## **CRISTIANE NAFFAH DE SOUZA**

# REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE FASL PELA PGE<sub>2</sub> EM LINFÓCITOS T CD4<sup>+</sup>: PAPEL DO REPRESSOR TRANSCRICIONAL ICER

Dissertação apresentada ao Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo 2014

## **CRISTIANE NAFFAH DE SOUZA**

# REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE FASL PELA PGE₂ EM LINFÓCITOS T CD4<sup>+</sup>: PAPEL DO REPRESSOR TRANSCRICIONAL ICER

Dissertação apresentada ao Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante Mendes

Versão original

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Souza, Cristiane Naffah de.

Regulação da expressão gênica de FASL pela  $PGE_2$  em linfócitos T  $CD4^*$ : papel do repressor transcricional ICER / Cristiane Naffah de Souza. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante Mendes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Controle molecular da morte celular.

Versão do título para o inglês: Regulation of FASL gene expression by PGE<sub>2</sub> in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes: role of transcirptional repressor ICER.

AICD 2. PGE<sub>2</sub> 3. FASL 4. ICER 5. Linfócitos T CD4<sup>+</sup>
Regulação gênica I. Mendes, Prof. Dr. João Gustavo Pessini
Amarante II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB018/2014

## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Cristiane Naffah de Souza.
Título da Dissertaçã	ão: Regulação da expressão gênica de FASL pela PGE₂ em linfócitos T CD4⁺: papel do repressor transcricional ICER.
Orientador(a):	Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante Mendes.
A Comissão July em sessão púl: ( ) A	gadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, olica realizada a///
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405 e-mail: <u>ccp@icb.usp.br</u>

Comissão de Ética em Pesquisa

### CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 507/12 referente ao projeto intitulado: "*Regulação da expressão gênica do gene Fasl pela PGE2 em linfócitos T CD4+*" sob a responsabilidade de **Cristiane Naffah de Souza,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 14 de fevereiro de 2012.

No

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO

Coordenador da CEPsh - ICB/USP

#### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil Telefone: (55) (011) 38130900 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEPSH.021/2012.

#### DECLARAÇÃO

Em adendo ao Protocolo de Isenção CEP-ICB nº 507/12, informo que o titulo do Projeto foi alterado para *" Regulação da expressão gênica de FasL pela PGE*<sup>2</sup> *em linfócitos T CD4+"*, sem modificações de seu conteúdo.

São Paulo, 25 de abril de 2012.

Prof. Dr. PAOLO M.A.ZAONOTTO Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Mms.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - ICB/USP

Aos meus pais.

#### AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus, que é o centro da minha vida, que nunca me faltou e me deu a força necessária para chegar até aqui. As vitórias alcançadas em minha vida são Dele!

Agradeço a toda a minha família, pelo amor, incentivo e apoio constantes, em especial da minha mãe e melhor amiga (minha grande admiração como mãe e mulher, sempre carinhosa, pacienciosa e guerreira, mesmo nos momentos de escuridão) e, também, do meu pai (que é mais contido, mas uma fortaleza. Também te admiro muito). Quero que saibam que meu amor por vocês e minha gratidão são maiores do que esse mundo.

À minha irmã, que sei que torce muito por mim.

Agradeço ao Lê, meu noivo. Não existem palavras para descrever o seu apoio, carinho, amor e compreensão durante essa etapa da minha vida, e você sabe do que eu estou falando! Você compartilha comigo os momentos de mais completa alegria e também de profundas tristezas...e me dá a mão em todos eles, e me ajuda a continuar o caminho há mais de 6 anos. Muito obrigada também por todas as discussões profissionais que temos. Você sabe o quanto admiro seu raciocínio científico e isso me impulsiona. Ah, os *Western Blot...*se não fosse por você eles não existiriam.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo, por me receber em seu laboratório. Serei sempre grata por essa oportunidade. O aprendizado agregado nesses 2 anos foi enorme e carregarei sempre comigo. Obrigada por fazer desta etapa da minha vida algo valioso! Agradeço também o seu apoio, compreensão e amizade, fundamentais para que eu concluísse essa etapa.

Agradeço aos meus grandes amigos de Campinas, de Uberaba e os novos amigos daqui de São Paulo. E uma, em especial, que é amiga de Campinas, de Uberaba e também de São Paulo, Cris. Vocês sabem que a distância nunca será um empecilho para nós! Obrigada por todo apoio e carinho.

Meu muito obrigada ao Prof. Niels e Profa. Jacqueline, pela paciência com que ouviram meus desabafos, pelos conselhos científicos e não científicos, enfim, pela amizade! Muito obrigada mesmo. A todos os professores, colegas e funcionários do departamento. Dentre eles, Eni, João, Jotelma, Amanda, Rogério, Andrea... Obrigada por sempre estarem dispostos a me ajudar!

À simpatia diária dos porteiros....

Quero agradecer, e muito, ao Lab 244 que me acolheu de braços abertos, como faz com todos que se juntam a ele. Aprendi com esse time que a cooperação é algo fundamental na pesquisa.

Agradeço imensamente cada um do laboratório.

Tiago, obrigada por me acolher com tanta amizade e gentileza, não só no início, mas também no meio e no fim desta etapa. Obrigada!

Agradeço ao Rodolfo, à Inaê e à Jackie Midori...companheiros de início e até meio da jornada. Sinto falta de vocês.

Ricardo e Daniel, antigos alunos do laboratório que tive o prazer de conhecer. Agradeço ao Ricardo por me fazer entender melhor sites como o UCSC e, a partir daí, iniciar todo meu trabalho. Obrigada por ter dedicado seu tempo a me ajudar! Agradeço ao Daniel Diniz por nunca estar ocupado para me responder uma dúvida por e-mail. Sua prestatividade, juntamente à sua simpatia me impulsionaram a me aventurar na área de bioinformática. Obrigada!

Barbara...provando que a distância não é um empecilho (rs), estão os mil emails que te mandei!rs Obrigada por me fazer gostar ainda mais e entender melhor a biologia molecular. No words!

Lu, sem palavras para agradecer o seu apoio, intelectual e pessoal e sua amizade. Todas as correções (rs) e discussões sobre meu trabalho ampliaram meus horizontes e você sabe disso. Muito obrigada!

Emilia, o que seria de mim se não fosse a sua amizade, se não fosse você nas aulas de inglês e se você não fizesse aquele experimento no momento em que eu mais precisei? Muito obrigada!

Sandy, você chegou ano passado com tanta simpatia que parece que você está comigo desde o começo dessa jornada. Muito obrigada mesmo (Merci) por sempre estar disposta a me ajudar...até agora, até depois de tudo isso!

Nath...você que me ajudou tanto no início das minhas quantificações proteicas, na época da anexina!! Nos meus *Western Blot...* Você que, junto ao Cris, me apresentou o creme de queijo (rs). Obrigada por tudo e pela amizade!

Ju e Juninho, obrigada pelas discussões, experimentos e por sempre me explicar pacientemente sobre seus resultados, Ju.rs Juninho, obrigada pelas correções, pelo creme de queijo (rs)...obrigada à vocês pela amizade e apoio!

Flávia...você tem Jurkat?rsrs Obrigada por sempre estar disposta a me ajudar e também por tantas outras coisas, conversas e apoio.

Marcela, Barbara (IC), Pri (pós-doc), Jennifer, Pri (mestrado), obrigada por todas as conversas que tivemos, sobre experimentos ou não, é uma pena não poder compartilhar mais tempo com vocês no mesmo laboratório....mas a gente se vê.rs

Paola e Carol, obrigada por trazerem Uberaba mais perto de mim (rs), e com isso, lembranças boas.

Daniel, meu muito obrigada por sempre me ajudar quando precisei e também pela amizade.

Agradeço ao Prof. Jean e seus alunos. Obrigada pelas conversas sempre enriquecedoras.

Agradeço à Profa. Lourdes e a todo Lab 219 (Complemento) pela amizade, ajuda com experimentos, almoços maravilhosos e todo apoio! Tati, obrigada por tudo! Íris...é ótimo ter sua companhia e estreitar a amizade com você todos os dias no almoço!

E, da mesma forma, agradeço ao pessoal do Lab do Niels...àqueles que eu já conhecia de outras Interbiomed (rs, e que são mais do que colegas de departamento) e àqueles que passei a conhecer cada dia mais e melhor e ver que são pessoas sempre dispostas a ajudar e que muito me ajudaram! Aqui cabe citar a Mari e o Welbert...obrigada por ouvirem meus desabafos, por me aconselharem, por estarem por perto.

Obrigada de coração, Cris, Roberto, Karen, Cecília, Zé, Marina...Agradeço as ajuda com protocolos, conversas, risadas, desabafos...rs.

Agradeço aos membros da minha banca de qualificação: Profa. Dra. Sonia Jancar, Prof. Dr. William Festuccia e Prof. Dr. Sergio Verjovski, pelas sugestões e críticas.

Agradeço à Clarice, que me apresentou ao Prof. William, o qual me ajudou e ajuda com muita disposição e sem medir esforços. Foi uma sorte te encontrar! Obrigada por todo apoio. Serei sempre grata por toda ajuda e aprendizado!

Agradeço as agências de fomento CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro durante os anos de pesquisa.

"Não basta saber, é preciso também aplicar; Não basta querer, é preciso também agir. Mais do que analisar, pesquisar, medicar, é necessário conjugar o verbo educar [...]".

(Roberto S.O. Styjer)

#### RESUMO

Naffah-de-Souza CN. Regulação da expressão gênica de FASL pela PGE<sub>2</sub> em linfócitos T CD4<sup>+</sup>: papel do repressor transcricional ICER. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> orguestram a resposta imune adaptativa, auxiliando os macrófagos, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> e os linfócitos B na resposta mais eficiente frente a um antígeno. As etapas que caracterizam uma resposta imune adaptativa são: apresentação do antígeno aos linfócitos T pelas APCs (antigen-presenting cells), ativação e diferenciação dos linfócitos T em células efetoras e de memória. expansão clonal e morte celular para retorno à homeostasia. Esta morte celular na fase terminal da resposta imune, ocorre por apoptose através da morte celular induzida por ativação (AICD-activation-induced cell death) e morte autônoma de células T ativadas (ACAD-activated T cell autonomous death). O primeiro tipo de morte ocorre via receptor de morte FAS e sua interação com seu ligante, FASL. Dentro desse contexto, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a PGE<sub>2</sub>, secretada por APCs, após estímulo com LPS, inibe a expressão de fasl em hibridomas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (DO11.10), inibindo a morte dessas células por AICD. Tendo em vista que o mecanismo pelo qual a PGE2 inibe a expressão de fasl ainda não é conhecido, o presente trabalho tem como objetivo compreender o mecanismo molecular de atuação da PGE2 sobre os linfócitos T CD4<sup>+</sup> na inibição gênica do FASL, tendo como hipótese o envolvimento do repressor transcricional ICER (induced cAMP early repressor), o qual se liga a sítios de ligação CRE (cAMP responsive elements) nos promotores gênicos. Sendo assim, primeiramente, foi feita uma busca por bioinformática, da seguência do promotor do gene fasl, através do UCSC Genome Bioinformatics. Após delimitação da região promotora, foi utilizado o programa MacVector 12.5.1 para mapear o promotor do fasl em busca de sítios CRE, onde verificamos a presença de dois destes sítios. Para investigar o papel de icer na via de inibição do fasl pela PGE2, foi realizada uma curva dose-resposta e uma cinética através de RT-PCR, demonstrando que 10<sup>-8</sup> M de PGE<sub>2</sub> induz a expressão gênica de ICER em 1hora. Através da indução da AICD por anticorpos anti-CD3 e posterior marcação da morte por anexina V-FITC, foi verificado que PGE<sub>2</sub> 10<sup>-8</sup> M é capaz de proteger da morte as células DO11.10. Posteriormente, foi avaliada a expressão de icer e fasl após as células DO11.10 serem tratadas com  $PGE_2$  por 4h, sendo verificado que este mediador lipídico aumenta a expressão de icer e inibe fasl. Portanto, PGE<sub>2</sub> é capaz de proteger as células DO11.10 da AICD e induzir a expressão gênica de ICER, de maneira dose-dependente. Além disso, PGE<sub>2</sub> inibe a expressão gênica de FASL ao mesmo tempo que induz a expressão de icer, sugerindo a participação deste na via de inibição do fasl pela PGE<sub>2</sub>. Neste momento, estamos realizando experimentos de inibição da expressão de icer através da tecnologia de RNA de interferência, para verificar se o efeito da PGE2 sobre a expressão de fasl ocorre em células deficientes de ICER.

Palavras-chave: FASL. AICD. PGE<sub>2</sub>. ICER.

#### ABSTRACT

Naffah-de-Souza CN. Regulation of FASL gene expression by PGE<sub>2</sub> in CD4+ T lymphocytes: role of transcriptional repressor ICER [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

CD4<sup>+</sup> T lymphocytes orchestrate the adaptive immune response, helping the macrophages, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and B lymphocytes to reach an efficient antigenspecific immune response. The adaptive immune response is characterized by different phases, such as, antigen presentation to T lymphocytes by APCs (antigenpresenting cells), T lymphocyte activation and differentiation in effector and memory T cells, clonal expansion and, finally, clonal cell death to return to homeostasis. This cell death achieved at the terminal phase of the immune response occurs by apoptosis through the processes known as AICD (activation-induced cell death) and ACAD (activated T cell autonomous death). The first type occurs via the interaction between the death receptor FAS and its ligand FASL. In this context, our research group demonstrated that PGE<sub>2</sub>, secreted by APCs after LPS stimulation, inhibits the fasl expression in the CD4<sup>+</sup> T lymphocyte hybridoma (DO11.10), thereby inhibiting AICD in these cells. Since the mechanism by which PGE<sub>2</sub> inhibits fasl expression is not known, our aim is to understand the molecular mechanism responsible for PGE2 inhibition of fasl in CD4<sup>+</sup> lymphocytes. Our hypothesis is that the transcriptional repressor ICER (induced cAMP early repressor), which binds to CRE (cAMP responsive elements) sites on gene promoters, is involved in this process. Thus, using bioinformatics tools such as UCSC Genome Bioinformatics, we examined the fasl promoter sequence and mapped the CRE sites on the fasl promoter, using the software MacVector 12.5.1. In order to investigate the involvement of *icer* on *fasl* inhibition induced by PGE2, we performed a dose-response and a time-course analysis by RT-PCR and found that PGE<sub>2</sub> 10<sup>-8</sup> M induces *icer* gene expression after 1 hour. We then confirmed that  $PGE_2 = 10^{-8}$  M protects DO11.10 cells from death through induction of AICD with anti-CD3 and annexin V-FITC staining. Moreover, we treated DO11.10 cells for 4 hours and we verified fasl and icer gene expression in the same time. Finally, we found that PGE<sub>2</sub> increases *icer* gene expression and inhibits fasl expression concomitantly. Therefore, PGE<sub>2</sub> protection of DO11.10 cells from AICD is associated with the induction of *icer* and downregulation of *fasl*. We are now performing knocking down experiments using shRNA for *icer* to test whether the effect of PGE<sub>2</sub> on FASL occurs in *icer*-deficient cells.

Keywords: FASL. AICD. PGE<sub>2</sub>. ICER.

#### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACAD- Activated Cell Autonomous Death
- AICD- Activation-Induced Cell Death
- ALPS- Autoimmune Limphoproliferative Sindrome
- AMPc ou cAMP- cyclic Adenosin Monophosphate
- AP-1- Activation Protein-1
- BCL-2- B-cell CLL/Lymphoma 2
- BID- BH3-interacting domain death agonist
- BIM- BCL-2 interacting mediator of cell death
- BLAST- Basic Local Alignment Tool
- CARE- cAMP autoregulatory elements
- **CBP-** CREB Binding Protein
- **CD3-** Cluster differentiation 3
- c-FLIP- cellular FLICE inhibitory protein
- **CRE-** cAMP Regulatory Elements
- CREB- cAMP
- **CREM-** cAMP Regulatory Element Modulator
- DD- Death Domain
- **DED-** Death Effector Domain
- FADD- FAS-Associated Death Domain
- **FLICE-** *FADD-Like Interleukin-1β-Converting Enzyme*)
- HFS- Hypotonic Fluorescent Solution
- ICER- Induced cAMP Early Repressor
- **IFN-γ-** Inferferon-gamma
- IL- Interleukin
- NCBI- National Center for Biotechnology Information

- NFAT- Nuclear Factor of Activated T cell
- NF-кB- Nucelar Factor карра В
- PAMPs- Pathogen-Associated Molecular Patterns
- **PGE<sub>2</sub>-** Prostaglandin E<sub>2</sub>
- PI3K- Phosphatidylinositol 3-kinase
- PKA- Protein kinase A
- PKB- Protein kinase B
- **PRRs-** Pattern Recognition Receptors
- qRT-PCR- quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
- RT-PCR- Polymerase Chain Reaction
- shRNA- short hairpin RNA
- TCR- T Cell Receptor
- **TGF-β-** Transforming Growth Factor-β
- TLR- Toll-Like Receptor
- **TNFα-** *Tumor* Necrosis Factor alpha
- **TNFR-** Tumor Necrosis Factor Receptor
- UCSC Genome Browser- University of California Santa Cruz

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Diferenciação das células T CD4 <sup>+</sup>
Figura 2. Cascata de sinalização da apoptose ativada após interação entre FAS-FASL 25
Figura 3. Via de produção das prostaglandinas 28
<b>Figura 4.</b> Resumo das vias de sinalização dos receptores da prostaglandina $E_2$ (EP1-EP4) 29
<b>Figura 5.</b> Esquema da ação sinérgica do AMPc e PI3K na diferenciação dos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> na subpopulação Th1
Figura 6. Representação esquemática dos genes CREM e CREB e o RNAm de icer 32
Figura 7. Representação esquemática de CREB e ICER competindo por sítios de ligação ao DNA
Figura 8. Papel do ICER na regulação da expressão de genes que respondem ao AMPc 34
Figura 9. Representação esquemática da inibição da expressão gênica por ICER através da formação de complexos com NFAT
Figura 10. Região promotora do fasl murino e humano 49
Figura 11. BLAST (blastn) do promotor do fasl humano e murino
Figura 12. Oligonucleotídeos para icer para PCR e qPCR 53
Figura 13. Curva dose-resposta para verificação da concentração ideal de PGE2 capaz de induzir a máxima expressão de icer
Figura 14. Representação gráfica das bandas visualizadas no gel de agarose 1.5% mostrado na Figura 13
Figura 15. Cinética para verificação do tempo em que ICER apresenta seu pico de expressão em células DO11.1056
Figura 16. Representação gráfica das bandas visualizadas no gel de agarose 1.5% mostrado na Figura 15
Figura 17. Curva dose-resposta para verificar a rápida expressão de ICER em 30 minutos 57
<b>Figura 18.</b> Representação gráfica das bandas visualizadas no gel de agarose 1.5% mostrado na figura 17
Figura 19. Diferentes concentrações de PGE2, entre 10-11 e 10-6 M, protegem as células DO11.10 da AICD

<b>Figura 20.</b> Diferentes concentrações de PGE <sub>2</sub> , entre 10 <sup>-8</sup> e 10 <sup>-6</sup> M, protegem as células DO11.10 da AICD
<b>Figura 21.</b> Comparação da expressão gênica de FASL e ICER em células DO11.10 tratadas com diferentes drogas por 4 h
Figura 22. Padronização da técnica de Western Blot62
<b>Figura 23.</b> Eletroforese em gel de agarose 1% da digestão dos plasmídeos pLKO clonados com shRNA para icer
Figura 24. Sequenciamento do plasmídeo pLKO clonado com shRNAs para ICER 1 e 265
Figura 25. BLAST da proteína FASL humana e murina

### LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sequência dos pares de oligonucleotídeos utilizados para realização da técnica       PCR convencional.	de 41
<b>Tabela 2.</b> Sequência dos pares de oligonucleotídeos utilizados para PCR em tempo real(qPCR) pelo método SYBR®. TA=temperatura de anelamento	42
Tabela 3. Sequências de shRNA desenhadas para silenciar especificamente ICER	43
Tabela 4. Sequência de oligonucleotídeos utilizada para sequenciar o plasmídeo pLKO	44

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	.20
1.1	Sistema imune: visão geral	.20
1.2	AICD- Activation-induced cell death	.23
1.3	Regulação da expressão de fasl	.25
1.4	Prostaglandina E <sub>2</sub>	.27
1.5	Repressor transcricional ICER	.31
2	OBJETIVO	.36
2.1	Metas específicas	.36
3	MATERIAIS E MÉTODOS	.37
3.1	Mapeamento da região promotora do fasl	.37
3.2	Células	.37
3.3	Reagentes	.38
3.4	Estimulação dos linfócitos T com anti-CD3 (indução de AICD)	.38
3.5	Ensaio de inibição da AICD pela PGE <sub>2</sub>	.38
3.6	Análise da apoptose via conteúdo de DNA (HFS-hypotonic fluorochrome	;
sol	ution)	.39
3.7	Quantificação da externalização de resíduos de fosfatidilserina	.39
3.7 3.8	Quantificação da externalização de resíduos de fosfatidilserina Análise da expressão gênica de ICER por PCR	.39 .39
3.7 3.8 3.9	Quantificação da externalização de resíduos de fosfatidilserina Análise da expressão gênica de ICER por PCR Extração de RNA	.39 .39 .40
3.7 3.8 3.9 3.1(	Quantificação da externalização de resíduos de fosfatidilserina Análise da expressão gênica de ICER por PCR Extração de RNA O Conversão de RNA para cDNA	.39 .39 .40 .40
3.7 3.8 3.9 3.1( 3.11	Quantificação da externalização de resíduos de fosfatidilserina Análise da expressão gênica de ICER por PCR Extração de RNA O Conversão de RNA para cDNA I RT-PCR	.39 .39 .40 .40 .41
3.7 3.8 3.9 3.1( 3.11 3.12	Quantificação da externalização de resíduos de fosfatidilserina Análise da expressão gênica de ICER por PCR Extração de RNA O Conversão de RNA para cDNA I RT-PCR 2 qRT-PCR – PCR em tempo real	.39 .39 .40 .40 .41 .41
3.7 3.8 3.9 3.10 3.11 3.12 3.13	Quantificação da externalização de resíduos de fosfatidilserina Análise da expressão gênica de ICER por PCR Extração de RNA O Conversão de RNA para cDNA I RT-PCR 2 qRT-PCR – PCR em tempo real 3 Clonagem	.39 .39 .40 .40 .41 .41 .42
3.7 3.8 3.9 3.10 3.11 3.12 3.12	Quantificação da externalização de resíduos de fosfatidilserina Análise da expressão gênica de ICER por PCR Extração de RNA O Conversão de RNA para cDNA I RT-PCR 2 qRT-PCR – PCR em tempo real 3 Clonagem 4 Transformação de bactérias	.39 .39 .40 .40 .41 .41 .42 .42
3.7 3.8 3.9 3.10 3.11 3.12 3.12 3.14 3.14	Quantificação da externalização de resíduos de fosfatidilserina Análise da expressão gênica de ICER por PCR Extração de RNA O Conversão de RNA para cDNA I RT-PCR 2 qRT-PCR – PCR em tempo real 3 Clonagem 4 Transformação de bactérias 5 Extação de DNA plasmidial	.39 .40 .40 .41 .41 .42 .44
3.7 3.8 3.9 3.10 3.11 3.12 3.12 3.14 3.15 3.16	Quantificação da externalização de resíduos de fosfatidilserina Análise da expressão gênica de ICER por PCR Extração de RNA O Conversão de RNA para cDNA I RT-PCR 2 qRT-PCR – PCR em tempo real 3 Clonagem 4 Transformação de bactérias 5 Extação de DNA plasmidial 5 Sequenciamento do plasmídeo pLKO	.39 .40 .40 .41 .41 .42 .44 .44
3.7 3.8 3.9 3.10 3.11 3.12 3.12 3.14 3.15 3.16 3.17	Quantificação da externalização de resíduos de fosfatidilserina     Análise da expressão gênica de ICER por PCR     Extração de RNA     O Conversão de RNA para cDNA     O Conversão de RNA para cDNA     I RT-PCR     2 qRT-PCR – PCR em tempo real     3 Clonagem     4 Transformação de bactérias     5 Extação de DNA plasmidial     6 Sequenciamento do plasmídeo pLKO     7 Extração e quantificação de proteínas	.39 .40 .40 .41 .41 .42 .44 .44 .45 .46
3.7 3.8 3.9 3.10 3.11 3.12 3.12 3.12 3.12 3.12 3.12 3.12	Quantificação da externalização de resíduos de fosfatidilserina     Análise da expressão gênica de ICER por PCR     Extração de RNA     O Conversão de RNA para cDNA     O Conversão de RNA para cDNA     I RT-PCR     2 qRT-PCR – PCR em tempo real     3 Clonagem     4 Transformação de bactérias     5 Extação de DNA plasmidial     6 Sequenciamento do plasmídeo pLKO     7 Extração e quantificação de proteínas     8 Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) e "Western-blot"	.39 .40 .40 .41 .41 .42 .44 .44 .45 .46
3.7 3.8 3.9 3.10 3.11 3.12 3.12 3.12 3.12 3.12 3.12 3.12	Quantificação da externalização de resíduos de fosfatidilserina     Análise da expressão gênica de ICER por PCR     Extração de RNA     O Conversão de RNA para cDNA     O Conversão de RNA para cDNA     I RT-PCR     2 qRT-PCR – PCR em tempo real     3 Clonagem     4 Transformação de bactérias     5 Extação de DNA plasmidial     6 Sequenciamento do plasmídeo pLKO     7 Extração e quantificação de proteínas     8 Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) e "Western-blot"     9 Análise estatística	.39 .40 .40 .41 .41 .42 .44 .45 .46 .46 .47
3.7 3.8 3.9 3.10 3.11 3.12 3.12 3.12 3.12 3.12 3.12 3.12	Quantificação da externalização de resíduos de fosfatidilserina Análise da expressão gênica de ICER por PCR Extração de RNA	.39 .40 .41 .41 .42 .44 .44 .45 .46 .46 .46 .47 .48
3.7 3.8 3.9 3.10 3.11 3.12 3.12 3.12 3.12 3.12 3.12 3.12	Quantificação da externalização de resíduos de fosfatidilserina Análise da expressão gênica de ICER por PCR Extração de RNA O Conversão de RNA para cDNA RT-PCR 2 qRT-PCR – PCR em tempo real 3 Clonagem 4 Transformação de bactérias 5 Extação de DNA plasmidial 5 Sequenciamento do plasmídeo pLKO 7 Extração e quantificação de proteínas 8 Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) e " <i>Western-blot</i> " 9 Análise estatística RESULTADOS Mapeamento da região promotora do <i>fasl</i>	.39 .40 .41 .41 .42 .44 .45 .46 .46 .46 .47 .48

4.3	Oligonucleotídeos para <i>icer</i>	.52	
4.4	Análise da expressão gênica de ICER	.54	
4.5	PGE <sub>2</sub> 10 <sup>-8</sup> M é capaz de proteger as células DO11.10 da AICD	.58	
4.6	Envolvimento de ICER na via da PGE <sub>2</sub>	.61	
4.7	Padronização da técnica de Western Blot para detecção de ICER	.62	
4.8	Clonagem de shRNA para ICER em vetor lentiviral pLKO	.63	
4.9	Sequenciamento do pLKO + shICER	.64	
5	DISCUSSÃO	.66	
6	CONCLUSÃO	.73	
REF	REFERÊNCIAS		
APÉ	APÊNDICE – Alinhamento da proteína FASL humana e murina		

#### 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 Sistema imune: visão geral

O sistema imune possui duas principais linhas de resposta a um antígeno: a imunidade inata e a imunidade adaptativa. A primeira leva a uma resposta relativamente rápida e não gera memória imunológica (1, 2), enquanto a imunidade adquirida, composta de linfócitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>), linfócitos T helper (CD4<sup>+</sup>) e linfócitos B, é capaz de gerar memória imunológica (2, 3).

Os linfócitos T CD4+ são essenciais para a defesa do hospedeiro, por participarem ativamente na resposta contra um patógeno e também por auxiliar outras células, como os linfócitos B e T CD8+, direcionando a resposta imune mais eficaz para manter a integridade do organismo (4). O reconhecimento do patógeno por células da imunidade inata faz com que sejam secretadas citocinas, as quais direcionam os linfócitos T naïve para se diferenciarem em subtipos específicos para combater o patógeno reconhecido (5, 6). Cada citocina favorece a ativação de diferentes fatores de transcrição, que tem um papel fundamental na diferenciação dos linfócitos T CD4+ em diferentes subgrupos, que são capazes de secretar diferentes citocinas (7) **(Figura 1).** Os linfócitos T naïve podem se diferenciar em linfócitos T *helper* 1 (Th1), Th2, Th17 e/ou T regulador (Treg) e são essas subpopulações de linfócitos T CD4+ que orquestram a resposta imune adaptativa (8-10).

Os linfócitos Th1 produzem, principalmente, IFN- $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ), que potencializa o poder microbicida de macrófagos para eliminação de patógenos intracelulares (vírus e algumas bactérias). O subgrupo Th2 produz, principalmente, IL (interleucina)-4 que induz a produção de anticorpos IgG1 e IgE pelos linfócitos B. A IgE se liga aos parasitas extracelulares, como os helmintos, para que sejam eliminados por eosinófilos (11, 12). Os linfócitos Th17 secretam IL-17a, IL-17f, e IL-22 e são responsáveis por mediar uma resposta rica em neutrófilos, permitindo o controle de microrganismos extracelulares (13). O TGF- $\beta$ 1 (*transforming growth factor*- $\beta$ ) promove a diferenciação de linfócitos T naïve em linfócitos Treg, que expressam Foxp3 (um fator de transcrição importante para diferenciação desta subpopulação), e secretam IL-10 e TGF- $\beta$ 1, sendo capazes de suprir a resposta de outros linfócitos T e macrófagos, prevenindo a autoimunidade (14) (Figura 1).



**Figura 1.** *Diferenciação das células T CD4*<sup>+</sup>. Subpopulações Th1, Th2, Th17 e Treg através de citocinas, mostrando o envolvimento dos diferentes fatores de transcrição na diferenciação do linfócito T CD4<sup>+</sup> (15).

Uma típica resposta imune contra um antígeno é caracterizada por várias etapas: apresentação do antígeno aos linfócitos pelas APCs (*antigen-presenting cells*), ativação e diferenciação dos linfócitos naïve em efetores e de memória, expansão clonal e, finalmente, morte celular para retorno à homeostasia. As DCs (*dendritic cells*) e macrófagos, que são APCs, podem ativar os linfócitos T CD4+, através do reconhecimento do antígeno por estas células, via TCR/MHC II (*T cells receptor/ major histocompatibility complex*) + peptídeo e coestimuladores, como o CD28/CD80-CD86 (16, 17). Para que ocorra a apresentação apropriada de um antígeno por macrófagos e DCs é necessário que estas células reconheçam moléculas específicas do patógeno, denominadas PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*), que são conservadas e invariáveis dentro de classes inteiras de patógenos (18). Esses PAMPs são reconhecidos por receptores conhecidos como PRRs (*pattern recognition receptors*) expressos nas APCs.

A família TLR (*Toll-like receptor*) é a classe melhor caracterizada dentre os PRRs, sendo capaz de detectar múltiplos PAMPs (19), incluindo lipopolissacarídeo – LPS – (detectado pelo TLR4), lipoproteínas e ácidos teicóicos de bactérias

(detectados por TLR2), flagelina (detectado por TLR5), DNA não metilado de bactérias e vírus (detectado por TLR9), dupla fita de RNA (detectado por TLR3) e fita simples de RNA viral (detectado por TLR7) (20, 21)

Após o pico de resposta celular, a maioria dos linfócitos antígeno-específicos é eliminada para manter a homeostase da população linfocitária, fase denominada de contração clonal. No entanto, um pequeno número de linfócitos antígenoespecíficos sobrevive, formando um pool de linfócitos de memória (22). A eliminação das células durante a fase terminal da resposta imune ocorre por apoptose, destacando-se dois mecanismos: morte celular induzida por ativação (AICD *activation-induced cell death*) e morte autônoma de células T ativadas (ACAD *activated T cell autonomous death*). Essa etapa é de extrema importância para que não ocorra o acúmulo de linfócitos T ativados, predispondo a quebra da tolerância do organismo e o aparecimento de desordens autoimunes (23).

A ACAD ocorre a partir de um linfócito T ativado, quando há uma diminuição no aporte de citocinas no meio. Pode ser caracterizada como uma "morte celular passiva", uma vez que a falta de estímulo leva à ativação de BIM, um membro pró-apoptótico da família BCL-2 (24). Além disto, no pico de ativação dos linfócitos T, os níveis de BCL-2 (proteína anti-apoptótica) dentro dessas células ativadas estão diminuídos, quando comparados com os níveis de células em repouso. Neste ambiente, o aumento da expressão e ativação de BIM faz com que a membrana da mitocôndria perca integridade, liberando citocromo c e culminando na apoptose pela via intrínseca (25, 26).

Já a AICD requer receptores de morte, dentre os quais o FAS (APO-1/CD95) é o mais extensivamente caracterizado e provavelmente o mais importante para este fenômeno (27). FAS é uma proteína de membrana com 45 kDa e é um importante membro da superfamília de receptores TNFR (*tumor necrosis factor receptor*) que induzem apoptose (28). Esta superfamília é caracterizada pela sequência de duas a cinco repetições ricas em cisteína. Os receptores de morte contêm um domínio de morte (DD - *death domain*) intracelular, que é essencial para a transdução do sinal apoptótico. Outros receptores de morte, membros da superfamília do TNFR, são: TNF-R1 (CD120a), DR3, TNF-*related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL)-R1, TRAIL-R2 e DR6 (29).

A proteína FAS é expressa, constitutivamente, em vários tipos celulares, enquanto que FASL, uma proteína transmembrana de 40 kDa, classificada como

proteína do tipo II da família dos ligantes de TNF-α (30), é comumente induzida, principalmente, em linhagens celulares definidas, como os linfócitos T ativados, células natural killer (NK) e células tumorais. Sendo assim, a indução da apoptose pela ligação entre FAS e FASL, está envolvida em muitos processos, incluindo homeostase de tecidos, citotoxicidade mediada por células T, regulação negativa do sistema imune por deleção de clones autoreativos em órgãos linfóides, entre outros (31).

#### 1.2 AICD- Activation-induced cell death

A morte celular induzida por ativação ou AICD resulta da interação entre o receptor FAS e o seu ligante, FASL, principalmente. O termo AICD foi proposto em 1989 quando o grupo coordenado pelo Dr. Green demonstrou que hibridomas de linfócitos T ou timócitos morriam quando suas moléculas CD3 eram ativadas (32). No entanto, estudos já mostraram que linfócitos T humanos primários ativados são resistentes à apoptose mediada por FAS e, portanto, não sofrem AICD. Mas essa resistência ocorre em fases iniciais da resposta imune a um antígeno, pois foi verificado que na fase final os linfócitos T são sensíveis à apoptose mediada por FAS. Isso sugere que há uma modulação na cascata de sinalização do FAS durante os períodos em cultura (33).

A AICD é a forma de apoptose induzida nos linfócitos T periféricos quando sofrem repetidas estimulações via TCR/CD3, sendo, este tipo de morte, um dos responsáveis pela manutenção da tolerância periférica (34). Exemplo disto é o acúmulo pronunciado de linfócitos no organismo, culminando com 0 desenvolvimento de doenças autoimunes, tanto em camundongos quanto em humanos, devido a defeitos na expressão de FAS ou de seu ligante, FASL (22). Em seres humanos, a síndrome linfoproliferativa autoimune (ALPS) é uma doença genética causada por um defeito, comumente, relacionado ao receptor FAS, que gera linfoadenomegalia e esplenomegalia com frequente desenvolvimento de doenças autoimunes, principalmente com a produção de auto-anticorpos (35). Em camundongos com defeitos no receptor FAS (*lpr*) ou no seu ligante (gld) também se observa esplenomegalia, linfoadenopatia e alta produção de auto-anticorpos (36).

As repetidas estimulações dos linfócitos T via TCR/CD3, que levam à AICD, causam um aumento da citocina IL-2 e diminuição de c-FLIP (*cellular FLICE-like* 

*inhibitory protein*). Esta é uma proteína antiapoptótica presente em altas concentrações em linfócitos T naïve e que em baixas concentrações deixa a célula vulnerável à apoptose (37), pois c-FLIP é capaz de competir com a pró-caspase-8 e a pró-caspase-10 na ligação com a proteína adaptadora FADD (*FAS-associated death domain*).

Após estimulação do FAS pelo FASL, ocorre o recrutamento de FADD, que interage com o receptor FAS através do domínio de morte DD, comum a essas duas moléculas. FADD é uma proteína citosólica que possui um DD e um DED, específicos para proteínas que regulam a morte celular programada, sendo que o DED desta molécula é capaz de se ligar tanto ao c-FLIP (quando este está presente em altas concentrações na célula), quanto em moléculas pró-apoptóticas que possuem DED, como a pro-caspase-8 (38, 39). Sendo assim, FADD é capaz de recrutar pro-caspase-8, também chamada de FLICE (FAS-associated death domain*like interleukin-1β-converting enzyme*), formando, então, um complexo de sinalização denominado DISC (death-inducing signaling complex). Este complexo é capaz de se ligar a várias moléculas de pró-caspase-8 e ativá-las. A caspase-8 ativa é liberada no citosol e é capaz de ativar caspases efetoras terminais, -3, -6 e -7 (40, 41), e induzir apoptose. A caspase-8 ativa também pode clivar BID), uma molécula pró-apoptótica da família Bcl-2, e amplificar a sinalização de morte para a via mitocondrial (42) (Figura 2).



**Figura 2.** Cascata de sinalização da apoptose ativada após interação entre FAS-FASL. Representação esquemática, tanto da via intrínseca, quanto da via extrínseca da apoptose. Sendo que a via extrínseca ocorre pela interação FAS-FASL. Neste esquema observa-se a amplificação da cascata da via extrínseca para a via mitocondrial através da clivagem de BID (41).

#### 1.3 Regulação da expressão de fasl

O gene *fasl* e seu promotor foram alvos de muitos estudos, e vários sítios de ligação consenso para diferentes fatores de transcrição foram descritos no promotor deste gene. Alguns dos principais fatores de transcrição capazes de interagir com a região promotora do gene *fasl* são: NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), AP-1 (*activator protein-1*) e NF-κB (*nuclear factor kappa* B) (43).

O NFAT é um fator de transcrição que pode ser ativado pela estimulação do complexo TCR/CD3. Este fator não regula apenas a ativação e diferenciação de linfócitos T (44, 45), mas age também em DCs, linfócitos B e megacariócitos (46, 47). NFAT e AP-1 são os dois principais fatores de transcrição capazes de induzir a expressão de IL-2, e consequente proliferação, em linfócitos por se ligarem a regiões específicas no promotor deste gene (48, 49). A desfosforilação do NFAT e posterior

translocação para o núcleo pode ser inibida através do uso de ciclosporina A (CsA), uma droga imunossupressora usada para evitar rejeição após transplante (50). Além disso, estudos mostraram que camundongos deficientes em NFAT1 e NFAT4 apresentaram um aumento linfoproliferativo, diminuição da AICD e expressão comprometida do *fasl* (51, 52).

Nosso grupo de pesquisa também evidenciou que o NFAT está envolvido com a expressão do *fasl*, através do hormônio melatonina. Este estudo mostra que a melatonina inibe a desfosforilação do NFAT (forma ativa) induzida pela estimulação do TCR/CD3, interferindo na sua translocação para o núcleo e, impedindo, dessa forma, a transcrição do *fasl*. Sendo assim, a célula fica protegida da morte por AICD (53). Além disso, estudos mostram que a indução de *fasl* por NFAT requer a cooperação de AP-1 (Fos/Jun), outro fator de transcrição importante na expressão desse gene (54).

O fator de transcrição AP-1 é composto de heterodímeros e homodímeros das subfamílias de proteínas Fos, Jun, Maf e ATF (55) e pode ser ativado por citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas e hormônios (56). Este fator de transcrição está envolvido em muitos processos biológicos, como proliferação, diferenciação e transformação celular, além de ter um papel importante na regulação de processos inflamatórios (57). Em relação à cooperação do AP-1 com NFAT, muitos são os trabalhos que descrevem sítios compostos de NFAT/AP-1 como sendo importantes para a ativação da transcrição de genes, como *il-2, ifn-γ, fasl e il-8* (54, 58, 59)

Outro fator importante na expressão do *fasl* é o NF- $\kappa$ B. Este fator de transcrição pertence à família Rel/NF- $\kappa$ B, que são capazes de regular o sistema imune, controlando tanto a imunidade inata quanto a adaptativa. Induzem a expressão de genes inflamatórios, bem como o desenvolvimento e sobrevivência dos linfócitos (60). A atividade do NF- $\kappa$ B é regulada por proteínas inibidoras que pertencem à família de inibidores do  $\kappa$ B (I $\kappa$ B). Estes sequestram os dímeros de NF- $\kappa$ B do citoplasma de células não ativadas. Porém, após várias estimulações celulares, os I $\kappa$ Bs são fosforilados e rapidamente degradados pelo proteassoma, liberando, então, o NF- $\kappa$ B ativo que é translocado para o núcleo e pode induzir a expressão do *fasl* (61).

Além dos fatores de transcrição que regulam positivamente a expressão gênica, existem também os que a inibem, como é o caso do repressor transcricional, descrito em 1993, ICER (*inducible cAMP early repressor*) (62). Esse repressor

pertence, junto com CREB (*cAMP response element binding protein*) (63) e CREM (*cAMP response element modulator*) (64), à família de fatores transcricionais que possuem o domínio bZIP (*Basic Leucine Zipper Domain*) (65). Ele age como um regulador negativo dominante da via de transdução de sinal da PKA dependente de AMPc (62).

#### **1.4** Prostaglandina E<sub>2</sub>

As prostaglandinas (PGs) são moléculas lipídicas capazes de regular diversos processos no organismo, como função renal, liberação de neurotransmissores, agregação plaquetária e modulação do sistema imunológico (66, 67). A produção de prostaglandinas tem seu início com a liberação do ácido araquidônico, pela ação da fosfolipase A<sub>2</sub> sobre os fosfolipídeos de membrana, em resposta a estímulos inflamatórios. O ácido araquidônico é convertido à PGH<sub>2</sub> por meio da ação enzimática das ciclooxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) (**Figura 3**). Normalmente, a COX-1 tem sua expressão constitutiva em muitos tecidos e sua ação está relacionada com a manutenção da homeostasia, como a secreção de muco. Ao contrário, a COX-2 é induzida por estímulos inflamatórios, tendo papel na regulação da inflamação (68).

A posterior conversão da PGH<sub>2</sub> em diferentes tipos de PGs é feita através de prostaglandinas sintases, que são células-específicas, mas que também podem ser induzidas por estímulos pró-inflamatórios (69). Após a produção, as PGs são rapidamente liberadas das células e agem perto do seu local de produção por ligação específica e de alta afinidade com os seus receptores na membrana das células (70) **(Figura 3).** 



**Figura 3.** *Via de produção das prostaglandinas.* Através da fosfolipase A2, os fosfolipídeos de membrana são convertidos a ácido araquidônico e sofrem ação das enzimas ciclooxigenases 1 e 2, dando origem à PGH2. Esta prostaglandina sofre ação de diferentes prostaglandina sintases e dá origem a diversos tipos de PGs, como a PGE<sub>2</sub>. Adaptado de (71).

A PGE<sub>2</sub> é o prostanóide mais comum e a PG mais bem conhecida e estudada (71). Ela é produzida por uma grande variedade de células, incluindo fibroblastos, macrófagos e DCs, e controla muitos eventos fisiológicos, como inflamação, febre e dor. Ela é capaz de se ligar à quatro receptores (EP1-EP4) acoplados à proteína G (72), cada um deles codificados por genes diferentes (73).

Enquanto os receptores EP1, acoplados à proteína Gq, causam elevação dos níveis de cálcio intracelular e os EP3, acoplados à proteína Gi, possuem ação inibitória, diminuindo os níveis de AMPc (73, 74), os receptores EP2 e EP4 estão acoplados à proteína Gs e ativam a adenilato ciclase que, consequentemente, aumenta os níveis de AMPc intracelular. A diferença entre esses receptores se dá pelo fato que EP2, após o aumento dos níveis de AMPc, é capaz de ativar a PKA, enquanto o EP4, além de ativar PKA via AMPc, também ativa a via PI3K-PKB (*Phosphatidylinositol 3-kinase/Protein kinase B*) (59, 75, 76) (Figura 4).



**Figura 4.** Resumo das vias de sinalização dos receptores da prostaglandina  $E_2$  (EP1-EP4). O receptor EP1 está acoplado à proteína Gq e aumenta os níveis de cálcio dentro da célula; EP2 e EP4 ativam a adenilato ciclase e aumentam os níveis de AMPc intracelular, o qual ativa PKA, culminando com a ativação de CREB. O EP4 também ativa PI3K, capaz de bloquear parcialmente a PKA e ativar PKB, culminando, também, com ativação de CREB; EP3 está acoplado à uma proteína G inibitória capaz de diminuir os níveis de AMPc no interior da célula. Adaptado de (71, 76).

Muitos são os trabalhos que sugerem que a PGE<sub>2</sub>, ao se ligar à EP2 e EP4, tenha um efeito inibitório no sistema imune por aumentar os níveis de AMPc intracelular e ativar a PKA (77, 78). Neste sentido, a PKA agiria suprimindo a sinalização via TCR, por interferir na proteína Lck (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*), uma tirosina-quinase capaz de fosforilar alvos citoplasmáticos e transduzir o sinal de ativação do TCR. Sendo assim, os linfócitos T ficariam não-responsivos. No entanto, recentemente foi demonstrado que a PGE<sub>2</sub>, via EP2 e EP4, é capaz de contribuir para que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> se diferenciem para a subpopulação Th1, pois o receptor EP4, principalmente, é capaz de aumentar os níveis de AMPc, mas também de PI3K, capaz de bloquear a ação da PKA sobre a Lck, fazendo com que a célula permaneça ativada (75).

A PI3K é uma enzima capaz atuar na proliferação e sobrevivência dos linfócitos T CD4+, assim como na sua diferenciação e função. Ela atua através da fosforilação de PIP2 (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*), gerando PIP3 (*phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate*), que é capaz, então, de recrutar PDK1 (*3-phosphoinositide dependent protein kinase-1*), que fosforila e ativa Akt/PKB (79, 80).

Juntamente à ativação antigênica do TCR e ativação do receptor EP4 pela PGE<sub>2</sub>, é de crucial importância, para que a ação da PKA seja, parcialmente, inibida, que ocorra a estimulação do CD28 (um coestimulador), o qual também aumenta os níveis de PI3K (REF). Isso porque, para dar continuidade à resposta imune, os linfócitos precisam reconhecer um antígeno, via TCR, e receber um sinal de coestimulação (via CD28). Sendo assim, num contexto de ativação de linfócitos T, via TCR/CD3, juntamente à coestimulação desses linfócitos, via CD28, na presença de PGE<sub>2</sub> estas células apresentariam um perfil Th1 (75) **(Figura 5).** 



**Figura 5.** Esquema da ação sinérgica do AMPc e PI3K na diferenciação dos linfócitos T CD4+ na subpopulação Th1. Após ativação do TCR, na presença de coestimulação, via CD28, e de PGE<sub>2</sub>, via EP2 e EP4, há um aumento dos níveis de AMPc, com ativação da PKA. No entanto, há também o aumento dos níveis de PI3K, que impede que a PKA iniba a ativação celular, Isso culmina com a ativação de CREB e a produção de citocinas e de receptores para citocinas do perfil Th1. Adaptado de (75).

Resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa demonstraram que a prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), liberada por células dendríticas e macrófagos em resposta à agonistas do TLR4, é capaz de exercer um efeito negativo sobre a

indução de fasl dependente da estimulação via complexo TCR/CD3. Consequentemente, a PGE<sub>2</sub> apresenta um efeito protetor para a AICD nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (81). O efeito da PGE<sub>2</sub> é mediado pela ação sinérgica dos receptores EP2 e EP4 (acoplados à proteína Gs), através da ativação da adenilato ciclase, que converte ATP em AMPc, aumentando os níveis desse segundo mensageiro no interior da célula, o que leva à ativação da proteina quinase A (PKA). Além disso, também foi visto, que todos os receptores EPs, exceto o EP1, estão presentes na membrana dos hibridomas de linfócitos T murinos DO11.10, mas apenas os receptores EP2 e EP4 estão envolvidos na sinalização da proteção dessas células à morte por AICD. Isso porque, essa proteção é conferida pelo aumento dos níveis de AMPc intracelular e o EP3 causa diminuição desse mensageiro via proteína Gi (81).

Como mencionado, o aumento de AMPc, via EP2 e EP4, culmina na ativação da PKA. Esta é uma haloenzima composta por duas subunidades catalíticas (C) que se mantêm inativas pela associação com um dímero da subunidade regulatória (R) (82). É o principal mediador da sinalização do AMPc e sua ligação com este faz com que suas subunidades R liberem as subunidades C (83). Isso permite a fosforilação de alvos citoplasmáticos, como as proteínas CREB, CREM e ATF-1 (*activation transcription factor-1*), resultando na ativação da transcrição de genes que contém o elemento responsivo ao AMPc (CRE- *cAMP - responsive elements*) (83-85).

A atividade transcricional de CREB e CREM é regulada pela fosforilação da Ser133 (serina 133) e Ser117 (serina 117), respectivamente, o que permite a formação do complexo com o coativador CBP (*CREB binding protein*), que é um cofator não apenas de CREB, mas de outros fatores de transcrição (86-88), e a ligação aos sítios CRE nos promotores de determinados genes (89, 90).

#### 1.5 Repressor transcricional ICER

O repressor transcricional ICER, primeiramente descrito no eixo hipotálamohipófise-gônadas, é um rearranjo variante do gene CREM e tem se mostrado de particular importância na regulação negativa da transcrição de genes mediada por sítios CRE presentes nos promotores destes genes (62). Posteriormente, sua expressão foi verificada no sistema imune, no qual é proposta a ação de inibição da proliferação dos linfócitos T e de suas funções efetoras. Além disso, é descrito que a indução de ICER pelo tratamento com agentes que elevam o AMPc, como a forskolina, suprime a responsividade das células T (77, 91) por reprimir a expressão de genes alvos, como a *il-2* (62, 91, 92).

ICER é proveniente de uma quebra em uma região importante da extensão do gene *crem*. Ou seja, *icer* é expresso quando um promotor alternativo (P2), de *crem* é ativado. Este P2 está localizado no meio do gene *crem*, em uma região intrônica **(Figura 6).** Após a transcrição de *icer*, seu RNAm sofre um *splicing* alternativo, que é o processo pelo qual os éxons são unidos, formando um novo rearranjo, com um RNAm distinto e formação de uma nova proteína ((93)). O *splicing* alternativo do transcrito de *icer* resulta em quatro diferentes isoformas: ICER I, ICER Iγ, ICER II e ICER IIγ ((94). A isoforma I do ICER contém DBD (*DNA-binding* domain) I, enquanto o ICER II contém DBD II. As duas isoformas γ (ICER Iγ e ICER IIγ) não possuem este éxon, enquanto ICER I e II o possuem. O RNAm de *icer* I contém sequências que codificam ambos DBD, I e II, mas o códon de parada que se localiza no terminal carboxil do DBD I impede a inserção do DBD II na proteína.



**Figura 6.** Representação esquemática dos genes CREM e CREB e o RNAm de icer. Representação esquemática dos genes CREM e CREB e o RNAm do ICER, com suas quatro isoformas após *splicing* alternativo (96).

Nenhuma isoforma de ICER apresenta o domínio de transativação, presente nas isoformas de CREM e também em CREB (62). Esse domínio é o responsável pelo recrutamento do coativador CBP/p300, fazendo com que a maquinaria de transcrição seja ativada e, assim, genes sejam expressos. Devido à carência desse domínio, ICER não é capaz de recrutar o CBP/p300 e, consequentemente, não ativa a maquinaria de transcrição, fazendo com que ocorra a inibição da transcrição gênica (95) (Figura 7).



**Figura 7.** Representação esquemática de CREB e ICER competindo por sítios de ligação ao DNA. CREB possui domínios de transativação e recruta CBP para que a transcrição ocorra, enquanto ICER não possui estes sítios e não se liga a CBP, impedindo a transcrição de genes alvos. Adaptado de (96).

Embora ICER tenha uma função diferente de CREM e CREB, eles possuem grande homologia gênica entre si e são capazes de se ligar à sítios CRE no promotor dos genes e competir por eles (REF). O sítio CRE clássico possui um motivo consenso palindrômico (TGACGTCA) (64), mas ICER é capaz de se ligar a uma variedade de sítios CRE (REF).

Após o aumento do AMPc no interior da célula, este é capaz de ativar a PKA, que, por sua vez, fosforila proteínas-alvo, como CREB. Este fator de transcrição fosforilado é capaz de se ligar à sítios CRE, induzindo a transcrição gênica de ICER e de outros fatores responsivos ao AMPc. O promotor P2 possui diversos sítios CRE de ligação, denominados CARE (*cAMP autoregulatory elements*) possibilitando a rápida indução de *icer* (62). Após a tradução de *icer*, ele é capaz de competir com CREB por sítios CRE no promotor dos genes, inibindo a transcrição destes, incluindo a sua própria transcrição. Portanto, *icer* possui uma autorregulação negativa por ser capaz de se ligar no seu próprio promotor e inibir sua transcrição (62, 77) **(Figura 8).** 



**Figura 8.** Papel do ICER na regulação da expressão de genes que respondem ao AMPc. Após a PGE<sub>2</sub> se ligar nos receptores EP2 e EP4, ocorre a ativação da adenilato ciclase, que é capaz de converter ATP em AMPc. Com o aumento deste no interior da célula, há ativação da PKA, capaz de fosforilar proteínas ativadoras (Ativador) que promovem a transcrição de genes que respondem ao AMPc, como *icer*. Esses ativadores se ligam aos CAREs no promotor P2 de *crem* e transcrevem *icer*. ICER proteína é capaz de regular negativamente esses genes de resposta ao AMPc, incluindo sua própria transcrição (*feedback* negativo). Adaptado de (62).

Muitos são os trabalhos que demonstram a função repressora de ICER sobre diversos genes, através da ligação deste a sítios CRE clássicos e não-clássicos. Além disso, já foi demonstrado que ICER é capaz de se ligar, sozinho ou complexado ao NFAT, em sítios compostos para NFAT/AP-1, e, assim, inibir a transcrição gênica (58, 59, 96) **(Figura 9).** 



**Figura 9.** Representação esquemática da inibição da expressão gênica por ICER através da formação de complexos com NFAT. ICER é capaz de se ligar a sítios compostos para NFAT/AP-1 e inibir a transcrição de genes dependentes destes fatores. Ao contrário, CREB é capaz de se complexar com NFAT e favorecer a transcrição gênica. Adaptado de (96).

Sendo assim, o efeito negativo sobre a indução de *fasl* pela PGE<sub>2</sub>, verificado por nosso grupo de pesquisa, pode ocorrer devido à ação inibitória de ICER. Isto porque, Bodor e colaboradores verificaram que esse repressor transcricional é induzido por forskolina, um agonista do AMPc capaz de aumentar muito os níveis deste segundo mensageiro no interior da célula, e pode inibir a expressão de *fasl* em linfócitos T e também em células NKT após tratamento com este agonista (77).
Investigar o envolvimento de ICER (*inducible cAMP early repressor*) no efeito inibidor da PGE<sub>2</sub> sobre a expressão de *fasl* induzida pelo estímulo do complexo TCR/CD3.

# 2.1 Metas específicas

- Mapear, por bioinformática, os promotores do *fasl* murino e humano e os possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição nessas regiões promotoras;
- Verificar o efeito da PGE<sub>2</sub> sobre FASL e ICER por RT-PCR, qRT-PCR e Western blot.
- Clonar sequências específicas de shRNA para *icer* em vetor lentiviral pLKO.
- Construir células DO11.10 "knock-down" para icer utilizando vetores lentivirais carregando sequências de shRNA específicas e verificar por RT-PCR, qRT-PCR e Western blot o efeito sobre a regulação de FASL pela PGE<sub>2</sub>.

#### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 3.1 Mapeamento da região promotora do *fasl*

O mapeamento do promotor do gene do *fasl* foi feito através da plataforma UCSC GENOME BIOINFORMATICS (http://genome.ucsc.edu/), com o auxílio do site do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) e, através do programa MacVector 12.5.1 (Cary, CN, EUA), obtivemos os sítios de ligação dos fatores de transcrição envolvidos na expressão do *fasl*.

#### 3.2 Células

O hibridoma DO11.10 foi derivado de linfócitos T CD4<sup>+</sup> extraídos de camundongos Balb/c cujo TcR transgênico reconhece um peptídeo da ovalbumina (DO11.10)10Loh e fundidos com células BW5147 TCR $\beta$ -/- (97, 98). Este hibridoma foi originalmente cedido pelo Dr. Douglas Green (La Jolla Institute for Allergy & Immunology, San Diego, CA).

Como controle positivo da expressão proteica de CREM, foi utilizada a linhagem celular Jurkat, estabelecida a partir de linfócitos T humanos de sangue periférico de um garoto com leucemia linfoblástica aguda. Esta célula expressa o complexo TCR/CD3 e foi obtida da ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA, EUA). Para a produção de lentivírus foram utilizadas células HEK-293 (*Human embrionic kidney*). Esta linhagem foi gerada pela transformação de células do rim de um embrião humano com uma parte do DNA de adenovírus e foi descrita pela primeira vez em 1977, por Frank Graham. Essas células foram originalmente cedidas pelo Dr. Douglas Green (La Jolla Institute for Allergy & Immunology, San Diego, CA).

# 3.3 Reagentes

Os reagentes utilizados para cultura de células, reações de PCR convencional e qPCR, extração de RNA e conversão para cDNA, bem como os oligonucleotídeos foram adquiridos da Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). O anticorpo anti-CD3 (clone 2C11), derivado do hibridoma denominado 145-2C11 (99) foi produzido e purificado em nosso laboratório.

As drogas adicionadas à cultura de DO11.10 para verificar a expressão gênica de ICER e FASL foram:  $PGE_2$  adquirida da Cayman Chemicals Co. (Ann Arbor, MI, EUA), diluída em etanol numa concentração estoque de  $10^{-2}$  M, melatonina, em solução estoque de 215 mM em etanol, genisteína em solução estoque de 25 µg/mL em DMSO e actinomicina D em solução estoque de 1mg/mL em DMSO, todos adquiridos da Sigma Chemical Ca (St. Louis, MO, EUA).

#### 3.4 Estimulação dos linfócitos T com anti-CD3 (indução de AICD)

Para expor as células ao anticorpo anti-CD3 foi necessário, primeiramente, imobilizá-lo na placa de cultura. Para tanto, o anticorpo foi diluído em tampão Tris 50 mM pH 9,0 na concentração de 1  $\mu$ g/mL; 100  $\mu$ L desta solução foram plaqueados em cada poço de uma placa de 96 poços com fundo reto. A placa foi incubada em estufa à 37 °C por 2 h e, em seguida, o tampão foi removido da placa. Após este procedimento, 2x10<sup>5</sup> células DO11.10 foram plaqueadas num volume final de 100  $\mu$ L e incubados a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> pelo período desejado (18 h).

# 3.5 Ensaio de inibição da AICD pela PGE<sub>2</sub>

2x10<sup>5</sup> células foram adicionadas em placas de 96 poços sensibilizadas ou não (controle) com anticorpo anti-CD3, na presença ou não (controle) de PGE<sub>2</sub> sintética, com concentrações de 10<sup>-8</sup> a 10<sup>-6</sup> M, por 18 h e a análise da morte foi feita por citometria de fluxo por incorporação de iodeto de propídeo (PI) em tampão HFS (*hypotonic fluorescent solution*). Os ensaios foram feitos em triplicata. Após o período de incubação desejado, as células foram analisadas pelo método, descrito no tópico abaixo.

Da mesma forma, realizamos o mesmo experimento, diferindo apenas o tratamento dado às células DO11.10:  $PGE_2$  sintética, melatonina, genisteína e actinomicina D com concentrações de 10<sup>-8</sup> M, 1mM, 10 µg/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL, respectivamente.

# 3.6 Análise da apoptose via conteúdo de DNA (HFS-*hypotonic fluorochrome solution*)

As amostras de interesse foram centrifugadas a 240 *xg* por 5 min a 4 °C e ressuspendidas em 300 µL de tampão hipotônico HFS contendo 0,1% de Triton X-100, 0,1% de citrato de sódio e 50 µg/mL de PI. A aquisição dos eventos foi feita através de citometria de fluxo (FACScalibur-BD Bioscience). A análise foi realizada por meio do *software FlowJo* (*Three Star*), na qual foram considerados eventos apoptóticos os núcleos hipodiplóides, que se localizaram a esquerda do pico G0/G1 (pico contendo o maior número de células/eventos).

# 3.7 Quantificação da externalização de resíduos de fosfatidilserina

Para fazer a marcação com Anexina V-FITC, as células foram centrifugadas a *300 xg* por 10 min e lavadas uma vez em tampão de ligação (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub> e 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>). Em seguida,  $2x10^5$  células foram incubadas com 2 µg/mL de anexina V-FITC em 100 µL de tampão de ligação por 30 min no escuro à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados às células 200 µL de tampão de ligação e as mesmas foram analisadas por citometria de fluxo.

# 3.8 Análise da expressão gênica de ICER por PCR

Seguiu-se os protocolos citados anteriormente, porém, foi utilizada uma placa de 24 poços onde foram adicionados 500 µL da solução contendo anticorpo anti-CD3 para que fossem imobilizados (2 h na estufa à 37 °C) e a quantidade de célula adicionada também foi maior, 2x10<sup>6</sup> células (DO11.10) por poço.

 $2x10^{6}$  células foram adicionadas em placa de 24 poços sensibilizadas ou não (controle) com anti-CD3, na presença ou não (controle) de PGE<sub>2</sub> sintética (10<sup>-8</sup> M), melatonina (1 mM), genisteína (10 µg/mL) e actinomicina D (10 µg/mL), por 4 h

(tempo em que o *fasl* é expresso) em estufa à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse tempo de incubação foram extraídos RNA das células e feita a conversão para cDNA para posterior realização da RT e qRT-PCR.

# 3.9 Extração de RNA

 $2x10^{6}$  células foram transferidas para um tubo de 1,5 mL e centrifugadas a *300 xg* por 5 min. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 0,5 mL de Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) homogeneizando o conteúdo com a pipeta. Após 5 min de incubação em temperatura ambiente, adicionou-se 0,1 mL de clorofórmio seguida de nova incubação por 3 min. Centrifugou-se a 12.000 xg por 15 min a 4 °C e a parte aquosa foi transferida para um novo tubo. Foi, então, adicionado 250 µL de isopropanol seguido por uma incubação à temperatura ambiente de 15 min. Centrifugou-se novamente (12.000 xg por 15 min) e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 1 mL de etanol 75% gelado e posteriormente centrifugou-se a *7500 xg* por 5 min à 4 °C. Secou-se o precipitado e ressuspendeu-se em 30 µL de água destilada, livre de RNAse e DNAse. A quantificação foi feita utilizando-se o equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) com comprimento de onda de 260/280 nm.

#### 3.10 Conversão de RNA para cDNA

1-3 µg de RNA foi diluído em 12 µL de água livre de RNAses e colocado em tubos de 0,5 mL. Foi adicionado 1,0 µL de 500 µg/mL de oligo dT e 1,0 µL de dNTPs 10 mM, seguido de aquecimento a 70°C por 10 min e rápido resfriamento em gelo. Acrescentou-se 6 µL do seguinte MIX: 4 µL de Tampão 5 X; 1 µL de DTT 0,1 M e 1,0 µL Superscript R/T II 200 U/µL) e incubou-se a 50 °C por 60 min. A enzima foi inativada incubando-se a 70 °C por 15 min.

#### 3.11 RT-PCR

Cada reação foi composta por 5  $\mu$ L de tampão 10X, 1  $\mu$ L de 10 mM dNTPs, 1,5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ L de cada oligonucleotídeo (15 pmoles/ $\mu$ L), 0,5  $\mu$ L de Taq DNA polimerase e 10-80 ng de cDNA (amostra), em um volume final de 50  $\mu$ L. O ciclo básico de amplificação utilizado foi: 95 °C/300 s + N(95 °C/45 s, TA/60 s, 72 °C/45 s) + 72 °C/120 s, sendo N o número de ciclos e TA a temperatura de anelamento estimada para cada par de oligonucleotídeos. As amostras foram armazenadas a -20 °C.

Os pares de oligonucleotídeos utilizados, assim como o tamanho esperado para os produtos de PCR, para a amplificação dos genes de interesse estão discriminados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Sequência dos pares de oligonucleotídeos utilizados para realização datécnica de PCR convencional.

Fragmento	Pares	Oligo Forward	Oligo Reverse		
Gênico	de				
	base				
β-Actina	349	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'	5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG -3'		
FASL	471	5'-CAGCAGTGCCACTTCATCTTGG-3'	5'- TTCACTCCAGAGATCAGAGCGG -3'		
ICER	724-760	5'-ATGGCTGTAACTGGAGATGAAACT-3'	5'- CTAATCTGTTTTGGGAGAGCAAATGTC -3'		

#### 3.12 qRT-PCR – PCR em tempo real

-SYBR Green: padronização dos oligonucleotídeos para icer, fasl e hprt.

As reações de padronização dos oligonucleotídeos para *icer* (600 nM) e *hprt* (200 nM) e *fasl* (400nM) para PCR em tempo real foram realizadas em duplicata para a monitoração contínua da fluorescência do SYBR Green® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) utilizando o Mx3000P QPCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). Para a padronização das reações, as concentrações de cDNA e de iniciadores, utilizadas nos experimentos de PCR em tempo real, foram padronizadas de modo a se obter o menor CT (cycle threshold) possível, em um

volume final de 12,5 µL de reação (80 ng cDNA, 2,5 µL de iniciadores e 6,25 µL de master mix, SYBR® Green PCR Master, por 15 min a 95 °C e 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 20 min TA °C e 30 min a 70 °C, seguido do protocolo de desnaturação térmica.

**Tabela 2.** Sequência dos pares de oligonucleotídeos utilizados para PCR em tempo real (qPCR) pelo método SYBR®. TA=temperatura de anelamento.

Fragmento	ТА	Oligo Forward	Oligo Reverse
Gênico			
HPRT	60°C	5'-GGGAAGCCCATCACCATC-3'	5'-GCACCGGCCTCACCC -3'
ICER	60°C	5'- TGGCTGTAACTGGAGATGAAAC -3'	5'- CACCTTGTGGCAAAGCAGTA -3'
FASL	60°C	5'-AACCCCAGTACACCCTCTGAAA-3'	5'-GGTTCCATATGTGTCTTCCCATTC-3'

# 3.13 Clonagem

O plasmídeo pLKO.1 - *TRC cloning vector* foi adquirido da empresa *Addgene* (Cambridge, MA, USA) e o processo de clonagem foi feito segundo o protocolo da empresa (*http://www.addgene.org/tools/protocols/plko/#A*).

Os shRNA para ICER foram desenhados e adquiridos da empresa IDT-Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA), juntamente com o oligonucleotídeo para sequenciá-los.

# Mapa do plasmídeo



Tabela 3. Sequências de shRNA	desenhadas	para silenciar e	especificamente icer
-------------------------------	------------	------------------	----------------------

Sequência de shRNA para ICER	Forward	Reverse
shICER 1	5'- CCGGAACATGGCTGTAACTGGAGATCTCGA GATCTCCAGTTACAGCCATGTTTTTTG-3'	5'- AATTCAAAAAAACATGGCTGTAACTGGAGA TCTCGAGATCTCCAGTTACAGCCATGTT-3'
shICER 2	5'- CCGGGAAGCCCAACATGGCTGTAACTCTCG AGAGTTACAGCCATGTTGGGCTTTTTTG-3'	5'- AATTCAAAAAAAGCCCAACATGGCTGTAAC TCTCGAGAGTTACAGCCATGTTGGGCT-3'

**Tabela 4.** Sequência de oligonucleotídeos utilizada para sequenciar o plasmídeo pLKO.

Oligo para sequenciar o pLKO	5'-GAC TAT CAT ATG CTT ACC GT-3'		

#### 3.14 Transformação de bactérias

As bactérias foram transformadas pelo método de choque térmico. Os plasmídeos (shRNA-ICER) foram adicionados a 50 µL de bactérias competentes, em gelo por 30 min. Em seguida, os tubos foram incubados a 42 °C por 1 min e 30 s e rapidamente transferidos para gelo, incubando-se por mais 5 min. Adicionou-se na sequência, 450 mL de meio LB e as bactérias foram incubadas por 1 h à 37 °C sob agitação constante para expressão do gene de resistência. Após este período, 50 µL da suspensão de bactérias foram plaqueados em placas de Petri com meio sólido LB (1,5 g/L de ágar e 50 µL de ampicilina), incubando-a na estufa a 37 °C por um período de 14 a 16 h.

# 3.15 Extação de DNA plasmidial

Para a obtenção de plasmídeos em grande escala, utilizamos as colunas QIAGEN 100 (Qiagen, Valencia, LA, USA) para midi-prep aplicando o protocolo de lise alcalina padrão, descrito no manual do produto. Após a transformação bacteriana, uma colônia foi selecionada e cultivada em 3 mL de meio líquido LB contendo ampicilina na concentração descrita acima, por 8 h a 37 °C sob agitação constante (300 rpm). A seguir, esta cultura foi diluída 1:1000 em meio LB com antibiótico. As centrifugadas a 6000 *x*g/15 min/4 °C. O precipitado foi ressuspendido na solução P1 do kit (50 mM Tris-HCI, 10 mM EDTA e 100 µL de RNAse A) e a lise celular ocorreu pela adição da solução P2 (200 mM NaOH, 1% SDS), por 5 min a 4 °C. Após este período adicionamos a solução P3, de neutralização (3 M acetato de potássio pH=5,5), mantendo a mistura por 15-20 min no gelo. Para a separação do DNA dos resíduos bacterianos, o lisado bacteriano foi centrifugado a 20.000 *x*g/30 min/4 °C (Himac C30B2, Hitachi-Chiyoda, TKY, Japão) e o precipitado descartado. A solução contendo o DNA foi aplicada a colunas contendo resina de sílica para ligação do DNA. As colunas foram lavadas com uma solução de 1 M NaCI, 50 mM

MOPS (pH=7,0) e 15% de isopropanol, e o DNA foi recuperado por eluição em uma solução de 1,6 M NaCl, 50 mM Tris-Cl (pH=8,5) e 15% isopropanol. O DNA foi precipitado com 0,7 vol de isopropanol, e centrifugado por 30 min/15.000 xg/4 °C. O precipitado foi lavado duas vezes para remoção de sais e outros reagentes com 2 mL de etanol 70% por centrifugação a 15.000 xg/10 min. O precipitado de DNA plasmidial foi ressuspendido em 50 µL de tampão solução de TE pH=8,0 (10 mM Tris-Cl, 0,1 mM EDTA), ou 50 % TE, 50% H2O milli-Q.

#### 3.16 Sequenciamento do plasmídeo pLKO

0 sequenciamento das amostras foi realizado pelo serviço de sequenciamento de DNA (SSDNA) no instituto de química da USP-SP, após preparação das amostras seguindo o protocolo enviado pelo SSDNA. Em um microtubo de 0,2 mL adicionamos 3,2 µM de primer, 3 µL de 5x tampão para sequenciamento (adquirido junto com o kit da enzima BigDye versão 3.1), 100-200 ng do plasmídeo, 2 µL da enzima BigDye versão 3.1 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), completamos o volume com água MilliQ autoclavada para 15 µL. Colocamos o tubo no termociclador com a seguinte programação:

-96° C por 2 minutos -96° C por 45 segundos -55° C por 30 segundos -60° C por 4 minutos -4° C por tempo indeterminado

35 ciclos

Precipitação da reação usando glicogênio: aos 15 µL, adicionamos 25 µL do "coquetel" de precipitação (46,3 µL etanol 100% gelado, 1,85 µL de acetato de sódio (NaOAc) 3 M, 1,85 µL de glicogênio 1 mg/mL, completar o volume com água MilliQ autoclavada para 50 µL), agitamos e mantivemos em gelo por 15 min. Centrifugamos a 4000 rpm por 20 min à temperatura ambiente e depois descartamos o sobrenadante. Adicionamos 50 µL de etanol 70% gelado ao precipitado e centrifugamos o tubo a 400 rpm por 10 min. Descartamos o sobrenadante e secamos o resíduo de etanol deixando o tubo, com a tampa aberta, por 1 min no termociclador à 95 °C.

#### 3.17 Extração e quantificação de proteínas

Para obtenção das proteínas para eletroforese foram plaqueadas 1x10<sup>7</sup> células em placa de 10 cm em 6 mL de meio RPMI 10% SFB na presença ou ausência de PGE<sub>2</sub>. As células foram mantidas na estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 1, 4 e 8 h. Após tratamento, as células foram coletadas e seguiu-se o protocolo, segundo o fabricante, de separação dos extratos nuclear e citoplasmático (NE-PER<sup>™</sup> *Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents*-Thermo Scientific (Rockford, IL, EUA) para células em suspensão.

Após extração proteica, as amostras foram quantificadas seguindo o protocolo do kit BCA protein assay, Thermo Scietific (Rockford, IL, EUA). Foi realizada medida de absorbância das amostras em espectrofotômetro (Versa MAX) em um comprimento de onda de 562 nm. A análise das amostras foi realizada pelo software SOFTmax PRO 40, Molecular Devices (Cary, CN, EUA).

# 3.18 Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) e "Western-blot"

Este método foi utilizado para detectar a expressão de proteínas CREM, ICER e Histona H3 (constitutiva no núcleo). Assim sendo, foram utilizados 40 ou 90 µg de proteína dos grupos tratados ou não. O estoque destas amostras foi mantido a -80 °C. As proteínas presentes foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS PAGE – *"Sodium dodecyl sulphate gel eletrophoresis*"), seguida de *"Western-Blot"*.

Após a preparação do gel de corrida na percentagem de 15%, para viabilizar a detecção de cada proteína estudada, 20 μL de cada amostra contendo 40 μg de proteína, em condições redutoras (tampão de amostra contendo β-mercaptoetanol e amostra aquecida por 3 min a 96 °C), foram aplicadas em cada poço e a eletroforese foi conduzida a 100 V. Após a eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de 0,22 mm de PVDF durante 1 h e 20 min a 300 mA . Após transferência, as membranas foram deixadas na solução de bloqueio contendo 5% leite em pó desnatado em TBS-Tween (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, 0,05% Tween 20) por 2 h, à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas overnight à 4 °C com o anticorpo primário. Após a marcação, as membranas foram

lavadas três vezes em tampão TBS-Tween e incubadas por 1 h à temperatura ambiente com o anticorpo secundário apropriado, conjugado à peroxidase. Após este período as membranas foram novamente submetidas à lavagem por três vezes consecutivas e a detecção dos imunocomplexos foi feita pelo método de quimiluminescência, ECL (*enhanced chemiluminescence*) preparado em nosso laboratório [Solução A: 9 mL H2O, 1 mL Tris/HCI 1 M pH 8,5, 22  $\mu$ L p-Coumaric acid 90 mM, 50  $\mu$ L Luminol 250 mM e Solução B: 450  $\mu$ L H2O e 50  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%]. Após esse procedimento as membranas foram expostas a um filme de autoradiografia (Kodak) e as bandas analisadas quanto ao massa molecular das proteínas investigadas. O tempo de exposição das membranas ao filme foi de acordo com a intensidade de marcação e variou de 30 min à 1 h.

Os anticorpos primários utilizados foram: Anti-CREM (Santa Cruz Biotecnology, Dallas, Texas, USA); Anti-histona H3 (acetil K27) (Abcam, Cambridge, MA, USA). O anticorpo secundário utilizado foi: Anti-rabbit (Cell Signaling, Danver, MA, USA).

#### 3.19 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa computacional *GraphPad* versão 5.0 (La Jolla, CA, EUA). O teste usado foi ANOVA, seguido pelo pós-teste Tukey. O primeiro tipo de análise foi utilizado para averiguar se o fenômeno observado era resultante da variação entre os diferentes tratamentos e não de uma combinação aleatória. A segunda análise consistiu em comparar os tratamentos dois a dois e verificar se os mesmos eram significantemente diferentes entre si. Valores menores que p<0,05 foram considerados significativos.

#### 4 RESULTADOS

#### 4.1 Mapeamento da região promotora do fasl

Para dar início à busca sobre o envolvimento de ICER na via de inibição do fasl pela PGE<sub>2</sub>, o mapeamento da região promotora desse gene é de fundamental importância. Além disso, sabendo-se que CREB se liga a sítios CRE nos promotores gênicos, promovendo a transcrição destes genes, e ICER compete com CREB por estes sítios de ligação inibindo a transcrição dos genes (96), primeiramente, foi verificado se no promotor do fasl murino e humano havia sítios de ligação para ICER, ou seja, sítios CRE (TGACGTCA) (77). Para isso, foi delimitada a região promotora de interesse (1000 bp) do gene fasl humano e murino através do UCSC genome Browser (http://genome.ucsc.edu/). Após obter-se tal região, fez-se uso do programa de predição MacVector 12.5.1, em busca dos sítios CRE de ligação. Esse programa se baseia em um banco de dados de fatores de transcrição prédeterminados, experimentalmente ou por meio de predição computacional. Através deste programa, evidenciamos no promotor do fasl murino, outra sequência não canônica (AGGACACACC) (Figura 10A). Interessantemente, foram evidenciados dois síios CRE não-clássicos e um sítio clássico no promotor do fasl murino, mas não foi verificado nenhum sítio CRE no promotor humano.

Sabendo-se que ICER pode formar complexos com NFAT e se ligar a sítios compostos deste fator (58, 59, 96), foi realizado um mapeamento, através do programa *MacVector*, dos sítios em que NFAT é capaz de se ligar. Como esperado, foram evidenciados três sítios de ligação em ambos os promotores, humano e murino.



**Figura 10.** Região promotora do fasl murino e humano. (A) Região promotora do fasl murino e (B) Região promotora do fasl humano. 1000bp Upstream (em preto), juntamente com a região 5'UTR (untranslated region) em azul e CDS (coding sequence) em vermelho, obtida através do site http://genome.ucsc.edu/. Sítio CRE clássico (em azul claro), Sítios CRE não clássicos (em amarelo) e NFAT (em vermelho). ATG (em verde) indicando o início da tradução.

# 4.2 Análise da sequência promotora do fasl

Com a região promotora do gene *fasl* murino e humano delimitada e os sítios de ligação para ICER e NFAT evidenciados, foi realizada uma busca para verificar se a região promotora do *fasl* é conservada entre estas espécies de animais. Para isso, realizou-se alinhamentos do tipo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) – blastn (para o promotor) – através do site do NCBI – *National Center for Biotechnology Information (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/*), e obteve-se uma forma direta de visualizar a similaridade do promotor do *fasl* entre murinos e humanos (Figura 11).

А

Color key for alignment scores					
Quary	<40	40-50	50-80	80-200	>=200
1	200	400	600	800	1000

В	Query	771	GCTGACCTGCTCTGCAGGATCCCAGGAAGGTGAGCATAGCCTACTAACCTGTTTGGGTAG	830
	Sbjet	859	GCTGACTTGCTGAGTTGGACCTCAGGCAGGCAAGCCTGGTTTACCAGCCTTCTCAGTTAG	918
	Query	831	CACAGCGACAGCAACTGAGGCCTTGAAGGCT-GTTATCAGAAAATTGTGGGCGGAAACTT	889
	Sbjet	919	CACAGAGACGCCAATTGGAACTTCGAAGACTT <u>GTCGTCA</u> GAAATTTCTGGGC <mark>GGAAA</mark> CTT	978
	Query	890	CCAGGGGTTTGCTCTGAGCTTCTTGAGGCTTCTCAGCTGCAAAGTGAGTG	949
	Sbjet	979	CCTGGGGTT-GCTGTGAGCTTTTTGAGGCTTCTCAGCTTCAGATGC-AAGTGAGTGGGTG	1036
	Query	950	TTTCTTTgagaagcagaatcagagagagagagagaagaagagaaagacagagGTGTTT	1009
	Sbjet	1037	TCTCACAGAGAAGCAAAGAGA-AGAGA-ACAGGAGAAAGGTGTTT	1079
	Query	1010	CCCTTAGCTATGGAAACTCTATAAGAGAGATCCAGCTTGCCTCCTCTTGAGCAGTCAGCA	1069
	Sbjet	1080	CCCTTGACTGCGGAAACTTTATAA-AGAAAACTTAGCTTCTCTGGAGCAGTCAGCG	1134
	Query	1070	ACAGGGTCCCGTCCTTGACACCTCAGCCTCTACAGGACTGAGAAGAAGTAAAACCGT	1126
	Sbjet	1135	TCAGAGTTCTGTCCTTGACACCTGAGTCTCCTCCACAAGGCTGTG-AGAAG-GAAACCCT	1192
	Query	1127	TTGCTGGGGCTGG 1139	
	Sbjet	1193	TTCCTGGGGCTGG 1205	

**Figura 11.** *BLAST (blastn) do promotor do fasl humano e murino.* (A) Representação do alinhamento, em que as cores indicam a similaridade entre as sequências analisadas do promotor do gene *fasl* humano (*Query*) e murino (*Subject*). A linha rosa representada abaixo do *Query* indica a similaridade entre os promotores humano e murino, mas não em toda a extensão da sequência de bases. (B) Comparação da região promotora de humanos e murinos que possui similaridade. Traço vertical indica identidade entre nucleotídeos; Letras minúsculas cinzas indicam trechos mascarados; Traços horizontais indicam "gaps". Em destaque nos retângulos azul e vermelho, respectivamente: sítio CRE clássico e sítio para NFAT. Retângulo amarelo: sítio CRE não clássico.

Feito o BLAST para o promotor do gene *fasl*, foi observado que apenas uma parte dele é semelhante entre murinos e humanos. Isto pode ser verificado, pois a linha rosa abaixo do *Query* (sequência do promotor humano), que indica a similaridade do promotor do *fasl* murino com o *Query* (humano), aparece no terço final do *Query* (aproximadamente em 800) em diante. Os números abaixo da linha vermelha indicam a numeração dos nucleotídeos, em que 1 é o primeiro nucleotídeo alinhado. Sendo assim, a similaridade entre os promotores ocorre a partir do nucleotídeo 800, aproximadamente, indicando que antes disso não há nucleotídeos similares entre humanos e murinos.

Nota-se na **Figura 11B** que, de fato, a sequência de nucleotídeos começa a se alinhar no nucleotídeo 771 do promotor humano (*Query*), enquanto isso equivale ao nucleotídeo de número 859 no promotor do *fasl* murino (*Subject*). Com esse tipo de alinhamento, verifica-se que de 373 nucleotídeos alinhados, 274 são idênticos entre humanos e murinos, ou seja, a região promotora de 1000 bp juntamente com a região 5' UTR (*untranslated region*) de humanos e murinos possui 73% de

identidade entre si, na região em que se alinham. No entanto, o resultado do alinhamento mostrou que as sequências promotoras possuem 8% de *gaps*, ou seja, a extensão dos promotores é diferente, fazendo com que haja regiões em que não há nucleotídeos em uma espécie, mas há na outra. Isso faz com que o escore de alinhamento seja menor, indicado pela cor rosa da linha abaixo do *Query* na **Figura 11A.** 

#### 4.3 Oligonucleotídeos para icer

O desenho dos oligonucleotídeos (oligos) para reações de PCR (*Polymerase chain reaction*) foi feito através do site *Primer3* (*http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/*), com auxílio dos sites do NCBI e UCSC. Como se pode notar na **Figura 12A**, não é possível desenhar oligos direcionados apenas para uma isoforma de *icer* devido ao compartilhamento dos mesmos éxons, ao menos, em duas isoformas de *icer*. Sendo assim foram desenhados oligonucleotídeos para todas as isoformas deste gene. Para PCR convencional desenhou-se oligos que gerassem um produto grande, para isso os éxons de numero 1 e 4 foram escolhidos, enquanto que, para a PCR em tempo real (qPCR- *quantitative PCR*), é necessário que o produto seja pequeno. Sendo assim, desenhou-se oligos nos éxons 1 e 3 (**Figura 12A**).

Após o desenho dos oligos, verificou-se, após a realização de uma PCR *in silico* pelo site da UCSC, que, mesmo desenhando oligos em éxons comuns a todas as isoformas de *icer*, pelo banco de dados do NCBI, esses oligos eram capazes de amplificar apenas 2 variantes de *crem* (10 e 11), com amplicons de 724-760 bp para os oligos desenhados para PCR convencional e 87-123 bp para qPCR.

Após a confecção dos oligos para *icer*, padronizamos os mesmos em relação à temperatura de anelamento e ciclos para a amplificação gênica. Para isso, tratamos 2x10<sup>6</sup> células DO11.10 com 10<sup>-6</sup> M de PGE<sub>2</sub>, para verificar a expressão de *icer*. Como se pode notar na **Figura 12B**, é possível discriminar duas bandas próximas no gel de agarose na região esperada, indicando que duas isoformas de *icer* são expressas nas células DO11.10 após tratamento com PGE<sub>2</sub>. Em relação aos oligos desenhados para qPCR, após a verificação quantitativa de *icer* pelo método *SYBR*® *Green*, aplicou-se as amostras no gel de agarose e observou-se três bandas. Duas destas bandas correspondem ao esperado, 87 e 123 bp e a terceira banda é muito

53

próxima à de 123 bp. Sendo assim, pela análise da **Figura 12C**, as células DO11.10 podem expressar três isoformas de *icer* após tratamento com PGE<sub>2</sub>.



**Figura 12**. Oligonucleotídeos para icer para PCR e qPCR. (A) Esquema dos éxons do gene crem adaptado de (100), indicando os éxons onde forma desenhados os oligonucleotídeos usados para amplificar as moléculas de *icer* em experimentos de PCR convencional (retângulos verdes) e qPCR (retângulos vermelhos). Ao lado dos retângulos estão os tamanhos dos amplicons gerados pelos respectivos oligonucleotídeos.Amostras de experimentos de (B) RT-PCR e (C) qRT-PCR previamente realizados para testar a expressão de *icer* foram utilizadas para a verificação das isoformas de *icer* em gel de agarose 1.5%. (B) A amplificação da molécula de *icer* foi feita com temperatura de anelamento (TA) de 60 °C e 30 ciclos. (C) qRT-PCR foi realizada com TA de 60 °C e 40 ciclos.

#### 4.4 Análise da expressão gênica de ICER

Após análise por bioinformática do promotor do gene *fasl*, partiu-se para a verificação da expressão de *icer* nos hibridomas de linfócitos T murinos (DO11.10), em resposta à PGE<sub>2</sub>. Para isso, primeiramente, foi feita uma curva dose-resposta, em que as células foram tratadas ou não com diferentes concentrações de PGE<sub>2</sub>, entre 10<sup>-6</sup> e 10<sup>-13</sup> M, por um período de 1 hora. Isto porque, *icer* foi identificado como um gene de resposta rápida, sendo transcrito em um período curto de tempo após o tratamento com substâncias que aumentam o AMPc (62).

A análise da RT-PCR, neste período de tempo, mostra que a expressão de *icer* segue uma curva senoidal, em que é possível observar um aumento proporcional, caracterizando uma curva dose-resposta, entre  $10^{-13}$ - $10^{-8}$  M, seguida por uma ligeira queda em concentrações superiores ( $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  M) e tendo seu pico na concentração de  $10^{-8}$  M (Figuras 13 e 14).

Uma vez que as concentrações fisiológicas de PGE<sub>2</sub>, no timo, variam entre 15-40 nM (101), ou seja, ao redor de 10<sup>-8</sup> M de PGE<sub>2</sub>, e que, nessa concentração, foi obtida uma maior expressão de ICER, quando as células foram tratadas por 1 hora, optou-se por utilizar 10<sup>-8</sup> M PGE<sub>2</sub> nos experimentos posteriores.



**Figura 13.** Curva dose-resposta para verificação da concentração ideal de  $PGE_2$  capaz de induzir a máxima expressão de icer. Dois milhões de células distribuídas em 9 poços de uma placa de 24 poços em volume final de 500 µL foram tratadas ou não com diferentes concentrações de  $PGE_2$  (10<sup>-6</sup> a 10<sup>-13</sup> M) por 1 hora. As amplificações das moléculas de *icer* e  $\beta$ -Actina foram feitas com temperatura de anelamento (TA) de 60 °C e 68 °C e 28 e 30 ciclos, respectivamente. Seguiu-se o protocolo descrito na seção "materiais e métodos". B=branco; C=controle sem tratamento. Dados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Para melhor visualizarmos a curva realizada por RT-PCR, utilizamos o programa *ImageJ* para fazer uma relação da expressão de *icer*. Cada barra representa o seu respectivo espaço no gel acima representado, iniciando com o controle (não tratado) (Figura 14).



.

**Figura 14.** Representação gráfica das bandas visualizadas no gel de agarose 1.5% mostrado na *Figura 13.* As bandas obtidas no gel de agarose geram picos quando analisadas no programa *ImageJ* que, por sua vez, nos retorna um número de acordo com a densidade da banda. Assim, foi possível calcular os valores de cada banda tendo como referência as respectivas bandas de β-actina.

Após verificar-se que a expressão de *icer* foi menor em concentrações maiores de PGE<sub>2</sub>, foi realizada uma cinética com a concentração de 10<sup>-8</sup> M de PGE<sub>2</sub> para conhecer o motivo pelo qual *icer* demonstrou essa expressão gênica diminuída. Assim, foi observado o tempo em que *icer* começa a ser expresso, quando é seu pico de expressão e o declínio da mesma nesta concentração de mediador lipídico.

Pode-se notar nas **Figuras 15 e 16** que, em 30 minutos *icer* já começa a ser expresso e seu pico se dá em 1-2 horas, tendo seu declínio, até atingir seus níveis basais, em 8 horas.



**Figura 15.** *Cinética para verificação do tempo em que icer apresenta seu pico de expressão em células DO11.10.* Dois milhões de células distribuídas em 8 poços de uma placa de 24 poços em volume final de 500  $\mu$ L foram tratadas ou não com PGE<sub>2</sub> 10<sup>-8</sup> M em diferentes tempos. As amplificações das moléculas de *icer* e  $\beta$ -Actina foram feitas com temperatura de anelamento (TA) de 60 °C e 68 °C e 28 e 30 ciclos, respectivamente. Seguiu-se o protocolo descrito na secção "materiais e métodos". B=branco; C=controle. Dados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Para melhor visualizarmos a curva realizada por RT-PCR, utilizamos o programa *ImageJ* para fazer uma relação da expressão de *icer*. Cada barra representa o seu respectivo espaço no gel acima representado, iniciando com o controle (não tratado) (Figura 16).



**Figura 16**. Representação gráfica das bandas visualizadas no gel de agarose 1.5% mostrado na *Figura 15*. As bandas obtidas no gel de agarose geram picos quando analisadas no programa *ImageJ* que, por sua vez, nos retorna um número de acordo com a densidade da banda. Assim, foi possível calcular os valores de cada banda tendo como referência as respectivas bandas de β-actina.

Para confirmar que concentrações maiores de  $PGE_2$  estão relacionadas a uma expressão adiantada de *icer*, realizamos a mesma curva-dose resposta das **Figuras 13 e 14**, mas, desta vez, as células foram estimuladas com  $PGE_2$  por 30 minutos (**Figuras 17 e 18**). Como esperado, o pico de expressão gênica de ICER nesse tempo se deu entre  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  M de  $PGE_2$ , mas ainda observa-se aumento na expressão de *icer* com  $PGE_2$   $10^{-8}$  M. No entanto, com  $10^{-9}$  M de  $PGE_2$  *icer* já se encontra em níveis basais.



**Figura 17.** *Curva dose-resposta para verificar a rápida expressão de* icer *em 30 minutos.* Dois milhões de células distribuídas em 9 poços de uma placa de 24 poços em volume final de 500  $\mu$ L foram tratadas ou não com diferentes concentrações de PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> a 10<sup>-13</sup> M) por 30 minutos. As amplificações das moléculas de *icer* e  $\beta$ -Actina foram feitas com temperatura de anelamento (TA) de 60 °C e 68 °C e 28 e 30 ciclos, respectivamente. Seguiu-se o protocolo descrito na secção "materiais e métodos". B=branco. Dados representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Para melhor visualizarmos a curva realizada por RT-PCR, utilizamos o programa *ImageJ* para fazer uma relação da expressão de *icer*. Cada barra representa o seu respectivo espaço no gel acima representado, iniciando com o controle (não tratado).



**Figura 18.** Representação gráfica das bandas visualizadas no gel de agarose 1.5% mostrado na figura 17. As bandas obtidas no gel de agarose geram picos quando analisadas no programa *ImageJ* que, por sua vez, nos retorna um número de acordo com a densidade da banda. Assim, foi possível calcular os valores de cada banda tendo como referência as respectivas bandas de  $\beta$ -actina.

# 4.5 PGE<sub>2</sub> 10<sup>-8</sup> M é capaz de proteger as células DO11.10 da AICD

Após optar-se por tratar as células DO11.10 com 10<sup>-8</sup> M PGE<sub>2</sub>, visto que, além de ser a concentração próxima à fisiológica no timo, esta concentração é a mais baixa capaz de aumentar a expressão de *icer*, no tempo de 30 minutos, foi realizado um experimento para confirmar se esta concentração de PGE<sub>2</sub> é capaz de proteger as células da morte por AICD, como demonstrado por nosso grupo de pesquisa (81). Para isso, induzimos as células DO11.10 à morte por AICD, via reestimulação do complexo TCR-CD3 com anticorpo anti-CD3 por 18 h. Após o estímulo, marcamos as células com Anexina-V FITC. A anexina-V liga-se aos resíduos de fosfatidilserina, os quais estão expostos, na face externa da membrana plasmática, em células apoptóticas. Este evento ocorre logo no início do processo de apoptose, sendo a anexina-V um importante marcador deste evento (102). Assim, a partir das análises realizadas após a leitura das amostras por citometria de fluxo (Figura 19A), os dados adquiridos foram plotados em um gráfico para visualização da proteção da morte conferida pela PGE<sub>2</sub> (Figura 19B). A Figura 19 mostra que o efeito protetor da PGE<sub>2</sub> sobre as células DO11.10 é, de fato, significativo na concentração de 10<sup>-8</sup> M.



**Figura 19.** *Diferentes concentrações de PGE2, entre 10<sup>-11</sup> e 10<sup>-6</sup> M, protegem as células DO11.10 da AICD.* Duzentas mil células DO11.10 foram estimuladas ou não por 18 h na presença de anti-CD3 na concentração de 1 µg/mL imobilizados em placa de 96 poços. A análise foi feita por citometria de fluxo após marcação com anexina V. (A) Density plots mostrando o deslocamento para direita das células marcadas com anexina V (apoptóticas). A porcentagem de células apoptóticas está representada no canto superior direito de cada gráfico. (B) Representação em barras do experimento de citometria de fluxo, \*\* p<0,01 e \*\*\*p<0,001. Dados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Um segundo experimento, utilizando os mesmos parâmetros do primeiro, foi realizado através da análise da apoptose via fragmentação de DNA em tampão HFS- *hypotonic fluorochrome solution*, que consiste na incorporação de iodeto de propídio (PI) ao DNA íntegro das células não apoptóticas. Um dos eventos da apoptose é a fragmentação de DNA das células, evento mais tardio quando comparado com a externalização da molécula de fosfatidilserina (102). Portanto, por meio desta técnica foi possível mensurar a apoptose através do número de eventos à esquerda do pico G0-G1 (pico em que se verifica um maior número de células, as quais estão na fase de repouso). Esses eventos são os núcleos hipodiplóides os quais não incorporaram PI devido à fragmentação do DNA.

Com este experimento, verificamos, por outro método de avaliação da morte celular, que a  $PGE_2 \ 10^{-8} M$  protege as células da morte por AICD (Figura 20).



**Figura 20.** Diferentes concentrações de  $PGE_2$ , entre  $10^{-8}$  e  $10^{-6}M$ , protegem as células DO11.10 da AICD. (A) Duzentas mil células DO11.10 foram estimuladas ou não por 18 h na presença de anti-CD3 na concentração de 1 µg/mL imobilizados em placa de 96 poços. A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. Os gráficos representam os resultados obtidos para cada tratamento, com as porcentagens de morte mostradas ao lado esquerdo de cada gráfico. (B) Representação em barras do experimento de citometria de fluxo, \*\*\*p<0,001. Dados representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

#### 4.6 Envolvimento de ICER na via da PGE<sub>2</sub>

Depois de verificada a eficácia da PGE<sub>2</sub> na concentração 10<sup>-8</sup> M na inibição da morte nas células DO11.10, esta mesma concentração de mediador lipídico foi utilizada para verificar a expressão de *icer* e *fasl*, de maneira concomitante. Para isso, as células foram tratadas com PGE<sub>2</sub> ou drogas de ação conhecida, como a melatonina, genisteína e actinomicina D, por um período de 4 horas. Isso porque, experimentos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa verificaram que a expressão de *fasl* ocorre em 4 horas.

Sendo assim, foi realizada uma RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) e foi possível analisar os dados de forma quantitativa **(Figura 21)**, sendo que, PGE<sub>2</sub> 10<sup>-8</sup> M promove a diminuição da expressão de *fasl* ao mesmo tempo em que aumenta a expressão de *icer*. Como esperado, a melatonina diminuiu a expressão de *fasl*, visto que este fenômeno já foi descrito por nosso grupo de pesquisa (53). A genisteína é um conhecido inibidor de tirosina-quinases, e, como esperado, diminuiu a expressão de *fasl* e, curiosamente, aumentou a expressão de *icer*. Em relação à actinomicina D, sendo esta uma droga que inibe a transcrição geral dos genes, era, de fato, esperado que nenhum dos genes analisados (*icer* e *fasl*) fosse expresso.



**Figura 21**. Comparação da expressão gênica de FASL e ICER em células DO11.10 tratadas com diferentes drogas por 4 h.Dois milhões de células distribuídas em 8 poços de uma placa de 24 em volume final de 500 µL foram tratadas ou não com diferentes drogas:  $PGE_2$  (10<sup>-8</sup> M), melatonina (1 mM), genisteína (10 µg/mL) e actinomicina D (10 µg/mL). RT-PCR em tempo real para avaliar quantitativamente a expressão gênica de FASL e ICER em células DO11.10 sob ação de diferentes drogas, \*\*\*p<0,001; ns=não significativo.

#### 4.7 Padronização da técnica de Western Blot para detecção de ICER

Vários trabalhos já detectaram ICER na forma proteica em diferentes tipos celulares como células do sistema nervoso central (62, 103) e células tumorais (59). Sendo assim, foi obtido o extrato nuclear das células DO11.10, visto que a concentração proteica de ICER apenas no núcleo seria maior e, portanto, de mais fácil detecção.

Primeiramente, obteve-se o extrato nuclear de células Jurkat, pois esta linhagem é o controle positivo para CREM, gerando uma banda de 43-55 kDa. Sabendo-se que o anticorpo anti-CREM também é capaz de se ligar à ICER, é possível diferenciar tais proteínas através do tamanho delas. Isto porque, ICER tem, aproximadamente, 19 kDa (62, 103). Depois de obtido os extratos nucleares de Jurkat e das DO11.10, é possível visualizar as bandas de CREM (**Figura 22**), mas não houve aparecimento de banda compatível com ICER.



**Figura 22.** Padronização da técnica de Western Blot. As células DO11.10 foram tratadas ou não com  $10^{-8}$  M de PGE<sub>2</sub> por 1 h, 2 h ou 4 h para verificar a presença de ICER. As células Jurkat (controle positivo do anti-CREM) não receberam tratamento. Foram aplicadas 90 µg de cada extrato celular. C= controle.

#### 4.8 Clonagem de shRNA para ICER em vetor lentiviral pLKO

Devido a importância de obter-se células DO11.10 "knock-down" para ICER, foram clonados dois RNAs de interferência diferentes (shRNA-short hairpin RNA), em vetor lentiviral pLKO, capazes de interferir com o RNAm de icer. Depois de realizada a clonagem, foram obtidas duas preparações de plasmídeos pLKO com short hairpin para icer diferentes, cada uma com um par de shRNA. Após a obtenção dos plasmídeos clonados, foi realizada a transformação de bactérias para incorporação plasmídeos observado crescimento dos е 0 de colônias correspondentes às duas construções de shRNA (shICER 1 e shICER 2). Foram escolhidas 4 colônias de cada construção e os plasmídeos foram purificados. Após a purificação, foi feita a digestão dos mesmos com as seguintes enzimas de restrição (New England Biolabs, Hitchin, Hertfordshire, Reino Unido): EcoRI e Ncol, conforme o protocolo. Após a digestão, visualizou-se em gel de agarose duas bandas, com massas moleculares de 5 kb e 2 kb, como esperado para o pLKO (Figura 23).



**Figura 23.** Eletroforese em gel de agarose 1 % da digestão dos plasmídeos pLKO clonados com shRNA para icer. Duas construções com shRNA para ICER diferentes (shICER 1 e shICER 2) foram digeridas com EcoRI e Ncol por 2 horas à 37 °C. As bandas esperadas de 2 kb e 5 kb foram visualizadas em todas as amostras.

#### 4.9 Sequenciamento do pLKO + shICER

Após obter-se o padrão de bandas esperado para o pLKO, foi realizado o sequenciamento dos plasmídeos para verificar se os insertos de shICER 1 e 2 se ligaram corretamente no vetor. Para isso, realizou-se o protocolo de sequenciamento, descrito na seção Materiais e Métodos e foi verificada a inserção dos shRNA para *icer* 1 e 2 no local correto do pLKO, ou seja, no local de ação das enzimas de restrição Agel e EcoRI. No entanto, após a realização do sequenciamento das amostras de plasmídeos (shICER 1 e shICER 2) verificou-se a deleção de uma base no início da sequência do shICER 1 e no final da sequência do shICER 2. Porém, essas deleções não estão na região que codificam o shRNA para *icer* (Figura 24).







**Figura 24.** Sequenciamento do plasmídeo pLKO clonado com shRNAs para ICER 1 e 2. (A) Em azul claro é a sequência do shICER 1 inserido no pLKO no local de ação das enzimas Agel e EcoRI, indicado pelas flechas vermelhas. (B) Em verde é a sequência do shICER 2 inserido no pLKO no local de ação das enzimas Agel e EcoRI, indicado pelas flechas vermelhas.Em destaque em marrom é a sequência de bases idênticas do sequenciamento quando comparada ao pLKO. Asteriscos (\*) indicam a falta de alguma base.

#### 5 DISCUSSÃO

Sabendo-se do envolvimento do repressor transcricional ICER na regulação de diversos genes e sua importância para o correto funcionamento celular (109), foi abordado neste trabalho o envolvimento de ICER na inibição de *fasl* pela PGE<sub>2</sub>. Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a PGE<sub>2</sub> é capaz de inibir a expressão de *fasl* através de uma mecanismo dependente de PKA e do aumento de AMPc (81, 101), eventos que são capazes de aumentar a expressão de *icer* (77).

Em primeiro lugar, realizamos uma busca na literatura para entender a ação do ICER como repressor, onde verificamos que este repressor transcricional é capaz de se ligar a uma variedade de sítios CRE no promotor dos genes alvo (104, 105), pois ICER compete com CREB por estes sítios CRE e impede a ativação da maquinaria de transcrição (96). Visto isso, o mapeamento do promotor do gene *fasl* murino e humano em busca de sítios CRE (TGACGTCA) (77) foi o primeiro passo para saber se ICER poderia estar envolvido no mecanismo de inibição desse gene, dando suporte à nossa hipótese. Fazendo-se uso de ferramentas de bioinformática, evidenciamos no promotor do *fasl* murino, não apenas a sequência palindrômica acima citada, mas também outra sequência não canônica (AGGACACACC) (Figura 10A). Após verificarmos a presença de sítios CRE no promotor do *fasl* murino, que é nosso modelo experimental, buscamos por estes sítios também no promotor do *fasl* humano. No entanto, não verificamos a presença de sítios CRE clássicos ou não clássicos no promotor humano (Figura 10B).

Recentemente Srivastava e colaboradores descreveram outro sítio CRE não clássico no promotor da IL-8, que é metade do descrito até agora (CGTCA), sendo que, neste trabalho, eles propõem o envolvimento de ICER na inibição da *il-8* através do não recrutamento da maquinaria de transcrição. Visto isso, e sabendo-se que ICER é capaz de se ligar a sítios CRE diversos, talvez exista algum sítio CRE no promotor do *fasl* humano, ainda não descrito, que os recursos de bioinformática utilizados não evidenciaram. Contudo, além dos sítios CRE, mapeamos os promotores do gene *fasl* humano e murino em busca de sítios em que o NFAT é capaz de se ligar. Isto porque, além deste fator de transcrição ser crucial para a expressão de *fasl* (106-108), já foi descrito que ICER pode formar complexos com o NFAT (ICER/NFAT) e se ligar a sítios compostos deste fator de transcrição,

impedindo a formação da maquinaria de transcrição (58, 96). Após análise, verificamos a presença de sítios para NFAT nos promotores do *fasl* humano e murino. Além disso, analisamos a semelhança entre os promotores humano e murino via BLAST e verificamos similaridade apenas em uma parte da região promotora delimitada (100 bp) (Figura 11A). No entanto, dois sítios de ligação ao NFAT, nesta região, se encontram na mesma posição de nucleotídeos dos promotores envolvidos (Figura 11B), mostrando a importância dos sítios de ligação ao NFAT no gene *fasl* entre humanos e murinos.

Ainda em relação aos sítios para NFAT, já se sabe que citocinas como IL-2, IFN-γ e IL-8 possuem sítios compostos NFAT/AP-1 em que ICER é capaz de se ligar diretamente ou pela formação de complexos com o NFAT e, assim, inibir a expressão desses genes (58, 59, 96). No caso da IL-8, ensaios de coimunoprecipitação (*pull down*) revelaram que tanto CREB, quanto ICER são capazes de se ligar aos sítios compostos NFAT/AP-1 e modular a expressão da *il-8* de maneiras opostas. Enquanto CREB é capaz de promover a expressão de *il-8*, ICER impede essa expressão. Neste trabalho, também foi demonstrado que uma maior expressão proteica de ICER está associada à via de sinalização gerada pelos receptores EP2 e EP4 da PGE<sub>2</sub>. EP4 é capaz de ativar, além da via do AMPc/PKA, a via da PI3K/PKB, assim, esta via favorece a inibição da PKA fazendo com que CREB seja fosforilado pela via da PI3K, permitindo, assim, a expressão da *il-8* e de genes capazes de manter a ativação celular (59).

Desta forma, o promotor do gene *fasl* murino, que apresenta sítios CRE, além de sítios para NFAT, possivelmente seja modulado por meio dos dois mecanismos de repressão envolvendo ICER (ligando-se diretamente a sítios CRE e/ou formando complexos com o NFAT). Já o *fasl* humano possivelmente seja modulado através da formação de complexos ICER/NFAT, o qual se liga a sítios para NFAT. Sendo assim, juntos, os resultados encontrados por meio do mapeamento da região promotora do *fasl* e da análise via BLAST são indicativos de semelhança na regulação gênica das espécies envolvidas.

Para avaliar a expressão de *icer* nas células-alvo do estudo, as DO11.10, desenhamos oligos para *icer*, e encontramos diferenças na expressão das isoformas deste gene quando comparadas as bandas geradas por PCR convencional e qPCR (Figura 12B e C). Na PCR convencional verificamos a expressão de apenas duas isoformas, enquanto três isoformas são vistas com os oligos para qPCR. Isto porque,

os oligos que anelam na fita de cDNA de *icer* no sentido 5'-3' (*primer reverse*) foram desenhados em éxons diferentes. O oligo *reverse* para a PCR convencional foi desenhado no éxon 4, enquanto o oligo *reverse* para qPCR foi desenhado no éxon 3. Desta forma, os oligos desenhados para qPCR são capazes de detectar todas as isoformas de *icer*. Sendo assim, verificamos que três, das quatro isoformas de *icer*, são expressas na DO11.10, após tratamento com PGE<sub>2</sub>.

Depois de desenhados os oligos, empregamos os mesmos para verificar a expressão de *icer* em diferentes concentrações de PGE<sub>2</sub>, observando-se que quanto maior a concentração de PGE<sub>2</sub>, maior é a expressão de *icer* (Figuras 13 e 14). No entanto, a curva dose-resposta no tempo de 1 hora nos mostra que, em concentrações superiores a 10<sup>-8</sup> M de PGE<sub>2</sub>, *icer* tem sua expressão diminuída. Sendo assim, verificamos por que concentrações mais elevadas de PGE2 não induzem maior expressão de *icer*. Em primeiro lugar, a PGE<sub>2</sub> em concentrações superiores a 10<sup>-8</sup> M poderia apresentar uma atividade citotóxica, o que simplesmente levaria à completa parada da maquinaria de transcrição e à morte das células. No entanto, estas concentrações elevadas de PGE<sub>2</sub> não induzem morte celular. Muito pelo contrário, nestas condições, a PGE<sub>2</sub> apresenta uma maior proteção sobre a AICD (Figuras 19 e 20). A outra possibilidade seria que icer tenha uma expressão transiente, e que em concentrações mais elevadas de PGE2, o pico da sua expressão seria adiantado. Esta segunda opção é embasada pelo fato de que Molina e colaboradores observaram que ICER possui uma expressão gênica adiantada (15 min) e transiente após tratamento com forskolina (62). Além disso, Pigazzi e colaboradores também relataram que icer apresenta uma expressão transiente após aumento dos níveis de AMPc (109).

A expressão transiente de *icer* pode estar relacionada com a sua autorregulação negativa (77). Como muitos trabalhos apontam, ao competir por sítios CRE, com o fator de transcrição CREB, ICER acaba por impedir sua própria transcrição, devido à presença de sequências CRE em seu promotor (62, 65, 109). Sendo assim, para verificar o perfil de expressão de *icer* realizamos uma cinética com 10<sup>-8</sup> M de PGE<sub>2</sub> (Figuras 15 e 16). Nesta concentração de mediador lipídico, observamos uma curva condizente com um perfil de expressão transiente, em que o início da expressão de *icer* ocorreu em 30 minutos, tendo seu pico em 1-2 horas e seu declínio completo em 8 horas. Além disso, realizamos uma curva dose-resposta, no tempo de 30 minutos (Figura 17), em que foi possível confirmar que *icer* possui

uma expressão adiantada, pois o pico de expressão deste repressor foi verificado na concentração de PGE<sub>2</sub> 10<sup>-6</sup> e 10<sup>-7</sup> M. Ao compararmos a curva de 30 minutos com a curva realizada no tempo de 1 hora (**Figura 13**), podemos verificar que na curva de 1 hora, além do pico de expressão de *icer* ser em concentrações menores de PGE<sub>2</sub>, nota-se um aumento na expressão de *icer* em concentrações de PGE<sub>2</sub> como 10<sup>-9</sup> e 10<sup>-10</sup> M, o que não é visto na curva de 30 minutos.

Ao ser confirmado que  $PGE_2 10^{-8}$  M é capaz de proteger as células DO11.10 da morte por AICD (Figura 19), verificamos que esses dados corroboram a literatura, pois estudos demonstram que a  $PGE_2$  é, de fato, capaz de inibir a AICD através do bloqueio da expressão de *fasl* de forma dose-dependente  $(10^{-8}-10^{-6} \text{ M})$  (81, 101). Portanto, quanto maior a dose de  $PGE_2$ , maior é a inibição da expressão de *fasl* e mais protegidas as células estão da morte (Figuras 19 e 20). Segundo Porter e colaboradores, há uma dose máxima  $(10^{-6} \text{ M})$  e mínima  $(10^{-8} \text{ M})$  de  $PGE_2$  capaz de inibir hibridomas de linfócitos T 2B411.13 da morte por AICD e que, concentrações maiores que  $10^{-6}$  M de  $PGE_2$  mantém a inibição da morte em um platô. Da mesma forma, nosso grupo demonstrou que  $10^{-9}$  M de  $PGE_2$  é capaz de inibir os hibridomas de linfócitos T DO11.10 da morte por AICD e que o tratamento com  $PGE_2 10^{-7}$  M é capaz de se equiparar com a porcentagem de morte encontrada nas células que não receberam estímulo para AICD (81).

Visto que, a PGE<sub>2</sub> é capaz de inibir *fasl* de forma dose-dependente, verificouse a inibição de *fasl* concomitantemente à expressão de *icer*, **Figura 21**. Neste sentido, é importante destacar que esta correlação inversa também foi observada para outro estímulo. Bodor e colaboradores demonstraram que o tratamento com forskolina induz a diminuição da expressão de *fasl* ao mesmo tempo em que leva ao aumento de *icer* em hibridomas de linfócitos T (2B4.11) tratados com PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) e ionomicina (110). Assim, tratamos as células DO11.10 com diferentes drogas para observar a ação das mesmas sobre a expressão de *fasl e icer*. Como já demonstrado anteriormente por nosso grupo de pesquisa (53), a melatonina, assim como a PGE<sub>2</sub>, é capaz de proteger os linfócitos T da morte por AICD através da inibição da expressão de *fasl*. No entanto, diferentemente da PGE<sub>2</sub>, o mecanismo pelo qual a melatonina inibe a expressão do *fasl* já é conhecido. Ela age sobre a calmodulina e impede que o NFAT seja desfosforilado e, consequentemente, a sua translocação para o núcleo (53). Sendo o NFAT um fator de transcrição crucial para a expressão de *fasl*, a maquinaria de transcrição não é ativada e ocorre a inibição da transcrição deste gene. Ainda assim, fomos verificar formalmente se a melatonina também poderia ativar *icer* neste contexto. Nossos resultados, apresentados na **Figura 21**, demonstram que a melatonina, de fato, previne a expressão de *fasl* induzida pelo estímulo do TcR/CD3, sem interferir com a expressão de *icer*. Portanto, nossos resultados reforçam a existência de duas vias distintas de controle da expressão de *fasl* em linfócitos T CD4<sup>+</sup>, uma relacionada com o hormônio melatonina, capaz de interferir com translocação do NFAT para o núcleo, e a outra envolvendo a PGE<sub>2</sub>, capaz de aumentar a expressão gênica do repressor ICER.

Além da melatonina, utilizamos a genistéina, um conhecido inibidor de tirosina-quinases, para verificar a expressão de *icer* e *fasl*, visto que a transdução do sinal via TcR/CD3, necessária para a produção de FASL, envolve o recrutamento de tirosina-quinases (111). Como esperado, na **Figura 21**, a genisteína inibe totalmente a expressão de *fasl*, ao mesmo tempo em que ocorre um aumento na expressão de *icer*. Este resultado inesperado sugere que a expressão de *icer* seja normalmente prevenida/inibida por sinais bioquímicos derivados de uma tirosina-quinase cuja ação se encontra constitutivamente presente nas células DO11.10. Isto porque, o tratamento das células DO11.10 apenas com genisteína, sem estímulo do anticorpo anti-CD3, já causa o aumento da expressão de *icer* (dados não mostrados). Outra droga de ação amplamente conhecida, a actinomicina D, foi utilizada para avaliar a expressão gênica de ICER e FASL. Esta droga é capaz de inibir a transcrição gênica (112) e, como esperado, observamos o bloqueio total da expressão de *fasl* e de *icer*. Esses dados demonstram que *icer* é, de fato, um alvo da PGE<sub>2</sub> e sugerem seu possível envolvimento na inibição da expressão de *fasl*.

Sabendo-se que a expressão gênica não, necessariamente, está relacionada com a expressão proteica e que a proteína é o elemento que exerce a ação biológica do gene, várias foram as tentativas de obter-se ICER por *Western blot.* Infelizmente, não há um anticorpo específico para ICER disponível comercialmente. Por outro lado, o anticorpo anti-CREM também reconhece ICER e poderia ser útil, uma vez que as proteínas CREM e ICER seriam diferenciadas pelas respectivas massas moleculares. CREM é uma proteína maior e, mesmo possuindo várias isoformas, sua massa molecular fica entre 55-43 kDa. Em comparação, ICER é uma proteína pequena e sua massa molecular é aproximadamente 19 kDa (62). Após verificarmos que o anticorpo anti-CREM é capaz de detectar ICER, obtivemos o

extrato nuclear das células, ao invés de o lisado total, para obtermos uma quantidade maior de proteínas nucleares e aumentarmos a possibilidade de detectar ICER.

Para padronizar a técnica de *Western blot*, utilizamos células Jurkat e também DO11.10. No entanto, após ser verificada apenas a presença de bandas compatíveis com CREM (43 e 55 kDa), tanto nas células Jurkat quanto nas DO11.10 (dados não mostrados), imaginamos, que a quantidade de ICER produzida não fosse tão expressiva e que seria necessário aplicar uma quantidade maior de proteínas para obtenção de ICER. Porém, mesmo aplicando uma quantidade maior de proteínas (90 µg ao invés de 40 µg), novamente, apenas bandas compatíveis com CREM foram visualizadas. A partir das análises, observamos que a expressão proteica de CREM não se altera com o tratamento com PGE<sub>2</sub> (Figura 22) e que ele não é expresso no citoplasma (dados não mostrados). Estes dados corroboram a literatura em que uma parte das subunidades catalíticas da PKA migra para o núcleo e é capaz de fosforilar CREM e CREB (113).

Um fator importante, quando se trata de proteínas pequenas, é a transferência destas do gel de poliacrilamida para a membrana de PVDF. Talvez ICER, além de ser expresso em baixa quantidade, esteja migrando do gel para a membrana e esteja saindo desta, devido ao seu tamanho. Outro fator seria a concentração de PGE<sub>2</sub> com que as células são tratadas. Talvez  $10^{-8}$  M de PGE<sub>2</sub> não induza uma alta expressão proteica de ICER, mas  $10^{-6}$  M ou até concentrações maiores possam induzir grandes quantidades de ICER que sejam detectáveis por *Western blot.* Isso porque, trabalhos que induzem a expressão de ICER tratam as células com 1 µM de PGE<sub>2</sub> ( $10^{-6}$  M) (59), ou concentrações ainda maiores de forskolina, como 100 µM ( $10^{-4}$  M), capaz de ativar a adenilato ciclase e causar aumento dos níveis de AMPc (110). Sendo assim, novos experimentos serão realizados para otimizar não apenas a transferência de proteínas do gel para a membrana de PVDF, mas também para garantir uma expressão de ICER de modo que seja possível a sua detecção pela técnica de *Western blot*.

Para validar os achados que demonstram o envolvimento de ICER na via de inibição do *fasl* pela PGE<sub>2</sub>, é de extrema importância que seja construída uma linhagem celular (DO11.10) *knock-down* para ICER, pois, desta forma, poderemos obter um resultado irrefutável do envolvimento de ICER na via citada. Tendo em vista a importância desse resultado para o trabalho, já foram clonadas duas
construções diferentes de shRNA para *icer* em vetor lentiviral (pLKO). Estas construções deverão ser capazes de interferir na expressão do RNA mensageiro (RNAm) de ICER. Neste sentido, já estamos produzindo partículas virais que serão utilizadas para infectar células DO11.10 e produzir linhagens estáveis com baixa expressão de *icer*.

Os shRNAs são introduzidos nas células por meio de vetores virais e originam RNAs de dupla fita (RNAdf) em forma de grampo, assim como os micro RNAs (miRNA). Depois de formado o RNAdf em forma de grampo, esta molécula é clivada ainda no núcleo pela enzima Drosha, formando o pré-shRNA que é transportado para o citoplasma pela Exportina-5. No citoplasma, o pré-shRNA é clivado pela Dicer e perde a extensão de bases que forma o grampo da molécula, dando origem ao shRNA dupla fita maduro, contendo 19-23 pares de bases. Após a formação do shRNA maduro, um conjunto de proteínas, denominado RISC (*RNA induced silecing complex*), se associa ao shRNA e promove a interação de uma das fitas do shRNA à molécula de RNAm alvo, culminando com o seu silenciamento por degradação ou bloqueio da tradução, dependendo da complementariedade das fitas. No caso do bloqueio da tradução não é necessária uma complementariedade total entre o *shRNA* e o RNAm (114).

Diferentemente do siRNA (*small interfering RNA*), que são introduzidos diretamente nas células, complexados com lipídeos catiônicos, por exemplo, os shRNA integram o DNA da célula fornecendo um silenciamento permanente do gene alvo, enquanto os siRNA fornecem um silenciamento transiente (114). Devido a esta característica, optou-se por desenhar um shRNA para ICER e, desta forma, obter-se uma linhagem celular (DO11.10) *knock-down* para este gene. Tendo esta linhagem, é possível empregá-la em experimentos diversos, inclusive *in vivo*, para que a via de inibição do *fasl* pela PGE<sub>2</sub> seja bem estudada.

Desta forma, juntos, os resultados apresentados sugerem o envolvimento de ICER na via de inibição do gene *fasl* pela PGE<sub>2</sub> nas células DO11.10, visto que após tratamento com PGE<sub>2</sub> verificamos a inibição de *fasl* relacionada ao aumento da expressão de *icer*. Experimentos para obtenção das células DO11.10 *knock-down* para *icer* estão em andamento para comprovarmos nossa hipótese.

## 6 CONCLUSÃO

- O promotor do gene *fasl* murino possui sítios CRE, em que ICER é capaz de se ligar e, também, sítios para NFAT em que ICER pode se ligar complexado ao NFAT, inibindo a expressão do gene *fasl*;

- O promotor do *fasl* humano possui sítios para NFAT, possibilitando sua regulação por meio da formação de complexos ICER/NFAT, capazes de se ligar nestes sítios e inibir a expressão do gene *fasl*.

- ICER possui uma expressão transiente;

 PGE<sub>2</sub> induz a expressão gênica de ICER de maneira dose-dependente e é capaz de proteger as células DO11.10 da AICD;

 PGE<sub>2</sub> inibe a expressão de *fasl* concomitantemente à indução da expressão gênica de ICER.

## **REFERÊNCIAS**<sup>\*</sup>

1. Degli-Esposti MA, Smyth MJ. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. Nature Reviews Immunology. 2005;5(2):112-24.

2. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. Nature Reviews Cancer. 2006;6(1):24-37.

3. Johansson M, Denardo DG, Coussens LM. Polarized immune responses differentially regulate cancer development. Immunological Reviews. 2008;222:145-54.

4. O'Shea JJ, Lahesmaa R, Vahedi G, Laurence A, Kanno Y. Genomic views of STAT function in CD4+ T helper cell differentiation. Nature Reviews Immunology. 2011;11(4):239-50.

5. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature. 2007;449(7164):819-26.

6. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. Annual Review of Immunology. 2010;28:445-89.

7. Levy DE, Darnell JE, Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. Nature reviews Molecular Cell Biology. 2002;3(9):651-62.

8. Coffman RL. Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. Nature Immunology. 2006;7(6):539-41.

9. Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. Current Topics in Microbiology and Immunology. 2006;311:17-58.

10. Steinman RM. Linking innate to adaptive immunity through dendritic cells. Novartis Foundation Symposium. 2006;279:101-9; discussion 9-13, 216-9.

11. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. Annual Review of Immunology. 2009;27:485-517.

<sup>&</sup>lt;sup>\*</sup> De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: http://www.icmje.org

12. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. Nature Medicine. 2007;13(2):139-45.

13. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. Immunity. 2008;28(4):454-67.

14. Chen Z, Lund R, Aittokallio T, Kosonen M, Nevalainen O, Lahesmaa R. Identification of novel IL-4/Stat6-regulated genes in T lymphocytes. J Immunol. 2003;171(7):3627-35.

15. Kimura A, Kishimoto T. Th17 cells in inflammation. International Immunopharmacology. 2011;11(3):319-22.

16. Yewdell JW, Norbury CC, Bennink JR. Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8+ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. Advances in Immunology. 1999;73:1-77.

17. McDonnell AM, Robinson BW, Currie AJ. Tumor antigen cross-presentation and the dendritic cell: where it all begins? Clinical & Developmental Immunology. 2010;2010:539519.

18. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. Seminars in Immunology. 1998;10(5):349-50.

19. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annual Review of Immunology. 2003;21:335-76.

20. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. Science. 2004;303(5663):1526-9.

21. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004;101(15):5598-603.

22. Green DR. Fas Bim boom! Immunity. 2008;28(2):141-3.

23. Brenner D, Krammer PH, Arnold R. Concepts of activated T cell death. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2008;66(1):52-64.

24. Lenardo M, Chan KM, Hornung F, McFarland H, Siegel R, Wang J, et al. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. Annual Review of Immunology. 1999;17:221-53.

25. Marrack P, Kappler J, Mitchell T. Type I interferons keep activated T cells alive. The Journal of Experimental Medicine. 1999;189(3):521-30.

26. Mitchell T, Kappler J, Marrack P. Bystander virus infection prolongs activated T cell survival. J Immunol. 1999;162(8):4527-35.

27. Krueger A, Fas SC, Baumann S, Krammer PH. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. Immunological Reviews. 2003;193:58-69.

28. Grivennikov SI, Kuprash DV, Liu ZG, Nedospasov SA. Intracellular signals and events activated by cytokines of the tumor necrosis factor superfamily: From simple paradigms to complex mechanisms. International Review of Cytology. 2006;252:129-61.

29. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. European Journal of Biochemistry / FEBS. 1998;254(3):439-59.

30. Kim R, Emi M, Tanabe K, Uchida Y, Toge T. The role of Fas ligand and transforming growth factor beta in tumor progression: molecular mechanisms of immune privilege via Fas-mediated apoptosis and potential targets for cancer therapy. Cancer. 2004;100(11):2281-91.

31. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. Science. 1995;267(5203):1449-56.

32. Shi YF, Sahai BM, Green DR. Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. Nature. 1989;339(6226):625-6.

33. Klas C, Debatin KM, Jonker RR, Krammer PH. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. International Immunology. 1993;5(6):625-30.

34. Kabelitz D, Janssen O. Antigen-induced death of T-lymphocytes. Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library. 1997;2:d61-77.

35. Boggio E, Clemente N, Mondino A, Cappellano G, Orilieri E, Gigliotti CL, et al. IL-17 protects T cells from apoptosis and contributes to development of ALPS-like phenotypes. Blood. 2013..

36. Nagata S. Human autoimmune lymphoproliferative syndrome, a defect in the apoptosis-inducing Fas receptor: a lesson from the mouse model. Journal of Human Genetics. 1998;43(1):2-8.

37. Algeciras-Schimnich A, Griffith TS, Lynch DH, Paya CV. Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis. J Immunol. 1999;162(9):5205-11.

38. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. Cell. 1995;81(4):505-12.

39. Budd RC, Yeh WC, Tschopp J. cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. Nature reviews Immunology. 2006;6(3):196-204.

40. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. Oncogene. 2003;22(53):8543-67.

41. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature. 2000;407(6805):770-6.

42. Strasser A. The role of BH3-only proteins in the immune system. Nature Reviews Immunology. 2005;5(3):189-200.

43. Zhang J, Xu X, Liu Y. Activation-induced cell death in T cells and autoimmunity. Cellular & Molecular Immunology. 2004;1(3):186-92.

44. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. Genes & Development. 2003;17(18):2205-32.

45. Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. Nature Reviews Immunology. 2005;5(6):472-84.

46. Zanoni I, Ostuni R, Capuano G, Collini M, Caccia M, Ronchi AE, et al. CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. Nature. 2009;460(7252):264-8.

47. Crist SA, Sprague DL, Ratliff TL. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) mediates CD154 expression in megakaryocytes. Blood. 2008;111(7):3553-61.

48. Nolan GP. NF-AT-AP-1 and Rel-bZIP: hybrid vigor and binding under the influence. Cell. 1994;77(6):795-8.

49. Crabtree GR, Clipstone NA. Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. Annual Review of Biochemistry. 1994;63:1045-83.

50. Muller MR, Rao A. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. Nature Reviews Immunology. 2010;10(9):645-56.

51. Chuvpilo S, Jankevics E, Tyrsin D, Akimzhanov A, Moroz D, Jha MK, et al. Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. Immunity. 2002;16(6):881-95.

52. Ranger AM, Oukka M, Rengarajan J, Glimcher LH. Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. Immunity. 1998;9(5):627-35.

53. Pedrosa AM, Weinlich R, Mognol GP, Robbs BK, Viola JP, Campa A, et al. Melatonin protects CD4+ T cells from activation-induced cell death by blocking NFAT-mediated CD95 ligand upregulation. J Immunol. 2010;184(7):3487-94.

54. Peterson BR, Sun LJ, Verdine GL. A critical arginine residue mediates cooperativity in the contact interface between transcription factors NFAT and AP-1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996;93(24):13671-6.

55. Xia Y, Wang J, Liu TJ, Yung WK, Hunter T, Lu Z. c-Jun downregulation by HDAC3-dependent transcriptional repression promotes osmotic stress-induced cell apoptosis. Molecular Cell. 2007;25(2):219-32.

56. Schonthaler HB, Guinea-Viniegra J, Wagner EF. Targeting inflammation by modulating the Jun/AP-1 pathway. Annals of The Rheumatic Diseases. 2011;70 Suppl 1:i109-12.

57. Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. Nature reviews Cancer. 2003;3(11):859-68.

58. Bodor J, Habener JF. Role of transcriptional repressor ICER in cyclic AMPmediated attenuation of cytokine gene expression in human thymocytes. The Journal of Biological Chemistry. 1998;273(16):9544-51.

59. Srivastava V, Dey I, Leung P, Chadee K. Prostaglandin E2 modulates IL-8 expression through formation of a multiprotein enhanceosome in human colonic epithelial cells. European Journal of Immunology. 2012;42(4):912-23.

60. Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF-kappaB and the immune response. Oncogene. 2006;25(51):6758-80.

61. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. Annual Review of Immunology. 2000;18:621-63.

62. Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P. Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. Cell. 1993;75(5):875-86.

63. Hoeffler JP, Meyer TE, Yun Y, Jameson JL, Habener JF. Cyclic AMPresponsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. Science. 1988;242(4884):1430-3. 64. Foulkes NS, Borrelli E, Sassone-Corsi P. CREM gene: use of alternative DNAbinding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. Cell. 1991;64(4):739-49.

65. Walker WH, Habener JF. Role of transcription factors CREB and CREM in cAMP-regulated transcription during spermatogenesis. Trends in endocrinology and metabolism: TEM. 1996;7(4):133-8.

66. Goetzl EJ, An S, Smith WL. Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1995;9(11):1051-8.

67. Phipps RP, Stein SH, Roper RL. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. Immunology Today. 1991;12(10):349-52.

68. Smith WL, Meade EA, DeWitt DL. Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes-1 and -2. Annals of the New York Academy of Sciences. 1994;714:136-42.

69. Filion F, Bouchard N, Goff AK, Lussier JG, Sirois J. Molecular cloning and induction of bovine prostaglandin E synthase by gonadotropins in ovarian follicles prior to ovulation in vivo. The Journal of Biological Chemistry. 2001;276(36):34323-30.

70. Narumiya S. Prostanoid receptors. Structure, function, and distribution. Annals of the New York Academy of Sciences. 1994;744:126-38.

71. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. Trends in immunology. 2002;23(3):144-50.

72. Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. Annual review of Pharmacology and Toxicology. 2001;41:661-90.

73. Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. The Journal of Clinical Investigation. 2001;108(1):15-23.

74. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. Physiological Reviews. 1999;79(4):1193-226.

75. Yao C, Hirata T, Soontrapa K, Ma X, Takemori H, Narumiya S. Prostaglandin E(2) promotes Th1 differentiation via synergistic amplification of IL-12 signalling by cAMP and PI3-kinase. Nature Communications. 2013;4:1685.

76. Fujino H, Salvi S, Regan JW. Differential regulation of phosphorylation of the cAMP response element-binding protein after activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E2. Molecular Pharmacology. 2005;68(1):251-9.

77. Bodor J, Spetz AL, Strominger JL, Habener JF. cAMP inducibility of transcriptional repressor ICER in developing and mature human T lymphocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996;93(8):3536-41.

78. Kammer GM. The adenylate cyclase-cAMP-protein kinase A pathway and regulation of the immune response. Immunology Today. 1988;9(7-8):222-9.

79. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. Cell. 1997;88(4):435-7.

80. Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. The Biochemical Journal. 1998;333 (Pt 3):471-90.

81. Weinlich R, Bortoluci KR, Chehab CF, Serezani CH, Ulbrich AG, Peters-Golden M, et al. TLR4/MYD88-dependent, LPS-induced synthesis of PGE2 by macrophages or dendritic cells prevents anti-CD3-mediated CD95L upregulation in T cells. Cell Death and Differentiation. 2008;15(12):1901-9.

82. Rannels SR, Corbin JD. Studies of functional domains of the regulatory subunit from cAMP-dependent protein kinase isozyme I. Journal of Cyclic Nucleotide Research. 1980;6(3):201-15.

83. Bossis I, Voutetakis A, Bei T, Sandrini F, Griffin KJ, Stratakis CA. Protein kinase A and its role in human neoplasia: the Carney complex paradigm. Endocrine-Related Cancer. 2004;11(2):265-80.

84. Sands WA, Palmer TM. Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. Cellular Signalling. 2008;20(3):460-6.

85. Pearce LR, Komander D, Alessi DR. The nuts and bolts of AGC protein kinases. Nature reviews Molecular Cell Biology. 2010;11(1):9-22.

86. Servillo G, Della Fazia MA, Sassone-Corsi P. Coupling cAMP signaling to transcription in the liver: pivotal role of CREB and CREM. Experimental Cell Research. 2002;275(2):143-54.

87. Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. Annual Review of Biochemistry. 1999;68:821-61.

88. Sakamoto KM, Frank DA. CREB in the pathophysiology of cancer: implications for targeting transcription factors for cancer therapy. Clinical Cancer Research : An

Official Journal of the American Association for Cancer Research. 2009;15(8):2583-7.

89. Brindle P, Linke S, Montminy M. Protein-kinase-A-dependent activator in transcription factor CREB reveals new role for CREM repressors. Nature. 1993;364(6440):821-4.

90. Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bachinger HP, Brennan RG, et al. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. Nature. 1994;370(6486):223-6.

91. Bodor J, Feigenbaum L, Bodorova J, Bare C, Reitz MS, Jr., Gress RE. Suppression of T-cell responsiveness by inducible cAMP early repressor (ICER). Journal of Leukocyte Biology. 2001;69(6):1053-9.

92. Walker WH, Sanborn BM, Habener JF. An isoform of transcription factor CREM expressed during spermatogenesis lacks the phosphorylation domain and represses cAMP-induced transcription. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994;91(26):12423-7.

93. Blencowe BJ. Alternative splicing: new insights from global analyses. Cell. 2006;126(1):37-47.

94. Borlikova G, Endo S. Inducible cAMP early repressor (ICER) and brain functions. Molecular neurobiology. 2009;40(1):73-86.

95. Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. Nature. 1993;365(6449):855-9.

96. Bodor J, Bodorova J, Gress RE. Suppression of T cell function: a potential role for transcriptional repressor ICER. Journal of Leukocyte Biology. 2000;67(6):774-9..

97. Haskins K, Kubo R, White J, Pigeon M, Kappler J, Marrack P. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. I. Isolation with a monoclonal antibody. The Journal of Experimental Medicine. 1983;157(4):1149-69.

98. Kappler JW, Skidmore B, White J, Marrack P. Antigen-inducible, H-2-restricted, interleukin-2-producing T cell hybridomas. Lack of independent antigen and H-2 recognition. The Journal of Experimental Medicine. 1981;153(5):1198-214.

99. Leo O, Foo M, Sachs DH, Samelson LE, Bluestone JA. Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1987;84(5):1374-8.

100. Calkhoven CF, Ab G. Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity. The Biochemical Journal. 1996;317 (Pt 2):329-42.

101. Porter BO, Malek TR. Prostaglandin E2 inhibits T cell activation-induced apoptosis and Fas-mediated cellular cytotoxicity by blockade of Fas-ligand induction. European Journal of Immunology. 1999;29(7):2360-5.

102. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. J Exp Med. 1995;182(5):1545-56.

103. Kojima N, Borlikova G, Sakamoto T, Yamada K, Ikeda T, Itohara S, et al. Inducible cAMP early repressor acts as a negative regulator for kindling epileptogenesis and long-term fear memory. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2008;28(25):6459-72.

104. Liu F, Thompson MA, Wagner S, Greenberg ME, Green MR. Activating transcription factor-1 can mediate Ca(2+)- and cAMP-inducible transcriptional activation. The Journal of Biological Chemistry. 1993;268(9):6714-20.

105. Masquilier D, Sassone-Corsi P. Transcriptional cross-talk: nuclear factors CREM and CREB bind to AP-1 sites and inhibit activation by Jun. The Journal of Biological Chemistry. 1992;267(31):22460-6.

106. Rengarajan J, Mittelstadt PR, Mages HW, Gerth AJ, Kroczek RA, Ashwell JD, et al. Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in FasL regulation. Immunity. 2000;12(3):293-300.

107. Holtz-Heppelmann CJ, Algeciras A, Badley AD, Paya CV. Transcriptional regulation of the human FasL promoter-enhancer region. J Biol Chem. 1998;273(8):4416-23.

108. Matsui K, Fine A, Zhu B, Marshak-Rothstein A, Ju ST. Identification of two NFkappa B sites in mouse CD95 ligand (Fas ligand) promoter: functional analysis in T cell hybridoma. J Immunol. 1998;161(7):3469-73.

109. Pigazzi M, Manara E, Baron E, Basso G. ICER expression inhibits leukemia phenotype and controls tumor progression. Leukemia. 2008;22(12):2217-25.

110. Bodor J, Bodorova J, Bare C, Hodge DL, Young HA, Gress RE. Differential inducibility of the transcriptional repressor ICER and its role in modulation of Fas ligand expression in T and NK lymphocytes. European Journal of Immunology. 2002;32(1):203-12.

111. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. J Biol Chem. 1987;262(12):5592-5.

112. Kleeff J, Kornmann M, Sawhney H, Korc M. Actinomycin D induces apoptosis and inhibits growth of pancreatic cancer cells. Int J Cancer. 2000;86(3):399-407.

113. Della Fazia MA, Servillo G, Sassone-Corsi P. Cyclic AMP signalling and cellular proliferation: regulation of CREB and CREM. FEBS Letters. 1997;410(1):22-4.

114. Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. Advanced Drug Delivery Reviews. 2009;61(9):746-59.





В

Query	1	MQQPFNYPYPQIYWVDSSASSPWAPPGTVLPCPTSVPRPGQRRPPPPPPPPPPPPPPP MOOD NYD DOT+WVDSSA+S WADDC+V DCD+ DD D ODDDDDDD DDD	60
Sbjet	1	MQQPMNYPCPQIFWVDSSATSSWAPPGSVFPCPSCGPRGPDQRRPPPPPPPPPPPSQ	60
Query	61	PPLPPLPLPPLKKRGNHSTGLCLLVMFFMVLVALVGLGLGMFQLFHLQKELAELRESTSQ	120
Sbjet	61	PLPLPPLTPLKKKDHNTNLWLPVVFFMVLVALVGMGLGMYQLFHLQKELAELREFTNQ	118
Query	121	MHTASSLEKQIGHPSPPPEKKELRKVAHLTGKSNSRSMPLEWEDTYGIVLLSGVKYKKGG	180
Sbjet	119	SLKVSSFEKQIANPSTPSEKKEPRSVAHLTGNPHSRSIPLEWEDTYGTALISGVKYKKGG	178
Query	181	LVINETGLYFVYSKVYFRGQSCNNLPLSHKVYMRNSKYPQDLVMMEGKMMSYCTTGQMWA	240
Sbjet	179	LVINETGLYFVYSKVYFRGQSCNNQPLNHKVYMRNSKYPEDLVLMEEKRLNYCTTGQIWA	238
Query	241	RSSYLGAVFNLTSADHLYVNVSELSLVNFEESQTFFGLYKL 281	
Sbjet	239	HSSHLGAVFNLTSADHLYVNISQLSLINFEESKTFFGLYKL 279	

**Figura 25.** *BLAST da proteína FASL humana e murina* (A) Representação do alinhamento, onde as cores indicam a similaridade entre as sequências analisadas da proteína FASL humano (*Query*) e murino (*Subject*). A linha vermelha representada abaixo do *Query* indica a similaridade entre as proteínas humano e murino em toda a extensão da sequência de bases. (B) Comparação da região protéica de humanos e murinos que possui similaridade. Traço vertical indica identidade entre nucleotídeos; Letras minúsculas cinzas indicam trechos mascarados; Traços horizontais indicam *"gaps"*.