglow* (EG&G Berthold) e foram depois tratados em Excel (Microsoft, EUA). A análise estatística para comparação das médias das diversas construções foi efectuada pelo teste ANOVA. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os reagentes são apresentados no Anexo II.

RESULTADOS

ESTRATÉGIA

Para verificar se GATA-1 é responsável pela expressão *quasi-normal* de GPI em eritrócitos foram utilizadas as seguintes estratégias (Fig. 3.1):

1. Análise bioinformática da região promotora para identificação de sequências *consensus* putativas para o FT GATA-1;
2. Estudo da ligação de GATA-1 *in vitro* às sequências identificadas em 1;
3. Análise da ligação de GATA-1 ao promotor de *PIGM* *in vivo* num modelo celular;
4. Estudo do efeito funcional de GATA-1 sobre a actividade transcripcional no promotor de *PIGM*.

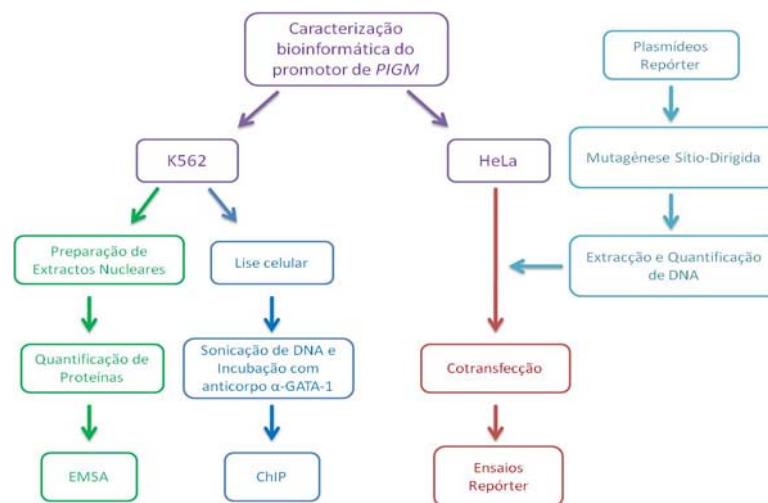


Fig.3.1: Estratégia adoptada neste trabalho. Após a caracterização bioinformática da região promotora do gene *PIGM*, foram realizados ensaios de EMSA para determinar se GATA-1 se liga aos locais identificados *in vitro*. A confirmação da mesma ligação *in vivo* foi estudada pelos ensaios de ChIP e análise do efeito funcional de GATA-1 sobre a sequência promotora foi estudada por ensaios repórter com o gene da Luciferase.

CARACTERIZAÇÃO DO PROMOTOR DE *PIGM* POR ANÁLISE *IN SILICO*

Em busca de um potencial mecanismo que explicasse a transcrição preferencial do gene



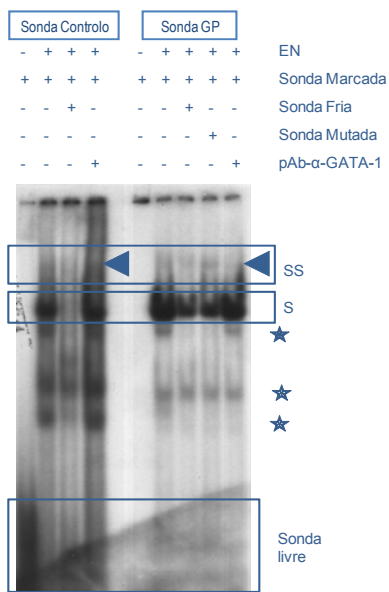
PIGM em eritrócitos, foi realizada uma análise bioinformática da região promotora deste gene¹³². Esta análise revelou que o promotor de *PIGM* contém características típicas de promotores de genes *housekeeping*, tais como ausência da caixa TATA e caixa CAAT, contrastando com a ocorrência da sequência InR e um elevado teor GC^{133, 134}.

Fig.3.2: Sequência nucleotídica da região 5' do gene *PIGM*. Os potenciais locais de ligação de diferentes proteínas ao DNA estão sublinhados. O local de início da transcrição encontra-se marcado por uma seta verde e o local de início da tradução, que codifica a metionina iniciadora, está indicado por um círculo a roxo. Este promotor possui ainda quatro locais Sp1 e três locais GATA-1 identificados pelas ferramentas bioinformáticas *TESS* e *TFSearch*. Não possui caixa TATA, nem caixa CAAT, mas possui uma sequência InR (não mostrada). A estrela vermelha indica o local onde ocorre a mutação causadora de IGD.

Almeida *et.al.* tinham já identificado quatro locais Sp1, dos quais o proximal se revelou ser necessário e suficiente à expressão normal do gene *PIGM*¹². Nesta análise, foram detectados três locais de reconhecimento de GATA-1 a montante dos locais Sp1 identificados. Estes locais foram denominados GP, GC e GD (proximal, central e distal) e situam-se a -650pb, -750pb e -810pb do ATG, respectivamente (Fig.3.2).

GATA-1 RECONHECE *IN VITRO* AS SEQUÊNCIAS PREVISTAS

Para determinar se o FT GATA-1 reconhece as sequências de ligação identificadas bioinformaticamente, foram realizados ensaios de alteração da mobilidade electroforética (EMSA),



recorrendo a extractos nucleares de células K562 - linha celular eritroleucémica, que expressa constitutivamente GATA-1. O ensaio de EMSA assenta no princípio de que os complexos proteína-DNA podem ser diferenciados de fragmentos DNA por electroforese. No caso do local proximal (GP), os dados revelaram a formação de uma banda atrasada (*shift*) após incubação do extracto nuclear com a sonda marcada (Fig.3.3).

Fig.3.3: Ensaio de alteração da mobilidade electroforética (EMSA). Foram utilizados extractos nucleares de células K562. São apresentados os resultados para os ensaios com a sonda GP marcada radioactivamente, com a sonda de controlo positivo para o local proximal (GP). Observou-se ainda que GATA-1 complexa também inespecificamente, o que se revelou pelo aparecimento das bandas assinaladas com asterisco. EN – extracto nuclear; pAbα-GATA-1 – anticorpo policlonal anti-GATA-1. Esta imagem é da cortesia de Joana S.Costa, CIPM-IPO, que realizou este ensaio.

Esta banda foi muito reduzida pela adição de sonda fria (competição específica) e também na presença da sonda mutada (competição inespecífica). Já os ensaios realizados na presença do anticorpo policlonal anti-GATA-1 (pAb- α -GATA-1), revelaram a formação de um complexo que apresentou uma velocidade de migração ainda menor, denominado *supershift*. Nenhuma destas bandas foi observada na ausência de extracto nuclear. Estes resultados revelaram que GATA-1 se liga à sequência proximal esperada de modo específico, embora tenha também ocorrido ligação inespecífica, observável pela presença de bandas supranumerárias. Os locais GC e GD apresentaram o mesmo tipo de comportamento (dados não mostrados), o que indicou que GATA-1 reconhece *in vitro* qualquer uma das sequências identificadas bioinformaticamente.

GATA-1 LIGA-SE *IN VIVO* AO PROMOTOR DE *PIGM*

Para determinar se GATA-1 tem a capacidade de se ligar às sequências GATA putativas, *in vivo*, foram realizados ensaios de imunoprecipitação de cromatina (ChIP). Para o efeito, foi utilizada cromatina de extractos de K562 sonicada em fragmentos de tamanhos compreendidos entre os 500pb e 1kb. A análise destes resultados foi efectuada por PCR convencional e qPCR. Nos resultados do PCR convencional (Fig.3.4) verificou-se que a incubação da cromatina com o pAb- α -GATA-1 resultou num aumento visível da intensidade das bandas dos produtos de PCR, que se deve ao enriquecimento do imunoprecipitado em fragmentos de DNA com as sequências-alvo pela incubação com o anticorpo. Note-se, que os locais GC e GP foram analisados conjuntamente (bandas GP+GC), já que se encontravam demasiado próximos na região promotora para garantir a quebra eficiente da cromatina entre eles. Foi observado um enriquecimento em fragmentos de DNA para todas as sequências-alvo esperadas, bem como um aumento da especificidade da sua amplificação, dado não terem aparecido as bandas de maior dimensão, visíveis nos ensaios *INPUT* (material de partida).

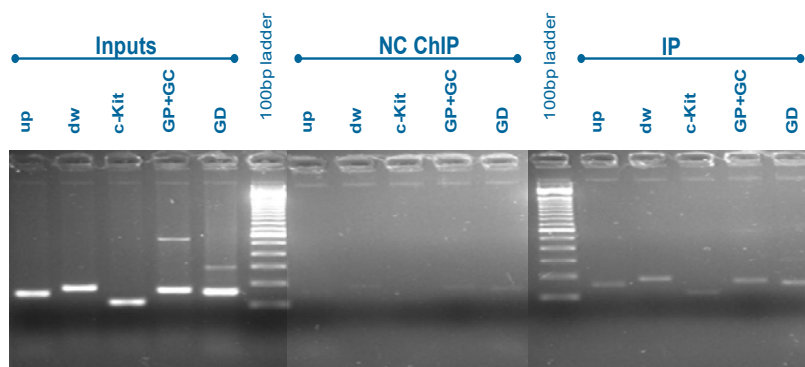


Fig.3.4: Resultado do ChIP por PCR convencional. As reacções *INPUT*, correspondentes a fragmentos de DNA sonicado amplificados e não sujeitos ao processo de imunoprecipitação, foram utilizados como controlo positivo das reacções de PCR e para a elaboração das curvas de calibração no qPCR. As bandas de controlo negativo do ChIP (NC ChIP) correspondem às reacções realizadas com fragmentos de cromatina que foram sujeitos a imunoprecipitação sem anticorpo pAb- α -GATA-1. Verifica-se que todas as reacções de *INPUT* foram positivas para a presença da sequências-alvo. Nas

reacções dos controlos negativos, todas as bandas apresentaram uma intensidade muito inferior às bandas respectivas dos ensaios de imunoprecipitação com o anticorpo. Para determinar o tamanho das bandas foi usado o marcador molecular *100bp Ladder* (Invitrogen). up – região *upstream* do promotor e dw – região *downstream* do promotor – controlos negativos; c-Kit – controlo positivo.

Como mostra a figura, é interessante notar que no caso do *locus c-Kit*, o ensaio não demonstrou a eficiência esperada, já que a banda obtida foi muito pouco intensa, sendo mesmo semelhante às bandas dos controlos negativos – os *loci upstream* e *downstream*.

Isto sugere que GATA-1 não terá tanta afinidade para este local, como para o promotor de *PIGM*.

Uma vez que pela observação visual se torna difícil determinar a quantidade de DNA presente, recorreu-se ao qPCR para quantificar os fragmentos amplificados nas diversas amostras (Fig.3.5). A eficiência do ChIP foi determinada pela percentagem inicial de fragmentos das amostras *INPUT*, relativamente ao DNA recuperado após a imunoprecipitação (amostras *IP*). Com este intuito, foram calculadas as razões de precipitação entre as amostras *IP* e as amostras *INPUT*, tendo em conta a eficiência de amplificação das reacções de qPCR, de acordo com a equação 1.

$$[1] \quad \%IP = EA^{(CtINPUT - CtIP)} \times Fd \times 100$$

Os resultados revelaram um aumento significativo ($p < 0,05$) da quantidade de fragmentos recuperados para os locais em estudo – GP+GC e GD (Fig.3.5A), o que demonstrou uma grande eficiência da técnica aplicada. No *locus c-Kit* o ensaio não demonstrou a eficiência esperada, já que revelou ter um nível pouco superior ao dos controlos negativos – os *loci upstream* e *downstream*, tal como foi observado anteriormente.

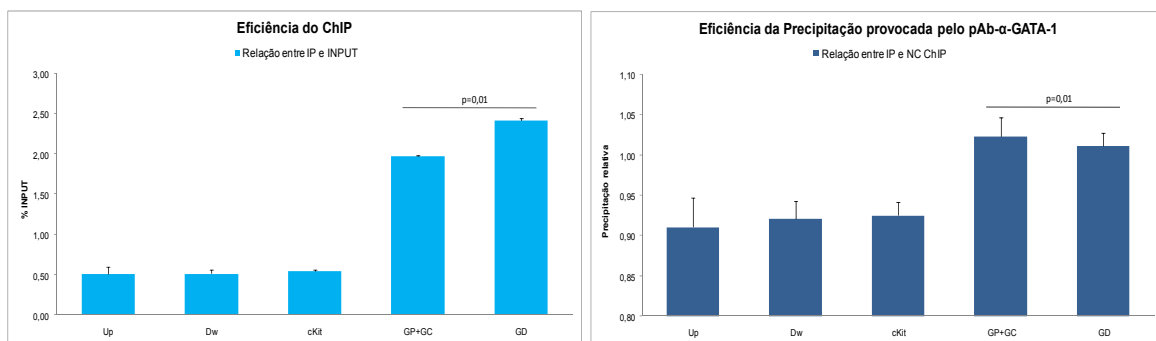


Fig.3.5 – Eficiência do ChIP. (A) A eficiência da imunoprecipitação dos vários *loci* foi medida como uma percentagem do material de partida -amostras *INPUT*- que foi recuperado pela imunoprecipitação (incluindo o desvio padrão da média indicado pela barra de erro). Este cálculo teve em consideração a eficiência de amplificação e os factores de diluição dos *INPUTS* relativamente às amostras imunoprecipitadas (*IP*). (B) Razão da precipitação entre as amostras *IP* e *NC ChIP*. Os resultados são apresentados como a razão das médias de precipitação de fragmentos previamente incubados com pAb-α-GATA-1 (*IP*) e amostras precipitadas sem incubação com anticorpo (*NC ChIP*) (incluindo o desvio padrão da média indicado pela barra de erro). Os resultados representados em ambos os gráficos referem-se a 3 ensaios independentes e foram analisados usando o teste t de *Student* de duas caudas. Valores $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Para determinar a eficiência da precipitação provocada pelo anticorpo anti-GATA-1, foram calculadas as razões de precipitação entre as amostras *IP* e as amostras *NC ChIP*, considerando que a eficiência de amplificação das reacções de qPCR foi próxima do valor ideal, de acordo com a equação 2.

$$[2] \quad EP(pAb\alpha GATA - 1) = 2^{(ctM(NC ChIP) - CtM(IP))}$$

Da análise da Fig.3.5B, verificou-se um aumento significativo de fragmentos precipitados por acção do anticorpo, principalmente na região que abrange os locais GGP+C. Note-se que, tal como no gráfico anterior, o efeito do anticorpo no local c-Kit não foi tão pronunciado como no promotor de *PIGM*, o que reforça a ideia de que existe uma menor afinidade de GATA-1 para aquele local. Para distinguir as associações específicas das inespecíficas que levam

também à precipitação de fragmentos, recorreu-se à comparação entre a quantidade de DNA recuperado nas amostras *IP* e nas amostras de *background*. Esta especificidade, ou taxa de ocupação relativa das sequências-alvo, corresponde à medida da associação do FT a cada um dos locais em estudo. A ocupação relativa dos locais-alvo foi calculada pela razão entre a percentagem de recuperação dos fragmentos presentes em cada local GATA esperado – GP+GC e GD - e dos locais *upstream* e *downstream*, genomicamente irrelevantes no que toca a este FT, e que serviram, portanto, de medida do ruído (*background*) da reacção (equação 3).

$$[3] \quad \text{Taxa Relativa de Ocupação} = \frac{\%IP(\text{locais específicos})}{\%IP(\text{locais background})}$$

Foi observado um enriquecimento de 4,0 vezes na região genómica que abrange os locais GP+GC, quando comparada, com amostras das regiões de *background* (Fig.3.6).

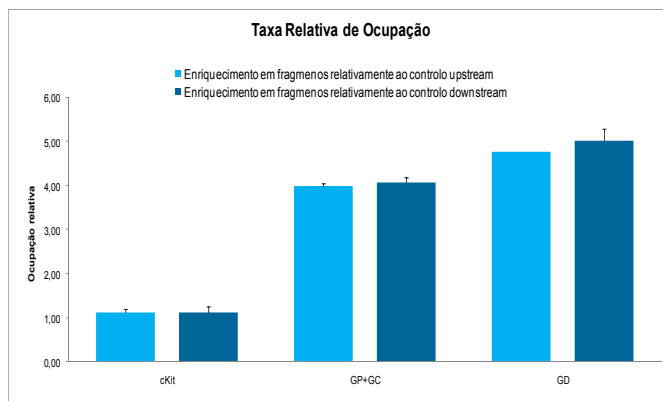


Fig.3.6 – Taxa de ocupação dos locais GATA-1 no promotor de *PIGM* relativamente aos locais *upstream* e *downstream*. Os resultados mostram a razão da precipitação entre as amostras *IP* dos loci em estudo (GP+GC e GD) e dos loci de *background* (*upstream* e *downstream*), usados como controlo negativo do ensaio. O local c-Kit foi usado para controlo positivo do ensaio. Os resultados são apresentados como a razão das médias de precipitação das amostras mencionadas provenientes de 3 ensaios independentes. Os resultados foram analisados usando o teste t de *Student* de duas caudas. Valores $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Já a região genómica distal (GD) mostrou um enriquecimento de 5,0 vezes, relativamente aos mesmos locais. É interessante notar que no caso do controlo positivo da reacção - o local *c-Kit* - se observou, tal como esperado, uma baixa eficiência de precipitação, que ainda assim foi superior a qualquer dos locais de controlo negativo, o que indica que GATA-1 se liga efectivamente a este local, embora com baixa afinidade. É importante relembrar que os locais GC e GP tiveram que ser analisados em conjunto neste ensaio, uma vez que, dada a sua proximidade no promotor, seria impossível garantir a quebra da cromatina entre eles. Previa-se portanto, uma eficiência de precipitação pouco significativa numa análise independente destes locais, pelo que se optou pela sua análise conjunta. Resumindo, os resultados confirmaram que GATA-1 também se deverá ligar aos locais GC e GP do promotor de *PIGM*, *in vivo*, embora não se possa discriminar para qual dos locais terá maior afinidade.

ACTIVAÇÃO SINERGÍSTICA DO PROMOTOR POR SP1 E GATA-1

Um procedimento padrão no estudo funcional de elementos de regulação da transcrição que actuam num promotor é o recurso aos ensaios de transfecção transiente. Este método permite a introdução de plasmídeos híbridos, que consistem na fusão da região promotora a ser estudada com genes repórter, cujo produto da expressão pode ser quantificado. Um gene frequentemente utilizado é o da Luciferase, já que a emissão de luz que produz a determinado c.d.o. é directamente proporcional à quantidade de proteína sintetizada, o que por seu

turno, fornece uma estimativa indirecta da actividade transcricional do promotor. Ensaios repórter realizados anteriormente¹³⁵, demonstraram que a actividade do promotor de *PIGM* é superior em linhas celulares que expressam FT GATA (K562 e SkSy5Y) relativamente células que não os expressam (HL60 e HeLa) (Fig.3.7). Para estudar a influência de GATA-1 na actividade do promotor de *PIGM*, foram utilizadas as células HeLa, que por não expressarem GATA-1, permitiram analisar o seu efeito sobre o promotor de forma controlada. As células, foram transfectadas por lipofecção com diferentes construções do vector pGL3Basic:*PIGM*, em conjunto com pGATA-1 e pRL-CMV, para normalizar os resultados. Inicialmente, foram usadas construções com o promotor selvagem de *PIGM* (denominado WT) em contraposição com o promotor mutado no local Sp1 proximal (-270C>G) (denominado Mut), ambos nas versões longa (*Long - luc⁺:2Kb*) e curta (*Short - luc⁺:600pb*).

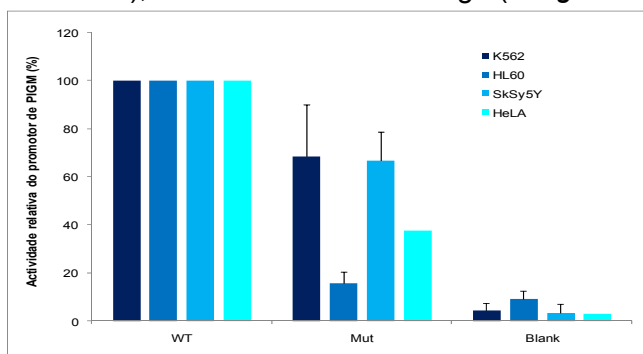


Fig.3.7 – Actividade do promotor de *PIGM* em diversos tipos de células por ensaios repórter. Nas diferentes linhas celulares foi observável que a actividade transcricional de *PIGM* foi superior nas células que expressam GATA-1 endógeno – K562 e SkSy5y, na presença da mutação causadora da IGD; K562 – células eritroleucémicas; HL60 – células leucémicas promielocíticas humanas; SkSy5Y – células de glioma neuronal; HeLa – células de carcinoma humano. Estes resultados foram cedidos por Almeida, AM¹³⁵.

A versão curta não continha qualquer dos locais GATA previstos bioinformaticamente, pelo que correspondeu ao ensaio de deleção (Fig. 3.8A). Como descrito anteriormente¹², a actividade transcricional do promotor longo de *PIGM* mutado no local Sp1 (*MutL*) foi significativamente inferior (abaixo dos 50%) à do promotor longo selvagem (*WTL*) (Fig.3.8).

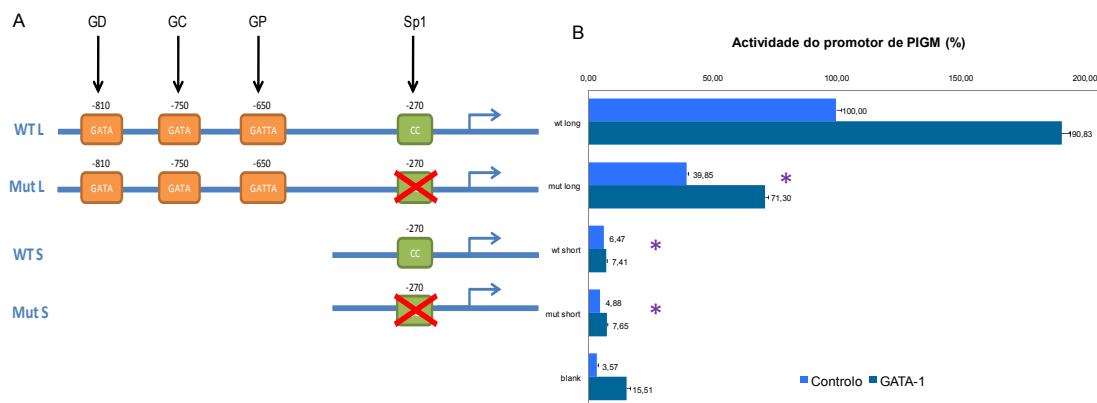


Fig.3.8 – Ensaios repórter. (A) Representação gráfica das construções longa (2Kb) e curta (600pb). A mutação causadora da IGD está marcada a vermelho. (B) Actividade relativa da Luciferase (em %) comparativamente à actividade do promotor selvagem (*WTL*). Cada par corresponde à representação da actividade do promotor indicado pelo esquema sem e com a adição de GATA-1 exógeno, respectivamente. Os resultados apresentados são representativos de 3 ou mais ensaios independentes. Os resultados foram testados através de uma análise ANOVA. Valores $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos e estão marcados com *.

Na presença de GATA-1 verificou-se um aumento significativo da actividade da Luciferase em ambas as construções longas (*WTL* e *MutL*), efeito que não se observou quando nenhum dos locais GATA previstos estava presente, ou seja, nas versões truncadas (*WTS* e

MutS). Estes resultados indicaram que GATA-1 actua como activador da transcrição no promotor de *PIGM*, provavelmente através dos locais GATA identificados bioinformaticamente.

A fim de testar esta hipótese, recorreu-se à técnica de mutagénese sítio-dirigida e mutaram-se os três locais GATA de acordo com o mostrado nas Figs 3.9A e 3.10A. No total foram construídos 14 novos plasmídeos, nas versões selvagem (*WT*) e mutante (*Mut*), relativamente ao local Sp1 e a cada um dos locais GATA em estudo, individualmente ou em combinação.

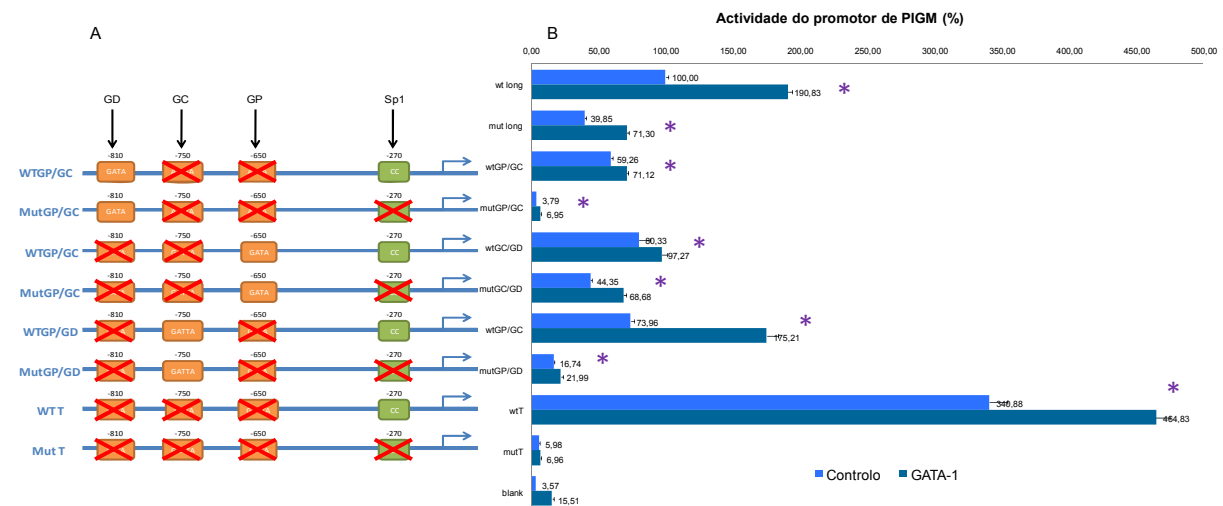


Fig.3.9 – Ensaios repórter. (A) Representação gráfica das construções longas (2kb) com mutações duplas. A mutação causadora da IGD está marcada a vermelho no local Sp1, as mutações respeitantes aos locais GATA estão representadas da mesma forma nos locais correspondentes. (B) Actividade da Luciferase (em %) relativamente à actividade do promotor longo selvagem (*WTL*). Cada par corresponde à representação da actividade do promotor indicado pelo esquema sem e com a adição de GATA-1 exógeno, respectivamente. Os resultados apresentados são representativos de 3 ou mais ensaios independentes, foram sujeitos a normalização e transformação e foram testados por uma ANOVA. Valores $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos e estão indicados com *.

As mutações duplas, realizadas em dois locais GATA em simultâneo (Fig.3.9B), permitiram observar a acção de GATA-1 em cada um dos locais separadamente. Todas as mutações duplas induziram uma redução significativa da actividade transcricional, relativamente ao *WTL*, indicando que GATA-1 aumenta a actividade transcricional através de qualquer dos locais previstos individualmente. A mutação dupla que inactivou os locais GC e GD (par GC/GD) foi a que menos afectou a actividade do promotor - tanto a versão *WT*, como a versão *Mut* mostraram níveis de actividade muito próximos dos respectivos controlos. Mantendo o local central intacto (par GP/GD), verificou-se que a presença da mutação Sp1 aboliu a actividade transcricional do promotor. O local GATA distal (GD) foi o mais afectado pela mutação dos outros locais, quer na presença, quer na ausência de um local Sp1 activo (par GP/GC). A actividade do promotor foi reduzida a metade na versão *WT* e totalmente abolida na versão *Mut*. A construção triplo mutante (*WTT*) revelou uma actividade transcricional significativamente superior à do controlo *WTL*, mas a presença da mutação Sp1 (*MutT*) levou à inactivação total do promotor, tal como ocorreu nas construções *MutGP/GD* e *MutGP/GC*. A adição de GATA-1 às construções mencionadas traduziu-se num incremento da actividade

transcricional em todos os ensaios. O local distal (par GP/GC) foi o menos sensível à adição exógena de GATA-1. O local que mostrou maior actividade provocada pela adição de GATA-1 foi o central (*WTGP/GD*), no qual o FT teve uma influência marcante na activação da transcrição, mas apenas na presença do local Sp1 intacto. Note-se que a actividade da construção *MutGC/GD* foi praticamente nula e que o *MutGC/GD* foi o único cuja mutação Sp1 resultou num comportamento semelhante ao *MutL* com e sem a adição de GATA-1. A abolição de locais GATA individualmente é apresentada na Fig.3.10B.

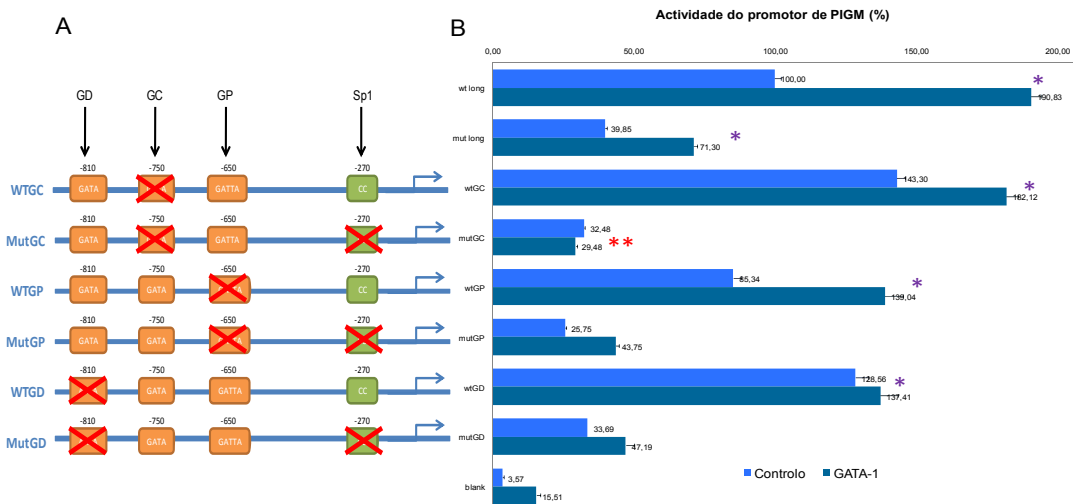


Fig.3.10 – Ensaios repórter. (A) Representação gráfica das construções longas (2Kb) com mutações singulares nos locais GATA. A mutação causadora da IGD está marcada a vermelho no local Sp1, as mutações respeitantes aos locais GATA estão representadas da mesma forma nos locais correspondentes. (B) Actividade da Luciferasa (em %) relativamente à actividade do promotor selvagem (*WTL*). Cada par corresponde à representação da actividade do promotor indicado pelo esquema sem e com a adição de GATA-1 exógeno, respectivamente. Os resultados apresentados são representativos de 3 ou mais ensaios independentes, foram sujeitos a normalização e transformação e foram testados por uma ANOVA. Valores $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos e estão indicados com *. O resultado em que $p > 0,05$ foi sinalizado com ** a vermelho.

Nos ensaios sem adição de GATA-1, verificou-se que a presença do local proximal activo nas versões selvagens (*WTC* e *WTD*), levou ao aumento da actividade transcricional comparativamente com o *WTL*. Já a mutação do local proximal (*WTP*) não igualou o nível de actividade do promotor selvagem. Em qualquer dos ensaios realizados, a mutação Sp1 causou uma redução significativa da actividade transcricional, tendo revelado um comportamento semelhante ao *MutL*. Esta redução foi particularmente notória quando se aboliu o local Sp1 em conjunto com o local GATA central (*MutGC*). A adição de GATA-1 resultou num aumento da transcrição em todos os ensaios, excepto no *MutGC* (único caso em que a diferença *WTGC-MutGC* não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$)). Nenhuma construção conseguiu, no entanto, igualar o efeito da adição de GATA-1 ao comportamento do promotor selvagem (*WTL*). A abolição do local proximal foi a mais influenciada pela adição de GATA-1 (par GP). A menos influenciada foi a abolição do local distal (par GD). De todas as construções em estudo a que sofreu uma maior redução com a mutação foi a que tinha o local GATA central inactivo (par GC). É ainda de notar, que quando se adicionou GATA-1, o comportamento das construções *WTGP* e *WTGD* foi idêntico.

DISCUSSÃO

Estudos anteriores¹² levaram à identificação da Deficiência Hereditária de GPI (IGD) como uma nova e rara doença autossômica recessiva caracterizada pela ocorrência de trombozes e epilepsia, mas sem a presença de hemólise intravascular significativa ou anemia. As crianças com IGD exibiram um padrão de expressão de GPI único nas células sanguíneas, apresentando um grau de deficiência variável entre as diferentes linhagens: enquanto que os eritrócitos revelaram um fenótipo quase normal, o que explica a ausência de hemólise e anemia, os granulócitos apresentaram uma deficiência quase total de GPI, o que sugere que *PIGM* pode estar sujeito a um mecanismo de regulação transcricional específico da série eritróide^{71, 135-139}. O estudo de regiões reguladoras em *cis* nos organismos eucariotas tem revelado a existência de redes complexas de elementos activadores e repressores que actuam em promotores, *enhancers* e regiões *LCR*. Pensa-se, que as sinergias entre factores que se ligam a estes elementos estão na base da expressão génica geral, bem como da expressão específica de tecido. Até hoje foram descritos, em genes de expressão específica, diversos casos de sinergia, positiva e/ou negativa, entre FT próprios de linhagem e FT ubíquos, que actuam de forma dependente e/ou independente uns dos outros (na eritropoiese: gene α -globina⁹⁴, *ankyrin*⁷¹, apoA1⁷³, AMY-1⁷², tal-1¹⁴⁰, EpoR¹⁴¹ e na megacariopoiese: α Ib¹⁴²). Outros estudos demonstraram a existência de interacções em genes activados por diferentes promotores, dependendo do tipo celular em que são expressos (gene TP⁷⁵). Neste trabalho foi apresentado um caso de regulação desigual da transcrição de um gene *housekeeping* – *PIGM* – em células de linhagens hematopoiéticas distintas. Ficou demonstrado que um FT específico de linhagem – GATA-1 – tem a capacidade de controlar este tipo de gene, quer de forma dependente, quer independente de um factor transcricional ubíquo, como o Sp1. De facto, GATA-1 tem a capacidade de induzir a expressão de *PIGM* normalizando a expressão da âncora GPI, mesmo na presença de um local Sp1 inactivo, o que aconteceu nos pacientes com IGD. Os resultados apresentados são consistentes com os descritos para outros genes, como a ferroquelatase¹⁴³. Não havia, no entanto, nenhum trabalho que demonstrasse que um FT específico de linhagem fosse capaz de compensar ou substituir a acção de um FT ubíquo num gene *housekeeping*. *PIGM* pertence à classe de genes cujo promotor não contém caixa TATA ou CAAT, mas contém uma, ou mais, sequências ricas em GC na região promotora, bem como um elemento InR, geralmente essencial para a expressão constitutiva de genes *housekeeping*¹⁴⁴. As ilhas GC presentes são activadas pelo FT ubíquo Sp1, que reconhece a sequência GGGCGG e recruta o complexo de pré-iniciação da transcrição. Locais Sp1 adjacentes podem activar a transcrição de forma independente ou formando complexos homomultiméricos⁹⁷, o que resulta em sinergia, consigo próprio ou com FT tecido-específicos^{94, 96, 145}, quando mais que um factor se encontra

ligado ao DNA, ou em superactivação^{64, 65}, quando outros FT se ligam a Sp1, mas não ao DNA. GATA-1 é o FT protótipo da família de factores que reconhecem a sequência *consensus* (A/T)GATA(A/G). Estes actuam, não só com grande afinidade, mas também com elevada especificidade. GATA-1 está envolvido na expressão da maioria, senão de todos os genes eritróides. É um factor essencial à diferenciação e maturação da linhagem eritróide e megacariocítica e à reorganização da estrutura da cromatina, facto revelado inicialmente pelos estudos realizados com o gene da β -globina⁹⁴. Sabendo que GATA-1 actua na hematopoiese, com um papel preponderante na eritropoiese, mas não na granulopoiese, este trabalho tentou responder à hipótese de ser este o factor diferenciador dos níveis de expressão da âncora GPI nas diversas linhagens celulares sanguíneas dos pacientes com IGD. Por análise bioinformática da região promotora de *PIGM* foram identificados três locais GATA, nas posições proximal (GP:-650pb), central (GC:-750pb) e distal (GD:-810pb), para além de quatro locais Sp1 (descritos por Almeida *et.al.*¹²). Outros trabalhos tinham já demonstrado a existência de interacções físicas e funcionais entre FT GATA e FT ubíquos da família *Krüppel-like*, nomeadamente Sp1 e EKLF¹⁰³. Os ensaios de alteração da mobilidade electroforética (EMSA) comprovaram que GATA-1 se liga às sequências previstas *in vitro*. Para a obtenção destes resultados foram usados extractos nucleares da linha eritroleucémica K562, que expressa GATA-1 constitutivamente, e foi observada a formação de complexos proteína-DNA em qualquer dos 3 locais GATA previstos. Embora os resultados dos ensaios de competição tenham mostrado que GATA-1 reconhece especificamente os locais previstos, os ensaios de *supershift* não foram tão evidentes. O uso de uma concentração superior de anticorpo anti-GATA-1 e/ou a realização de ensaios com um anticorpo inespecífico IgG (controlo negativo) poderiam evidenciar a formação mais destacada das bandas *supershift*. Por outro lado, estudos recentes forneceram evidências de que GATA-1 forma inúmeros complexos com outros factores nucleares, incluindo o factor hematopoiético essencial Gfi-1b e os complexos modificadores da cromatina MeCP1 e ACF/WCRF, para além de outros identificados anteriormente, tais como FOG-1, TAL-1 e Ldb1¹²⁵. Este dado veio corroborar os resultados obtidos nos ensaios EMSA, nos quais se observaram sempre bandas resultantes de ligações inespecíficas à sonda marcada. Ainda assim, os resultados indicaram, que os locais propostos são efectivamente locais reconhecidos por GATA-1 na região promotora de *PIGM*. A confirmação de que esta ligação ocorre também *in vivo* foi obtida recorrendo aos ensaios de imunoprecipitação de cromatina. Os ensaios de ChIP, igualmente realizados na linha celular K562, foram analisados de duas formas distintas. Numa primeira instância procedeu-se à análise qualitativa das reacções de imunoprecipitação por PCR convencional e de seguida foi efectuada a quantificação dos fragmentos precipitados por qPCR. A análise qualitativa revelou um aumento na intensidade das bandas em todas as regiões analisadas, incluindo nos controlos a montante e a jusante dos locais em

estudo. O facto dos locais escolhidos como controlo negativo (*upstream* e *downstream*) estarem demasiado próximos da região promotora do gene *PIGM*, resultou num enriquecimento em DNA precipitado, apesar de se tratar de ensaios de *background*. Não obstante, qualquer dos locais analisados revelou um aumento significativo da quantidade de DNA precipitado relativamente a ambos os locais de controlo negativo. Para determinar em que medida se deu o enriquecimento em fragmentos de DNA nos locais GATA putativos, foi analisada a taxa relativa de ocupação do promotor de *PIGM* por qPCR. Os resultados demonstraram que GATA-1 se liga efectivamente a todos os locais GATA esperados, sendo a taxa de ocupação de qualquer um dos locais 4 a 5 vezes superior à da ligação ao promotor de *c-Kit*, o que suporta a previsão inicial de que GATA-1 tem maior afinidade para o promotor de *PIGM*. O grau de afinidade de GATA-1 para os três locais em estudo não pode, no entanto, diferenciar-se por este ensaio, na medida em que os locais GC e GP tiveram que ser analisados em conjunto. Para além disso, o facto de GD ter provocado uma maior precipitação, não implica que os locais GC e GP, independentemente um do outro, apresentassem um comportamento idêntico ao que foi observado na análise em conjunto. A última fase do trabalho consistiu na análise funcional da transactivação do promotor por GATA-1 e Sp1. Para o efeito foram realizados ensaios repórter, na presença e na ausência da mutação pontual que provoca a IGD. Os ensaios de co-transfecção de GATA-1 e Sp1, em linhas celulares que expressam GATA-1 endogenamente (K562 e SkSy5y), revelaram um aumento da actividade transcricional do promotor relativamente a células que não expressam GATA-1 endógeno (HL60 e HeLa)¹³⁵. Um ensaio de deleção, demonstrou que existe uma diferença significativa na actividade do promotor quando os locais GATA estão presentes. De notar que, na ausência destes locais, a mutação no local Sp1 é irrelevante na actividade transcricional, mas, como se esperava, na presença dos locais GATA, a mutação pontual -270C>G leva a uma diminuição significativa da expressão da Luciferase. Os resultados obtidos neste ensaio vieram assim confirmar a importância dos locais GATA na actividade deste promotor. A análise das construções longas e truncadas demonstrou a necessidade dos locais GATA para a actividade promotora de *PIGM*. De um modo geral, os ensaios repórter mostraram que o efeito de GATA-1 sobre este promotor é complexo e que ocorre uma interacção directa com Sp1. De facto, os resultados indicaram que GATA-1 tem impacto em todos os locais encontrados e que tem um efeito cumulativo na actividade funcional do promotor de *PIGM*. No entanto, o promotor tem que ter uma dimensão superior à que foi usada nas construções truncadas, já que estas não apresentaram qualquer actividade transcricional, quer na ausência, quer na presença de GATA-1 exógeno. O local proximal revelou uma maior actividade promotora independente de Sp1, embora o local central tenha mostrado uma actividade maior quando o local Sp1 está intacto, sendo também este o que mais depende da adição de GATA-1 exógeno. O conjunto destes resultados, sugere que o local GATA proximal

(GP) é o que mais influencia a actividade transcricional e é também o local mais influenciado pela presença da mutação Sp1. No entanto, o local central (GC) é o mais influenciado pela adição de GATA-1 exógeno. Isto sugere que qualquer um dos locais GATA tem um papel na regulação do promotor de *PIGM*, mas este não será tão significativo como o Sp1 proximal, embora seja suficiente para induzir a expressão a partir do promotor portador da mutação causadora da IGD. Ficou demonstrado que os locais proximal e central são essenciais à expressão de *PIGM*. Surpreendente, foi o facto do par com a mutação tripla nos locais GATA ter revelado um pico de actividade transcricional dependente de Sp1 e também dependente de GATA-1. Veja-se que, para além do ensaio controlo ter revelado uma subida da actividade superior ao dobro da actividade normal do promotor (350%), a adição de GATA-1 elevou esta actividade para próximo dos 500%. No entanto, nas versões mutantes a actividade de GATA-1 foi abolida. Conjuntamente, estes resultados sugerem que GATA-1 tem um efeito activador da actividade transcricional do promotor de *PIGM* e que a presença do local Sp1 proximal intacto é condição necessária e suficiente para induzir a expressão a partir deste promotor. Para além disso, foi já demonstrado que, quer Sp1 por si próprio, quer GATA-1 em conjunto com Sp1, conseguem actuar sinergeticamente em diversos promotores^{67, 94}. Diversos autores^{67, 94} mostraram que Sp1 se liga directamente a outras moléculas Sp1, com as quais forma oligómeros e que GATA-1 e Sp1 interagem fisicamente na activação transcricional em promotores eritróides. De facto, já foi constatado que ambos os dedos de zinco de GATA-1 têm a capacidade de se associar a Sp1 e que o DBD de GATA-1 tem também um papel nesta associação. Para além disso, sabe-se que Sp1 interage directamente com outros FT, tais como YY1⁶⁷ e NF-κB⁹⁹. Também os transactivadores virais E1A e Tax exercem o seu efeito em FT celulares através de interacções proteína-proteína com os domínios DBD destes factores⁹⁴. Muitos destes têm a capacidade de superactivar a transcrição, ligando-se a Sp1 quando este se encontra ligado ao DNA, não sendo necessário que eles próprios estejam directamente ligados ao DNA⁶⁷. Conjuntamente com estas observações, verificou-se que a abolição total dos seus locais de reconhecimento (par *WTT* e *MutT*) levou a um resultado surpreendente. Postula-se, por este resultado, que GATA-1 tem um papel complexo na regulação da transcrição de *PIGM*, na presença do local Sp1 intacto. GATA-1 pode estar a actuar inibindo a sobreexpressão deste gene, ou GATA-1 pode induzir a superactivação de Sp1, interagindo com este, mas não com o DNA directamente, apenas quando Sp1 se encontra ligado ao seu motivo *consensus* e quando GATA-1 não tem nenhum dos seus locais de reconhecimento disponível, o que é corroborado pelo facto da construção *MutT* não apresentar qualquer actividade, levando ao aumento abrupto da actividade do promotor, ou se postula ainda que ocorram ambas as situações em simultâneo. Uma série de ensaios de deleção, que levassem à análise da dimensão mínima necessária à ocorrência de transcrição nestas condições, poderiam revelar o efeito de cada local GATA

de forma totalmente independente e outros ensaios, como Western, poderiam revelar se existe efectivamente superactivação na ausência dos três locais GATA.

CONCLUSÃO

Foi demonstrado que o gene *PIGM*, embora tendo uma expressão ubíqua está sujeito a uma regulação transcricional específica de linhagem. No caso da linhagem eritróide/megacariocítica, provou-se que GATA-1 regula positivamente a actividade transcricional do promotor de *PIGM*, tanto de forma dependente, como independente de Sp1. Na IGD, é esta última que assegura a transcrição adequada de *PIGM*, a formação do complexo manossiltransferase-I funcional, a biossíntese da âncora GPI e a apresentação de proteínas, tais como as proteínas reguladoras do sistema do complemento - CD59 e CD55 – à superfície das células eritróides, explicando assim a ausência de hemólise intravascular e anemia nas crianças afectadas. Trabalhos que incidiram sobre o estudo dos factores GATA não hematopoiéticos¹⁴⁶ provaram que GATA-4 (expresso em células neuronais) tem a capacidade de substituir parcialmente GATA-1 prolongando o estágio de desenvolvimento de embriões hemizigóticos *Gata1.05/Y* de ratinho. Desta forma, dado que as células neuronais expressam o FT GATA-4, este mecanismo pode explicar a razão pela qual as crianças afectadas pela IGD apresentaram um desenvolvimento neuro-anatómico normal.

BIBLIOGRAFIA

1. LODISH, M., KAISER, KRIEGER, SCOTT, ZIPURSKY AND DARNELL. *MOLLECULAR CELL BIOLOGY* (W.H. FREEMAN & COMPANY, 2003).
2. STEVENS, V.L. BIOSYNTHESIS OF GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL MEMBRANE ANCHORS. *BIOCHEM J* **310** (Pt 2), 361-70 (1995).
3. IKEZAWA, H. GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL (GPI)-ANCHORED PROTEINS. *BIOL PHARM BULL* **25**, 409-17 (2002).
4. SPRONG, H., VAN DER SLUIJS, P. & VAN MEER, G. HOW PROTEINS MOVE LIPIDS AND LIPIDS MOVE PROTEINS. *NAT REV MOL CELL BIOL* **2**, 504-13 (2001).
5. FERGUSON, M.A. & WILLIAMS, A.F. CELL-SURFACE ANCHORING OF PROTEINS VIA GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL STRUCTURES. *ANNU REV BIOCHEM* **57**, 285-320 (1988).
6. NOSJEAN, O., BRIOLAY, A. & ROUX, B. MAMMALIAN GPI PROTEINS: SORTING, MEMBRANE RESIDENCE AND FUNCTIONS. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA* **1331**, 153-86 (1997).
7. KINOSHITA, T., OHISHI, K. & TAKEDA, J. GPI-ANCHOR SYNTHESIS IN MAMMALIAN CELLS: GENES, THEIR PRODUCTS, AND A DEFICIENCY. *J BIOCHEM* **122**, 251-7 (1997).
8. ENGLUND, P.T. THE STRUCTURE AND BIOSYNTHESIS OF GLYCOSYL PHOSPHATIDYLINOSITOL PROTEIN ANCHORS. *ANNU REV BIOCHEM* **62**, 121-38 (1993).
9. FERGUSON, M.A., MASTERTSON, W.J., HOMANS, S.W. & McCONVILLE, M.J. EVOLUTIONARY ASPECTS OF GPI METABOLISM IN KINETOPLASTID PARASITES. *CELL BIOL INT REP* **15**, 991-1005 (1991).
10. PAULICK, M.G. & BERTOZZI, C.R. THE GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL ANCHOR: A COMPLEX MEMBRANE-ANCHORING STRUCTURE FOR PROTEINS. *BIOCHEMISTRY* **47**, 6991-7000 (2008).
11. VÁRIOS. ASH EDUCATIONAL PROGRAM BOOK (AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, 2006).
12. ALMEIDA, A.M. ET AL. HYPOMORPHIC PROMOTER MUTATION IN PIGM CAUSES INHERITED GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL DEFICIENCY. *NAT MED* **12**, 846-51 (2006).
13. DE MACEDO, C.S., SHAMS-ELDIN, H., SMITH, T.K., SCHWARZ, R.T. & AZZOUZ, N. INHIBITORS OF GLYCOSYL-PHOSPHATIDYLINOSITOL ANCHOR BIOSYNTHESIS. *BIOCHIMIE* **85**, 465-72 (2003).
14. TAKAHASHI, M. ET AL. DEFICIENT BIOSYNTHESIS OF N-ACETYLGLUCOSAMINYL-PHOSPHATIDYLINOSITOL, THE FIRST INTERMEDIATE OF GLYCOSYL PHOSPHATIDYLINOSITOL ANCHOR BIOSYNTHESIS, IN CELL LINES ESTABLISHED FROM PATIENTS WITH PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA. *J Exp Med* **177**, 517-21 (1993).
15. MIYATA, T. ET AL. THE CLONING OF PIG-A, A COMPONENT IN THE EARLY STEP OF GPI-ANCHOR BIOSYNTHESIS. *SCIENCE* **259**, 1318-20 (1993).
16. TAKEDA, J. ET AL. DEFICIENCY OF THE GPI ANCHOR CAUSED BY A SOMATIC MUTATION OF THE PIG-A GENE IN PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA. *CELL* **73**, 703-11 (1993).
17. BESSLER, M. ET AL. PAROXYSMAL NOCTURNAL HAEMOGLOBINURIA (PNH) IS CAUSED BY SOMATIC MUTATIONS IN THE PIG-A GENE. *EMBO J* **13**, 110-7 (1994).
18. WATANABE, R. ET AL. THE FIRST STEP OF GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL BIOSYNTHESIS IS MEDIATED BY A COMPLEX OF PIG-A, PIG-H, PIG-C AND GPI1. *EMBO J* **17**, 877-85 (1998).
19. WATANABE, R. ET AL. PIG-A AND PIG-H, WHICH PARTICIPATE IN GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL ANCHOR BIOSYNTHESIS, FORM A PROTEIN COMPLEX IN THE ENDOPLASMIC RETICULUM. *J BIOL CHEM* **271**, 26868-75 (1996).
20. HONG, Y. ET AL. PIG-N, A MAMMALIAN HOMOLOGUE OF YEAST Mcd4P, IS INVOLVED IN TRANSFERRING PHOSPHOETHANOLAMINE TO THE FIRST MANNOSE OF THE GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL. *J BIOL CHEM* **274**, 35099-106 (1999).
21. WATANABE, R. ET AL. INITIAL ENZYME FOR GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL BIOSYNTHESIS REQUIRES PIG-P AND IS REGULATED BY DPM2. *EMBO J* **19**, 4402-11 (2000).
22. MURAKAMI, Y. ET AL. THE INITIAL ENZYME FOR GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL BIOSYNTHESIS REQUIRES PIG-Y, A SEVENTH COMPONENT. *MOL BIOL CELL* **16**, 5236-46 (2005).
23. NAKAMURA, N. ET AL. EXPRESSION CLONING OF PIG-L, A CANDIDATE N-ACETYLGLUCOSAMINYLPHOSPHATIDYLINOSITOL DEACETYLASE. *J BIOL CHEM* **272**, 15834-40 (1997).
24. WATANABE, R., OHISHI, K., MAEDA, Y., NAKAMURA, N. & KINOSHITA, T. MAMMALIAN PIG-L AND ITS YEAST HOMOLOGUE Gpi12P ARE N-ACETYLGLUCOSAMINYLPHOSPHATIDYLINOSITOL DE-N-ACETYLASES ESSENTIAL IN GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL BIOSYNTHESIS. *BIOCHEM J* **339** (Pt 1), 185-92 (1999).
25. STEVENS, V.L. REGULATION OF GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL BIOSYNTHESIS BY GTP. STIMULATION OF N-ACETYLGLUCOSAMINE-PHOSPHATIDYLINOSITOL DEACETYLATION. *J BIOL CHEM* **268**, 9718-24 (1993).
26. AMTHAUER, R., KODUKULA, K., BRINK, L. & UDENFRIEND, S. PHOSPHATIDYLINOSITOL-GLYCAN (PI-G)-ANCHORED MEMBRANE PROTEINS: REQUIREMENT OF ATP AND GTP FOR TRANSLATION-INDEPENDENT COOH-TERMINAL PROCESSING. *PROC NATL ACAD SCI U S A* **89**, 6124-8 (1992).
27. MURAKAMI, Y. ET AL. PIG-W IS CRITICAL FOR INOSITOL ACYLATION BUT NOT FOR FLIPPING OF GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL-ANCHOR. *MOL BIOL CELL* **14**, 4285-95 (2003).
28. MAEDA, Y. & KINOSHITA, T. DOLICHOL-PHOSPHATE MANNOSE SYNTHASE: STRUCTURE, FUNCTION AND REGULATION. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA* **1780**, 861-8 (2008).
29. MAEDA, Y. ET AL. PIG-M TRANSFERS THE FIRST MANNOSE TO GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL ON THE LUMENAL SIDE OF THE ER. *EMBO J* **20**, 250-61 (2001).
30. ASHIDA, H. ET AL. MAMMALIAN PIG-X AND YEAST Pbn1P ARE THE ESSENTIAL COMPONENTS OF GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL-MANNOSYLTRANSFERASE I. *MOL BIOL CELL* **16**, 1439-48 (2005).

31. HONG, Y. ET AL. GPI1 STABILIZES AN ENZYME ESSENTIAL IN THE FIRST STEP OF GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL BIOSYNTHESIS. *J BIOL CHEM* **274**, 18582-8 (1999).
32. KANG, J.Y. ET AL. PIG-V INVOLVED IN TRANSFERRING THE SECOND MANNOSE IN GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL. *J BIOL CHEM* **280**, 9489-97 (2005).
33. TAKAHASHI, M. ET AL. PIG-B, A MEMBRANE PROTEIN OF THE ENDOPLASMIC RETICULUM WITH A LARGE LUMENAL DOMAIN, IS INVOLVED IN TRANSFERRING THE THIRD MANNOSE OF THE GPI ANCHOR. *EMBO J* **15**, 4254-61 (1996).
34. HONG, Y. ET AL. REQUIREMENT OF PIG-F AND PIG-O FOR TRANSFERRING PHOSPHOETHANOLAMINE TO THE THIRD MANNOSE IN GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL. *J BIOL CHEM* **275**, 20911-9 (2000).
35. SHISHIOH, N. ET AL. GPI7 IS THE SECOND PARTNER OF PIG-F AND INVOLVED IN MODIFICATION OF GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL. *J BIOL CHEM* **280**, 9728-34 (2005).
36. OHISHI, K. ET AL. CLONING AND CHARACTERIZATION OF THE MURINE GPI ANCHOR SYNTHESIS GENE PIGF, A HOMOLOGUE OF THE HUMAN PIGF GENE. *GENOMICS* **34**, 340-6 (1996).
37. UDEFRIEND, S. & KODUKULA, K. HOW GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL-ANCHORED MEMBRANE PROTEINS ARE MADE. *ANNU REV BIOCHEM* **64**, 563-91 (1995).
38. OHISHI, K., INOUE, N. & KINOSHITA, T. PIG-S AND PIG-T, ESSENTIAL FOR GPI ANCHOR ATTACHMENT TO PROTEINS, FORM A COMPLEX WITH GAA1 AND GPI8. *EMBO J* **20**, 4088-98 (2001).
39. HONG, Y. ET AL. HUMAN PIG-U AND YEAST Cdc91P ARE THE FIFTH SUBUNIT OF GPI TRANSAMIDASE THAT ATTACHES GPI-ANCHORS TO PROTEINS. *MOL BIOL CELL* **14**, 1780-9 (2003).
40. OHISHI, K., NAGAMUNE, K., MAEDA, Y. & KINOSHITA, T. TWO SUBUNITS OF GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL TRANSAMIDASE, GPI8 AND PIG-T, FORM A FUNCTIONALLY IMPORTANT INTERMOLECULAR DISULFIDE BRIDGE. *J BIOL CHEM* **278**, 13959-67 (2003).
41. ORLEAN, P. & MENON, A.K. THEMATIC REVIEW SERIES: LIPID POSTTRANSLATIONAL MODIFICATIONS. GPI ANCHORING OF PROTEIN IN YEAST AND MAMMALIAN CELLS, OR: HOW WE LEARNED TO STOP WORRYING AND LOVE GLYCOPHOSPHOLIPIDS. *J LIPID RES* **48**, 993-1011 (2007).
42. TANAKA, S., MAEDA, Y., TASHIMA, Y. & KINOSHITA, T. INOSITOL DEACYLATION OF GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL-ANCHORED PROTEINS IS MEDIATED BY MAMMALIAN PGAP1 AND YEAST BST1P. *J BIOL CHEM* **279**, 14256-63 (2004).
43. CHEN, R. ET AL. MAMMALIAN GLYCOPHOSPHATIDYLINOSITOL ANCHOR TRANSFER TO PROTEINS AND POSTTRANSFER DEACYLATION. *PROC NATL ACAD SCI U S A* **95**, 9512-7 (1998).
44. FUJITA, M., YOKO, O.T. & JIGAMI, Y. INOSITOL DEACYLATION BY BST1P IS REQUIRED FOR THE QUALITY CONTROL OF GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL-ANCHORED PROTEINS. *MOL BIOL CELL* **17**, 834-50 (2006).
45. BARZ, W.P. & WALTER, P. TWO ENDOPLASMIC RETICULUM (ER) MEMBRANE PROTEINS THAT FACILITATE ER-TO-GOLGI TRANSPORT OF GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL-ANCHORED PROTEINS. *MOL BIOL CELL* **10**, 1043-59 (1999).
46. TASHIMA, Y. ET AL. PGAP2 IS ESSENTIAL FOR CORRECT PROCESSING AND STABLE EXPRESSION OF GPI-ANCHORED PROTEINS. *MOL BIOL CELL* **17**, 1410-20 (2006).
47. BRODSKY, R.A. PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA: STEM CELLS AND CLONALITY. *HEMATOLOGY AM SOC HEMATOL EDUC PROGRAM* **2008**, 111-5 (2008).
48. HILLMEN, P., LEWIS, S.M., BESSLER, M., LUZZATTO, L. & DACIE, J.V. NATURAL HISTORY OF PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA. *N ENGL J MED* **333**, 1253-8 (1995).
49. SOCIE, G. ET AL. PAROXYSMAL NOCTURNAL HAEMOGLOBINURIA: LONG-TERM FOLLOW-UP AND PROGNOSTIC FACTORS. FRENCH SOCIETY OF HAEMATOLOGY. *LANCET* **348**, 573-7 (1996).
50. McMULLIN, M.F., HILLMEN, P., ELDER, G.E., LAPPIN, T.R. & LUZZATTO, L. SERUM ERYTHROPOIETIN LEVELS IN PAROXYSMAL NOCTURNAL HAEMOGLOBINURIA: IMPLICATIONS FOR THERAPY. *BR J HAEMATOL* **92**, 815-7 (1996).
51. MACIEJEWSKI, J.P., RIVERA, C., KOOK, H., DUNN, D. & YOUNG, N.S. RELATIONSHIP BETWEEN BONE MARROW FAILURE SYNDROMES AND THE PRESENCE OF GLYCOPHOSPHATIDYL INOSITOL-ANCHORED PROTEIN-DEFICIENT CLONES. *BR J HAEMATOL* **115**, 1015-22 (2001).
52. BEIER, F. ET AL. ACCELERATED TELOMERE SHORTENING IN GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL (GPI)-NEGATIVE COMPARED WITH GPI-POSITIVE GRANULOCYTES FROM PATIENTS WITH PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA (PNH) DETECTED BY PROAEROLYSIN FLOW-FISH. *BLOOD* **106**, 531-3 (2005).
53. KARADIMITRIS, A., ARATEN, D.J., LUZZATTO, L. & NOTARO, R. SEVERE TELOMERE SHORTENING IN PATIENTS WITH PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA AFFECTS BOTH GPI- AND GPI+ HEMATOPOIESIS. *BLOOD* **102**, 514-6 (2003).
54. LUZZATTO, L., BESSLER, M. & ROTOLI, B. SOMATIC MUTATIONS IN PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA: A BLESSING IN DISGUISE? *CELL* **88**, 1-4 (1997).
55. PARKER, C. ET AL. DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA. *BLOOD* **106**, 3699-709 (2005).
56. HU, R. ET AL. PIG-A MUTATIONS IN NORMAL HEMATOPOIESIS. *BLOOD* **105**, 3848-54 (2005).
57. BRODSKY, R.A. ET AL. IMPROVED DETECTION AND CHARACTERIZATION OF PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA USING FLUORESCENT AEROLYSIN. *AM J CLIN PATHOL* **114**, 459-66 (2000).
58. SUTHERLAND, D.R. ET AL. DIAGNOSING PNH WITH FLAER AND MULTIPARAMETER FLOW CYTOMETRY. *CYTOMETRY B CLIN CYTOM* **72**, 167-77 (2007).
59. NOZAKI, M. ET AL. DEVELOPMENTAL ABNORMALITIES OF GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL-ANCHOR-DEFICIENT EMBRYOS REVEALED BY CRE/LoxP SYSTEM. *LAB INVEST* **79**, 293-9 (1999).

60. KAWAGOE, K. ET AL. GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL-ANCHOR-DEFICIENT MICE: IMPLICATIONS FOR CLONAL DOMINANCE OF MUTANT CELLS IN PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA. *BLOOD* **87**, 3600-6 (1996).
61. ROSTI, V. ET AL. MURINE EMBRYONIC STEM CELLS WITHOUT PIG-A GENE ACTIVITY ARE COMPETENT FOR HEMATOPOIESIS WITH THE PNH PHENOTYPE BUT NOT FOR CLONAL EXPANSION. *J CLIN INVEST* **100**, 1028-36 (1997).
62. MADORE, N. ET AL. FUNCTIONALLY DIFFERENT GPI PROTEINS ARE ORGANIZED IN DIFFERENT DOMAINS ON THE NEURONAL SURFACE. *EMBO J* **18**, 6917-26 (1999).
63. KELLER, P. ET AL. FES-CRE TARGETS PHOSPHATIDYLINOSITOL GLYCAN CLASS A (PIGA) INACTIVATION TO HEMATOPOIETIC STEM CELLS IN THE BONE MARROW. *J EXP MED* **194**, 581-9 (2001).
64. ELEOUE, J.F. & ROMEO, P.H. CCACC-BINDING OR SIMIAN-VIRUS-40-PROTEIN-1-BINDING PROTEINS COOPERATE WITH HUMAN GATA-1 TO DIRECT ERYTHROID-SPECIFIC TRANSCRIPTION AND TO MEDIATE 5' HYPERSENSITIVE SITE 2 SENSITIVITY OF A TATA-LESS PROMOTER. *EUR J BIOCHEM* **212**, 763-70 (1993).
65. SUSKE, G. THE SP-FAMILY OF TRANSCRIPTION FACTORS. *GENE* **238**, 291-300 (1999).
66. ZHU, J., HE, F., HU, S. & YU, J. ON THE NATURE OF HUMAN HOUSEKEEPING GENES. *TRENDS GENET* **24**, 481-4 (2008).
67. WIERSTRA, I. SP1: EMERGING ROLES--BEYOND CONSTITUTIVE ACTIVATION OF TATA-LESS HOUSEKEEPING GENES. *BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN* **372**, 1-13 (2008).
68. STRACHAN, T.R., A.P. IN 3RD ED. (GARLAND PUBLISHING, 2004).
69. TAKETANI, S., MOHRI, T., HIOKI, K., TOKUNAGA, R. & KOHNO, H. STRUCTURE AND TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF THE MOUSE FERROCHELATASE GENE. *GENE* **227**, 117-24 (1999).
70. CHEN, Q.Y. & JACKSON, N. HUMAN CD1D GENE HAS TATA BOXLESS DUAL PROMOTERS: AN SP1-BINDING ELEMENT DETERMINES THE FUNCTION OF THE PROXIMAL PROMOTER. *J IMMUNOL* **172**, 5512-21 (2004).
71. GALLAGHER, P.G., ROMANA, M., TSE, W.T., LUX, S.E. & FORGET, B.G. THE HUMAN ANKYRIN-1 GENE IS SELECTIVELY TRANSCRIBED IN ERYTHROID CELL LINES DESPITE THE PRESENCE OF A HOUSEKEEPING-LIKE PROMOTER. *BLOOD* **96**, 1136-43 (2000).
72. FURUSAWA, M., TAIRA, T., IGUCHI-ARIGA, S.M. & ARIGA, H. MOLECULAR CLONING OF THE MOUSE AMY-1 GENE AND IDENTIFICATION OF THE SYNERGISTIC ACTIVATION OF THE AMY-1 PROMOTER BY GATA-1 AND SP1. *GENOMICS* **81**, 221-33 (2003).
73. IVANOV, G.S. ET AL. SP AND GATA FACTORS ARE CRITICAL FOR APOLIPOPROTEIN AI DOWNSTREAM ENHANCER ACTIVITY IN HUMAN HEPG2 CELLS. *GENE* **323**, 31-42 (2003).
74. PAYTON, S.G., WHETSTINE, J.R., GE, Y. & MATHERLY, L.H. TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF THE HUMAN REDUCED FOLATE CARRIER PROMOTER C: SYNERGISTIC TRANSACTIVATION BY SP1 AND C/EBP BETA AND IDENTIFICATION OF A DOWNSTREAM REPRESSOR. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA* **1727**, 45-57 (2005).
75. GANNON, A.M. & KINSELLA, B.T. REGULATION OF THE HUMAN THROMBOXANE A2 RECEPTOR GENE BY SP1, Egr1, NF-E2, GATA-1, AND ETS-1 IN MEGAKARYOCYTES. *J LIPID RES* **49**, 2590-604 (2008).
76. JUN, D.Y. ET AL. POSITIVE REGULATION OF PROMOTER ACTIVITY OF HUMAN 3-PHOSPHOGLYCERATE DEHYDROGENASE (PHGDH) GENE IS MEDIATED BY TRANSCRIPTION FACTORS SP1 AND NF-Y. *GENE* **414**, 106-14 (2008).
77. GREGORY, R.C. ET AL. FUNCTIONAL INTERACTION OF GATA1 WITH ERYTHROID KRUPPEL-LIKE FACTOR AND SP1 AT DEFINED ERYTHROID PROMOTERS. *BLOOD* **87**, 1793-801 (1996).
78. BLACK, A.R., BLACK, J.D. & AZIZKHAN-CLIFFORD, J. SP1 AND KRUPPEL-LIKE FACTOR FAMILY OF TRANSCRIPTION FACTORS IN CELL GROWTH REGULATION AND CANCER. *J CELL PHYSIOL* **188**, 143-60 (2001).
79. BOUWMAN, P. & PHILIPSEN, S. REGULATION OF THE ACTIVITY OF SP1-RELATED TRANSCRIPTION FACTORS. *MOL CELL ENDOCRINOL* **195**, 27-38 (2002).
80. SAMSON, S.L. & WONG, N.C. ROLE OF SP1 IN INSULIN REGULATION OF GENE EXPRESSION. *J MOL ENDOCRINOL* **29**, 265-79 (2002).
81. LI, L., HE, S., SUN, J.M. & DAVIE, J.R. GENE REGULATION BY SP1 AND SP3. *BIOCHEM CELL BIOL* **82**, 460-71 (2004).
82. RESENDES, K.K. & ROSMARIN, A.G. SP1 CONTROL OF GENE EXPRESSION IN MYELOID CELLS. *CRIT REV EUKARYOT GENE EXPR* **14**, 171-81 (2004).
83. MITCHELL, D.C. ET AL. REGULATION OF KiSS-1 METASTASIS SUPPRESSOR GENE EXPRESSION IN BREAST CANCER CELLS BY DIRECT INTERACTION OF TRANSCRIPTION FACTORS ACTIVATOR PROTEIN-2ALPHA AND SPECIFICITY PROTEIN-1. *J BIOL CHEM* **281**, 51-8 (2006).
84. SAFE, S. & KIM, K. NUCLEAR RECEPTOR-MEDIATED TRANSACTIVATION THROUGH INTERACTION WITH SP PROTEINS. *PROG NUCLEIC ACID RES MOL BIOL* **77**, 1-36 (2004).
85. CHU, S. & FERRO, T.J. SP1: REGULATION OF GENE EXPRESSION BY PHOSPHORYLATION. *GENE* **348**, 1-11 (2005).
86. SAFE, S. & ABDELRAHIM, M. SP TRANSCRIPTION FACTOR FAMILY AND ITS ROLE IN CANCER. *EUR J CANCER* **41**, 2438-48 (2005).
87. JACKSON, S.P., MACDONALD, J.J., LEES-MILLER, S. & TJIAN, R. GC BOX BINDING INDUCES PHOSPHORYLATION OF SP1 BY A DNA-DEPENDENT PROTEIN KINASE. *CELL* **63**, 155-65 (1990).
88. KUNDU, T.K. ET AL. ACTIVATOR-DEPENDENT TRANSCRIPTION FROM CHROMATIN IN VITRO INVOLVING TARGETED HISTONE ACETYLATION BY P300. *MOL CELL* **6**, 551-61 (2000).

89. SUZUKI, T., KIMURA, A., NAGAI, R. & HORIKOSHI, M. REGULATION OF INTERACTION OF THE ACETYLTRANSFERASE REGION OF P300 AND THE DNA-BINDING DOMAIN OF SP1 ON AND THROUGH DNA BINDING. *GENES CELLS* **5**, 29-41 (2000).
90. HUNG, J.J., WANG, Y.T. & CHANG, W.C. SP1 DEACETYLATION INDUCED BY PHORBOL ESTER RECRUITS P300 TO ACTIVATE 12(S)-LIPOXYGENASE GENE TRANSCRIPTION. *MOL CELL BIOL* **26**, 1770-85 (2006).
91. CHEN, Y.J., WANG, Y.N. & CHANG, W.C. ERK2-MEDIATED C-TERMINAL SERINE PHOSPHORYLATION OF P300 IS VITAL TO THE REGULATION OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR-INDUCED KERATIN 16 GENE EXPRESSION. *J BIOL CHEM* **282**, 27215-28 (2007).
92. ZHANG, Y. & DUFAU, M.L. SILENCING OF TRANSCRIPTION OF THE HUMAN LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR GENE BY HISTONE DEACETYLASE-MSin3A COMPLEX. *J BIOL CHEM* **277**, 33431-8 (2002).
93. GARTEL, A.L. & TYNER, A.L. TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF THE P21((WAF1/CIP1)) GENE. *EXP CELL RES* **246**, 280-9 (1999).
94. MERIKA, M. & ORKIN, S.H. FUNCTIONAL SYNERGY AND PHYSICAL INTERACTIONS OF THE ERYTHROID TRANSCRIPTION FACTOR GATA-1 WITH THE KRUPPEL FAMILY PROTEINS SP1 AND EKLF. *MOL CELL BIOL* **15**, 2437-47 (1995).
95. CHANG, Y.C., ILLENYE, S. & HEINTZ, N.H. COOPERATION OF E2F-P130 AND SP1-PRB COMPLEXES IN REPRESSION OF THE CHINESE HAMSTER DHFR GENE. *MOL CELL BIOL* **21**, 1121-31 (2001).
96. LECUYER, E. ET AL. THE SCL COMPLEX REGULATES C-KIT EXPRESSION IN HEMATOPOIETIC CELLS THROUGH FUNCTIONAL INTERACTION WITH SP1. *BLOOD* **100**, 2430-40 (2002).
97. PASCAL, E. & TJIAN, R. DIFFERENT ACTIVATION DOMAINS OF SP1 GOVERN FORMATION OF MULTIMERS AND MEDIATE TRANSCRIPTIONAL SYNERGISM. *GENES DEV* **5**, 1646-56 (1991).
98. PERKINS, N.D. ET AL. A COOPERATIVE INTERACTION BETWEEN NF-KAPPA B AND SP1 IS REQUIRED FOR HIV-1 ENHANCER ACTIVATION. *EMBO J* **12**, 3551-8 (1993).
99. PERKINS, N.D., AGRANOFF, A.B., PASCAL, E. & NABEL, G.J. AN INTERACTION BETWEEN THE DNA-BINDING DOMAINS OF RELA(p65) AND SP1 MEDIATES HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS GENE ACTIVATION. *MOL CELL BIOL* **14**, 6570-83 (1994).
100. PAZIN, M.J. ET AL. NF-KAPPA B-MEDIATED CHROMATIN RECONFIGURATION AND TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION OF THE HIV-1 ENHANCER IN VITRO. *GENES DEV* **10**, 37-49 (1996).
101. COUREY, A.J., HOLTZMAN, D.A., JACKSON, S.P. & TJIAN, R. SYNERGISTIC ACTIVATION BY THE GLUTAMINE-RICH DOMAINS OF HUMAN TRANSCRIPTION FACTOR SP1. *CELL* **59**, 827-36 (1989).
102. SHIMIZU, R., ENGEL, J.D. & YAMAMOTO, M. GATA1-RELATED LEUKAEMIAS. *NAT REV CANCER* **8**, 279-87 (2008).
103. CROSSLEY, M. & ORKIN, S.H. REGULATION OF THE BETA-GLOBIN LOCUS. *CURR OPIN GENET DEV* **3**, 232-7 (1993).
104. TJIAN, R. & MANIATIS, T. TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION: A COMPLEX PUZZLE WITH FEW EASY PIECES. *CELL* **77**, 5-8 (1994).
105. HARIGAE, H. GATA TRANSCRIPTION FACTORS AND HEMATOLOGICAL DISEASES. *TOHOKU J EXP MED* **210**, 1-9 (2006).
106. FERREIRA, R., OHNEDA, K., YAMAMOTO, M. & PHILIPSEN, S. GATA1 FUNCTION, A PARADIGM FOR TRANSCRIPTION FACTORS IN HEMATOPOIESIS. *MOL CELL BIOL* **25**, 1215-27 (2005).
107. PEVNY, L. ET AL. DEVELOPMENT OF HEMATOPOIETIC CELLS LACKING TRANSCRIPTION FACTOR GATA-1. *DEVELOPMENT* **121**, 163-72 (1995).
108. HIRASAWA, R. ET AL. ESSENTIAL AND INSTRUCTIVE ROLES OF GATA FACTORS IN EOSINOPHIL DEVELOPMENT. *J EXP MED* **195**, 1379-86 (2002).
109. TAKAHASHI, S. ET AL. ARREST IN PRIMITIVE ERYTHROID CELL DEVELOPMENT CAUSED BY PROMOTER-SPECIFIC DISRUPTION OF THE GATA-1 GENE. *J BIOL CHEM* **272**, 12611-5 (1997).
110. HOU, C.H. ET AL. INVOLVEMENT OF SP1/SP3 IN THE ACTIVATION OF THE GATA-1 ERYTHROID PROMOTER IN K562 CELLS. *CELL RES* **18**, 302-10 (2008).
111. FUJIWARA, Y., BROWNE, C.P., CUNNIFF, K., GOFF, S.C. & ORKIN, S.H. ARRESTED DEVELOPMENT OF EMBRYONIC RED CELL PRECURSORS IN MOUSE EMBRYOS LACKING TRANSCRIPTION FACTOR GATA-1. *PROC NATL ACAD SCI U S A* **93**, 12355-8 (1996).
112. MARTIN, D.I. & ORKIN, S.H. TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION AND DNA BINDING BY THE ERYTHROID FACTOR GF-1/NF-E1/ERYF 1. *GENES DEV* **4**, 1886-98 (1990).
113. YANG, H.Y. & EVANS, T. DISTINCT ROLES FOR THE TWO cGATA-1 FINGER DOMAINS. *MOL CELL BIOL* **12**, 4562-70 (1992).
114. GHIRLANDO, R. & TRAINOR, C.D. DETERMINANTS OF GATA-1 BINDING TO DNA: THE ROLE OF NON-FINGER RESIDUES. *J BIOL CHEM* **278**, 45620-8 (2003).
115. TRAINOR, C.D., GHIRLANDO, R. & SIMPSON, M.A. GATA ZINC FINGER INTERACTIONS MODULATE DNA BINDING AND TRANSACTIVATION. *J BIOL CHEM* **275**, 28157-66 (2000).
116. WHYATT, D.J., DEBOER, E. & GROSVELD, F. THE TWO ZINC FINGER-LIKE DOMAINS OF GATA-1 HAVE DIFFERENT DNA BINDING SPECIFICITIES. *EMBO J* **12**, 4993-5005 (1993).
117. WEISS, M.J., YU, C. & ORKIN, S.H. ERYTHROID-CELL-SPECIFIC PROPERTIES OF TRANSCRIPTION FACTOR GATA-1 REVEALED BY PHENOTYPIC RESCUE OF A GENE-TARGETED CELL LINE. *MOL CELL BIOL* **17**, 1642-51 (1997).
118. LAMONICA, J.M., VAKOC, C.R. & BLOBEL, G.A. ACETYLATION OF GATA-1 IS REQUIRED FOR CHROMATIN OCCUPANCY. *BLOOD* **108**, 3736-8 (2006).

119. NEWTON, A., MACKAY, J. & CROSSLEY, M. THE N-TERMINAL ZINC FINGER OF THE ERYTHROID TRANSCRIPTION FACTOR GATA-1 BINDS GATC MOTIFS IN DNA. *J BIOL CHEM* **276**, 35794-801 (2001).
120. LOWRY, J.A. & MACKAY, J.P. GATA-1: ONE PROTEIN, MANY PARTNERS. *INT J BIOCHEM CELL BIOL* **38**, 6-11 (2006).
121. KULESSA, H., FRAMPTON, J. & GRAF, T. GATA-1 REPROGRAMS AVIAN MYELOMONOCYTIC CELL LINES INTO EOSINOPHILS, THROMBOBLASTS, AND ERYTHROBLASTS. *GENES DEV* **9**, 1250-62 (1995).
122. IWASAKI, H. ET AL. GATA-1 CONVERTS LYMPHOID AND MYELOMONOCYTIC PROGENITORS INTO THE MEGAKARYOCYTE/ERYTHROCYTE LINEAGES. *IMMUNITY* **19**, 451-62 (2003).
123. TSAI, S.F., STRAUSS, E. & ORKIN, S.H. FUNCTIONAL ANALYSIS AND IN VIVO FOOTPRINTING IMPLICATE THE ERYTHROID TRANSCRIPTION FACTOR GATA-1 AS A POSITIVE REGULATOR OF ITS OWN PROMOTER. *GENES DEV* **5**, 919-31 (1991).
124. STRAUSS, E.C. & ORKIN, S.H. IN VIVO PROTEIN-DNA INTERACTIONS AT HYPERSENSITIVE SITE 3 OF THE HUMAN BETA-GLOBIN LOCUS CONTROL REGION. *PROC NATL ACAD SCI U S A* **89**, 5809-13 (1992).
125. RODRIGUEZ, P. ET AL. GATA-1 FORMS DISTINCT ACTIVATING AND REPRESSIVE COMPLEXES IN ERYTHROID CELLS. *EMBO J* **24**, 2354-66 (2005).
126. SHIMIZU, R., OHNEDA, K., ENGEL, J.D., TRAINOR, C.D. & YAMAMOTO, M. TRANSGENIC RESCUE OF GATA-1-DEFICIENT MICE WITH GATA-1 LACKING A FOG-1 ASSOCIATION SITE PHENOCOPIES PATIENTS WITH X-LINKED THROMBOCYTOPENIA. *BLOOD* **103**, 2560-7 (2004).
127. TSANG, A.P. ET AL. FOG, A MULTITYPE ZINC FINGER PROTEIN, ACTS AS A COFACTOR FOR TRANSCRIPTION FACTOR GATA-1 IN ERYTHROID AND MEGAKARYOCYTIC DIFFERENTIATION. *CELL* **90**, 109-19 (1997).
128. LIEW, C.K. ET AL. ZINC FINGERS AS PROTEIN RECOGNITION MOTIFS: STRUCTURAL BASIS FOR THE GATA-1/FRIEND OF GATA INTERACTION. *PROC NATL ACAD SCI U S A* **102**, 583-8 (2005).
129. ELAGIB, K.E. ET AL. RUNX1 AND GATA-1 COEXPRESSION AND COOPERATION IN MEGAKARYOCYTIC DIFFERENTIATION. *BLOOD* **101**, 4333-41 (2003).
130. KUO, M.H. & ALLIS, C.D. IN VIVO CROSS-LINKING AND IMMUNOPRECIPITATION FOR STUDYING DYNAMIC PROTEIN:DNA ASSOCIATIONS IN A CHROMATIN ENVIRONMENT. *METHODS* **19**, 425-33 (1999).
131. PFAFFL, M.W. A NEW MATHEMATICAL MODEL FOR RELATIVE QUANTIFICATION IN REAL-TIME RT-PCR. *NUCLEIC ACIDS RES* **29**, e45 (2001).
132. PEDERSEN, A.G., BALDI, P., CHAUVIN, Y. & BRUNAK, S. THE BIOLOGY OF EUKARYOTIC PROMOTER PREDICTION—A REVIEW. *COMPUT CHEM* **23**, 191-207 (1999).
133. ABRAMS, J.M., THORPE, S.M. & SCHIMKE, R.T. INTRONIC POSITIONING MAXIMIZES CO-EXPRESSION AND CO-AMPLIFICATION OF NONSELECTABLE HETEROLOGOUS GENES. *J BIOL CHEM* **264**, 14016-21 (1989).
134. REYNOLDS, G.A. ET AL. HMG COA REDUCTASE: A NEGATIVELY REGULATED GENE WITH UNUSUAL PROMOTER AND 5' UNTRANSLATED REGIONS. *CELL* **38**, 275-85 (1984).
135. ALMEIDA, A.M. 1-10 (2007).
136. FLUCK, C.E. & MILLER, W.L. GATA-4 AND GATA-6 MODULATE TISSUE-SPECIFIC TRANSCRIPTION OF THE HUMAN GENE FOR P450C17 BY DIRECT INTERACTION WITH SP1. *MOL ENDOCRINOL* **18**, 1144-57 (2004).
137. HUANG, N., DARDIS, A. & MILLER, W.L. REGULATION OF CYTOCHROME B5 GENE TRANSCRIPTION BY SP3, GATA-6, AND STEROIDOGENIC FACTOR 1 IN HUMAN ADRENAL NCI-H295A CELLS. *MOL ENDOCRINOL* **19**, 2020-34 (2005).
138. LIU, C., GLASSER, S.W., WAN, H. & WHITSETT, J.A. GATA-6 AND THYROID TRANSCRIPTION FACTOR-1 DIRECTLY INTERACT AND REGULATE SURFACTANT PROTEIN-C GENE EXPRESSION. *J BIOL CHEM* **277**, 4519-25 (2002).
139. KIELA, P.R., LESUEUR, J., COLLINS, J.F. & GHISHAN, F.K. TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF THE RAT NHE3 GENE. FUNCTIONAL INTERACTIONS BETWEEN GATA-5 AND SP FAMILY TRANSCRIPTION FACTORS. *J BIOL CHEM* **278**, 5659-68 (2003).
140. LECOINTE, N. ET AL. GATA-AND SP1-BINDING SITES ARE REQUIRED FOR THE FULL ACTIVITY OF THE TISSUE-SPECIFIC PROMOTER OF THE TAL-1 GENE. *ONCOGENE* **9**, 2623-32 (1994).
141. CHIN, K., ODA, N., SHEN, K. & NOGUCHI, C.T. REGULATION OF TRANSCRIPTION OF THE HUMAN ERYTHROPOIETIN RECEPTOR GENE BY PROTEINS BINDING TO GATA-1 AND SP1 MOTIFS. *NUCLEIC ACIDS RES* **23**, 3041-9 (1995).
142. BLOCK, K.L., SHOU, Y. & PONCZ, M. AN ETS/SP1 INTERACTION IN THE 5'-FLANKING REGION OF THE MEGAKARYOCYTE-SPECIFIC ALPHA IIb GENE APPEARS TO STABILIZE SP1 BINDING AND IS ESSENTIAL FOR EXPRESSION OF THIS TATA-LESS GENE. *BLOOD* **88**, 2071-80 (1996).
143. TUGORES, A., MAGNESS, S.T. & BRENNER, D.A. A SINGLE PROMOTER DIRECTS BOTH HOUSEKEEPING AND ERYTHROID PREFERENTIAL EXPRESSION OF THE HUMAN FERROCHELATASE GENE. *J BIOL CHEM* **269**, 30789-97 (1994).
144. SMALE, S.T. TRANSCRIPTION INITIATION FROM TATA-LESS PROMOTERS WITHIN EUKARYOTIC PROTEIN-CODING GENES. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA* **1351**, 73-88 (1997).
145. PATIENT, R.K. & MCGHEE, J.D. THE GATA FAMILY (VERTEBRATES AND INVERTEBRATES). *CURR OPIN GENET DEV* **12**, 416-22 (2002).
146. HOSOYA-OHMURA, S. ET AL. GATA-4 INCOMPLETELY SUBSTITUTES FOR GATA-1 IN PROMOTING BOTH PRIMITIVE AND DEFINITIVE ERYTHROPOIESIS IN VIVO. *J BIOL CHEM* **281**, 32820-30 (2006).
147. ALMEIDA, A.M. ET AL. TARGETED THERAPY FOR INHERITED GPI DEFICIENCY. *N ENGL J MED* **356**, 1641-7 (2007).

ANEXO I - MECANISMO MOLECULAR DE SP1 E POTENCIAL TERAPÊUTICO

De acordo com o trabalho realizado por Almeida *et.al.* em 2007, a ligação de Sp1 é crucial ao controlo do estado de acetilação e da actividade transcricional do promotor de *PIGM*. Sp1 interage directamente com o complexo CBP/p300, que tem actividade de acetiltransferase de histonas (HAT), com a HDAC1, uma desacetilase e com a DNMT1, uma metiltransferase. Assim, Sp1 não está só envolvido na regulação positiva da transcrição, pela promoção da acetilação, mas também na inibição da regulação negativa, pela hipoacetilação e metilação das ilhas GC¹⁴⁷. A presença da mutação -270 C>G no promotor de *PIGM*, impedindo a ligação de Sp1 ao motivo canónico, induz à hipoacetilação de histonas neste promotor. Nesse mesmo trabalho, foi demonstrado que inibindo as desacetilases de histonas, utilizando butirato de sódio (NaBu), foi possível reverter a acção de hipoacetilação, o que resultou num acréscimo da actividade transcricional (*in vitro* e *in vivo*), de forma dependente de Sp1, mesmo na presença da mutação causadora da IGD. Isto ocorre, provavelmente, porque Sp1 se liga aos outros três motivos identificados pela análise bioinformática da região promotora de *PIGM*¹², onde pode actuar com outros FT, tais como GATA-1. A regulação da actividade transcricional de *PIGM*, por FT da família GATA, durante o desenvolvimento embrionário e neuronal, pode ter sido suficiente para prevenir o aparecimento de deficiências neuronais letais, como as observadas nos ratinhos *PIGA*^{-/-}, bem como hemólise intravascular, mas foi insuficiente para impedir de episódios de epilepsia, trombozes e falha medular.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Assim, a regulação da acetilação e da actividade transcricional de Sp1 pelo NaBu, pode ter um potencial terapêutico significativo em diversas doenças causadas pela hipoacetilação dependente de Sp1.

Por outro lado, o mecanismo subjacente à compensação por GATA-1 da disrupção causada pela mutação Sp1 proximal no promotor de *PIGM*, não foi ainda esclarecido. Algumas questões permanecem por responder:

Sabendo que GATA-1 induz a transcrição de *PIGM*, de forma dependente e independente de Sp1, será que tem o mesmo efeito nas células dos pacientes com IGD? Este estudo está a decorrer usando células linfoblastóides (LBCLs) dos pacientes.

Se sim, que mecanismo levará GATA-1 a afectar a transcrição a partir deste promotor nas LBCLs? Será dependente, independente de Sp1, ou idêntico ao observado nas células HeLa e K562?

Será que a mutação Sp1 leva também à hipoacetilação do promotor nestas células?

ANEXO II – MEIOS E REAGENTES

MEIOS DE CULTURA

RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) (1x) (GIBCO®) (para K562)

- 500mL de RPMI 1640 sem L-Glutamina, sem piruvato e com vermelho de fenol
- 50mL de FBS (Invitrogen) - 10% (v/v)
- 5mL de L-Glutamina (200mM) (100X) (GIBCO®) (Invitrogen; nº de catálogo 25030-024) - 1% (v/v)
- 5mL de Antibiótico (10µg/mL) – 1% (v/v)

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) *High-Glucose* (1x) (GIBCO®) (para HeLa)

- 500mL de DMEM *High-Glucose* (4,5g/L) sem L-Glutamina, sem piruvato e com vermelho de fenol
- 50mL de FBS (Invitrogen) - 10% (v/v)
- 5mL de L-Glutamina (Invitrogen) - 1% (v/v)
- 5mL de Antibiótico (10µg/mL) – 1% (v/v)

Solução de criopreservação

- 20% meio completo
- 60% FBS
- 10% DMSO

Tripsina-EDTA

- Tripsina-EDTA (0,05%) (1x) (GIBCO®) (Invitrogen; nº de catálogo 25300-054)

DPBS

- DPBS (1x) (GIBCO®) (Invitrogen; nº de catálogo 14190-094)
- sem CaCl₂
- sem MgCl₂

Solução de Azul Tripano (Invitrogen;15250-061)

- Solução de Azul de Tripano (0,8 mM in PBS)
- PBS (1x) - concentração final 0,04% (v/v)

Meio de cultura LB (*Luria-Bertani Medium*)-líquido

- 10g *Tryptone*
- 5g *Yeast Extract*
- 10g NaCl
- dH₂O a perfazer o volume de 1L
- Ampicilina 50µg/mL

Meio de cultura LB-Agar (*Luria-Bertani Medium*)

- 10g *Tryptone*

- 5g *Yeast Extract*
- 10g NaCl
- 10g/L Agar
- dH₂O a perfazer o volume de 1L
- Ampicilina 50µg/mL

Mutagéneses Sítio-Dirigida

- *GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System* (Invitrogen; 12397-014)
- *E.coli One Shot® MAX Efficiency® DH5α™-T1®* (Invitrogen; 12297-016)
- *Vector pGL3-Basic Vector* (Promega; nº de catálogo: E1751)
- *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen; 11304-011)
- *pGL3-Basic Vector* (Promega; #E1751)
- *High Pure Plasmid Isolation Kit (Miniprep)* (Roche; #1754-777)
- *Taq DNA Polymerase*
- *pUC Mix Marker, 8* (0,5µg/µL) (Fermentas; #:SM0301/2/3)
- *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems; #PN4336774)
- *E.coli One shot Top10* (Invitrogen; #C4040-03)
- *QIAfilter Plasmid Midi Kit (25)* (QIAGEN; #12243)

Ensaio Repórter

- *Lipofectamine™ 2000* (LF2000) (Invitrogen; #11668019)
- *Passive Lysis Buffer* (PLB) (Promega; #E1941)

Electroforese em Gel de Agarose

- Solução de TBE (0,5x): Tris 90mM; ácido bórico 90M; EDTA 0,2mM; pH8
- *pUC Mix Marker, 8* (Fermentas; nº de catálogo: SM0301/2/3)

Ensaio de CHIP

- *Red CHIP Kit™ – The Transcription Factor Chromatin Immunoprecipitation Kit* (Diagenode, nº de catálogo: kch-redTBP-012)
- *OneDay CHIP Kit™ – The Rapid Chromatin Immunoprecipitation Kit* (Diagenode; nº de catálogo: kch-oneDIP-060)
- *Sonicador Sanyo Soniprep MSS 150 CX3.5* (SANYO Electric Co.,Osaka, Japão)
- *Rabbit polyclonal to GATA-1 CHIP Grade Antibody* (1,26mg/mL) (Abcam; #ab11963)
- *Complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche; #11836170001)
- *SYBR Green I Dye* (Quanta Biosciences™; #95073-250)

- *PerfeCta™ SYBR Green® FastMix™, ROX* (Quanta Biosciences; #95073-250)
- *ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems; #ABI7900HT)

Ensaio de EMSA

- Tampão A: HEPES (20mM), KCl (10mM), EDTA (1mM), NP40 (0,2%), glicerol (10%), DTT (1,5mM), vanadato (100x); pastilha de Complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets (25x) (Roche; # 11836170001);
- Tampão B – HEPES (20mM), KCl (10mM), EDTA (1mM), NaCl (0,4M), glicerol (20%), DTT (1,5mM), vanadato (100x); pastilha de Complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets (25x) (Roche; # 11836170001);
- Anticorpo anti-GATA-1 (Santa Cruz; #sc-265X)
- *Gel Shift Assay System* (Promega; #E3050)
- *QIAquick Gel Extraction Kit (250)* (QIAGEN; #28706)
- [γ -³²P]-ATP (50 μ Ci/mL com 3000Ci/mmol) (Perkin Elmer; PELSNEG 002A250U);
- *Nuclease Free Water* (Promega; P1193);
- *T4K* (Promega);
- Gel Shift Binding Buffer (5x) (Promega; # E3581);
- *Kodak Biomax MS Film* (Kodak; #Z363057)

Gel de Poliacrilamida a 4% (PAGE)

- TBE (0,5x);
- Solução de acrilamida:bisacrilamida (40:1) (10%);
- Glicerol (10%);
- APS (1,25%) (GIBCO, ref^a 15523-012);
- TEMED (0,125%) (Merck, ref^a K35944732);
- dH₂O;

ANEXO III – TABELAS

Todos os *primers* foram construídos pela Sigma (*Sigma-Genosys Ltd*, Londres, GB).

Designação	Orientação	Sequência	Tamanho do <i>primer</i> (nts)	T _m (°C)
SONDA1 F	<i>sense</i>	GGTTGCCGGATAAAATACAA	20	53,2
SONDA1 R	<i>antisense</i>	TTGTATTTTATCCGGCAACC	20	53,2
SONDA2 F	<i>sense</i>	AATCTCTGATTACCAACTAG	20	51,2
SONDA2 R	<i>antisense</i>	CTAGTTGGTAATCAGAGATT	20	51,2
SONDA3 F	<i>sense</i>	AATACAGAGATACTGAGGCA	20	53,2
SONDA3 R	<i>antisense</i>	TGCCTCAGTATCTCTGTATT	20	53,2
E-GATA1 F	<i>sense</i>	GGTGGGTAAGAAGATAAGGCCATCAG	28	66,6
E-GATA1 R	<i>antisense</i>	CTGATGGGCCTTATCTTTTACCCACC	28	66,6
AP2 F	<i>sense</i>	GATCGAACTGACCGCCCGCGCCCGT	26	74,3
AP2 R	<i>antisense</i>	CTAGCTTGACTGGCGGGCGCCGGGCA	26	74,3

TABELA 1: SONDAS USADAS OS ENSAIOS DE EMSA

Designação	Controlo negativo (sem EN)	Controlo positivo (com EN) (<i>shift</i>)	Competição inespecífica (com sonda fria competidora)	Competição específica (com sonda fria alvo)	Com mAb α -GATA-1 (<i>super-shift</i>)
Tampão de Ligação (5x)	2	2	2	2	2
EN de K562		2	2	2	2
Sonda fria			2	2	
mAb α -GATA-1					1
dH ₂ O	6	4	2	2	3
Sonda marcada	2	2	2	2	2
Volume total	10	10	10	10	10

TABELA 2: CONDIÇÕES DAS REACÇÕES DOS ENSAIOS DE EMSA

Designação	Orientação	Sequência	Tamanho do <i>primer</i> (nts)	T _m (°C)
New Upstr ChIP F	<i>sense</i>	TCTTCGTTCCCACTGCT	20	57,3
New Upstr ChIP R	<i>antisense</i>	CTGTCCCTACATGGCTGTCC	20	61,4
New Downstr ChIP F	<i>sense</i>	TCATCTCTCTCGCCCTTCAT	20	57,3
New Downstr ChIP R	<i>antisense</i>	TAGGGGAAATTGGTGCAAGA	20	55,25
CKIT ChIP F	<i>sense</i>	TCGCTGTGGGGAAGAACTAT	20	57,3
CKIT ChIP R	<i>antisense</i>	ACTGCCAGAAAGTGCCCTTA	20	57,3
ChIP GP+GC F	<i>sense</i>	TCTTCCCATCACCTTACC	20	57,3
ChIP GP+GC R	<i>antisense</i>	CCATGCAATATTGGAGGCATA	20	54,4
ChIP3 F	<i>sense</i>	TGCCTGAAGGTTGAGTAGG	20	59,3
ChIP3 R	<i>antisense</i>	GGTGAAGGTGATGGAAAGA	20	58,3

TABELA 3: *PRIMERS* PARA AS REACÇÕES DE PCR DO CHIP

Designação	Orientação	Sequência	Tamanho do <i>primer</i> (nts)	T _m (°C)
QPCR UP F	<i>sense</i>	TAAATTTGGTGCCTCCCATC	20	55,25
QPCR UP R	<i>antisense</i>	GTGGCTGGATTGGTTTCAGT	20	57,3
QPCR DW F	<i>sense</i>	TCATCTCTCTCGCCCTTCAT	20	57,3
QPCR DW R	<i>antisense</i>	ATAGTCCCCAGGATGCTTT	20	57,3
QPCR CKIT F	<i>sense</i>	TCGCTGTGGGGAAGAACTAT	20	57,3
QPCR CKIT R	<i>antisense</i>	ACTGCCAGAAAGTGCCCTTA	20	57,3

QPCR GC+2 F	<i>sense</i>	TCTTTCCCATCACCTTCACC	20	57,3
QPCR GC+2 R	<i>antisense</i>	CCATGCAATATTGGAGGCATA	20	54,4
QPCR GD F	<i>sense</i>	TTTGCCAGAGTGATTGGAGA	20	55,25
QPCR GD R	<i>antisense</i>	GGAAAGCGTCACAAAATTCC	20	55,25

TABELA 4: PRIMERS PARA AS REACÇÕES DE QPCR DO CHIP

Designação	Orientação	Sequência	Tamanho do primer (nts)	T _m (°C)	Mutação	Local da mutação
MutGATA1 F	<i>sense</i>	ACCTTCACCTAGGGTTGCCGAACAAAATA-CAAGC	34	69,5	GATA→AACA	-750
MutGATA1 R	<i>antisense</i>	CGGCAACCCTAGGTGAAGGTGATGGAAAG	30	70,9	--	
MutGATA2 F	<i>sense</i>	CCACTTAAATCTGAATCTCTAACTACCAAC-TAGTA	35	64,8	GATTA→AACTA	-650
MutGATA2 R	<i>antisense</i>	AGAGATTCAGATTTAAGTGGGCAGCTTGTA	30	64,0	--	
Mut3 F	<i>sense</i>	GAAGAAATAGCAAATACAGAAACACTGAGG-CATA	34	53,2	GATA→AACA	-810
Mut3 R	<i>antisense</i>	TCTGTATTTGCTATTTCTTGTCAAAGTT	30	53,2	--	
MSp1 F	<i>sense</i>	CCACGGACCGGAAATCCCGCTCCGCTG-GAA	31	66,6	CG→CC	-270
MSp1 R	<i>antisense</i>	GCGGGATTTCCGGTCCGTGGGAGGGGA-GAC	30	66,6	--	

TABELA 5: PRIMERS PARA AS REACÇÕES DE MUTAGÊNESE

Designação	Orientação	Sequência	Tamanho do primer (nts)	T _m (°C)
M52 F2	<i>sense</i>	GTGTGAGTGATTTTCTGGAACCT	23	57,1
M52 R	<i>antisense</i>	AAGGGGGCTGAGTGTGTATG	20	59,4
Sp1 F	<i>sense</i>	GCGGGCTGTCACTTACAAAG	20	59,4
Sp1 R	<i>antisense</i>	CTATCACATCCGGCATGAAG	20	57,3

TABELA 6: PRIMERS PARA AS REACÇÕES DE SEQUENCIAÇÃO

Designação	Nº de ciclos	Temperatura	Duração	Designação	Nº de ciclos	Temperatura	Duração
PCR ChIP:				PCR Mutagênese:			
Desnaturação inicial	--	94°C	1min	Desnaturação inicial	--	95°C	10min
Desnaturação	27	94°C	45s	Desnaturação	32	94°C	45s
Annealing	27	62°C	30s	Annealing	32	59°C	30s
Extensão dos primers	27	72°C	90s	Extensão dos primers	32	72°C	90s
qPCR ChIP:				PCR Sequenciação:			
Desnaturação inicial	--	95°C	10min	Desnaturação inicial	--	96°C	3min
Desnaturação	55	95°C	15s	Desnaturação	25	96°C	10s
Annealing	55	60°C	60s	Annealing	25	50°C	5s
Extensão dos primers	55	60°C	60s	Extensão dos primers	25	60°C	4min
Ciclo desnaturação							
ChIP:							
Desnaturação inicial	--	95°C	15min				
Arrefecimento	↓	60°C	15min				
Desnaturação (0,03°C/s)	↑	95°C	20min				

TABELA 7: CONDIÇÕES DAS REACÇÕES DE PCR