

**JOSIAS BRITO FRAZÃO**

**EFEITO DO IFN- $\gamma$  E TNF- $\alpha$  SOBRE A EXPRESSÃO  
GÊNICA DE *CYBB* E PROCESSAMENTO DE SEUS  
TRANSCRITOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Antônio Condino Neto

Versão original

SÃO PAULO  
2014

## RESUMO

Frazão, JB. Efeito do IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  sobre a expressão gênica de *CYBB* e processamento de seus transcritos. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2014.

O sistema NADPH oxidase fagocítico humano é responsável pela geração de superóxido e outros reativos intermediários do oxigênio, críticos na defesa contra patógenos. Defeitos neste sistema resultam na doença granulomatosa crônica (DGC), caracterizado por infecções recorrentes graves. Nesta tese de doutorado, investigamos o efeito do IFN- $\gamma$  sobre eventos pós-transcricionais relativos à expressão do gene *CYBB* (gene da gp91-*phox*) em leucócitos de indivíduos saudáveis e de pacientes com DGC ligada ao X, ocasionada por defeitos de *splicing*. Analisamos a influência do IFN- $\gamma$  sobre o padrão de expressão das proteínas que compõem o *spliceossomo*, o padrão de expressão dos transcritos totais do gene *CYBB*, determinando o nível de expressão total dos transcritos e a atividade do sistema NADPH oxidase medindo a liberação de superóxido, avaliada antes e após o tratamento com IFN- $\gamma$ . A análise dos mecanismos que regulam a expressão e função deste sistema é de grande importância para a compreensão da fisiologia das células fagocíticas e de sua atividade microbicida. Os mecanismos que levam as diferentes formas clínicas de DGC não estão bem esclarecidos, da mesma forma que o efeito do IFN- $\gamma$  sobre esse sistema enzimático, justificando o presente estudo. Os dados obtidos nos permitem concluir que o IFN- $\gamma$  *in vitro* aumenta a expressão de transcritos do gene *CYBB* e *NCF1* tanto de células THP1, U937 e GM12878, quanto de células de linhagem B-EBV de indivíduos sadios e dos pacientes estudados. Além disso, o IFN- $\gamma$  causa modificações na expressão de genes relacionados à transcrição, ao processo de *splicing*, à genes de fatores de transcrição, genes relacionados à via do TNF- $\alpha$  e genes com *splicing* alternativos em células THP1, U937 e B-EBV. Observamos que o IFN- $\gamma$  *in vitro* diminui a expressão do gene *SRPK1* em células THP1, diminui a expressão dos genes *THOC4*, *NONO*, *SF3A1*, *SRRM1* e *UPF3A* e aumenta de expressão de *SRSF10*, *SRSF10*, *SNRPA1* e *C2* em células de paciente DGC secundária a defeitos de *splicing*. Identificamos que o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  induzem a ativação celular causando aumento da expressão das proteínas envolvidas no processo do *splicing*, ativando o spliceossoma. No modelo experimental utilizado, em camundongos, a presença do IFN- $\gamma$  e do TNF- $\alpha$  induzem um aumento da presença de neutrófilos ativados no sítio da inflamação e influem na produção de neutrófilos e na ativação destes na medula óssea. O IFN- $\gamma$  e o LPS aumentam a expressão dos genes do sistema NADPH oxidase mediante modificação de padrões de expressão de transcritos (isoformas, pseudogenes ou formas variantes em regiões codantes de mRNA). Concluímos que o IFN- $\gamma$  apresenta uma ação pleiotrópica sendo capaz de aumentar a expressão de genes importantes para uma resposta eficiente do sistema imunológico. Dentre os quais incluímos o sistema NADPH oxidase e genes e proteínas relacionados ao processo de *splicing*, que podem estar relacionados aos efeitos benéficos observados no uso do IFN- $\gamma$  em pacientes com DGC, ocasionada por defeitos de *splicing*.

**Palavras-chave:** Doença Granulomatosa Crônica ligado ao X. X-DGC. *Splicing*. IFN-gama. TNF-alpha.

## ABSTRACT

Frazão, JB. The effect of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  on *CYBB* gene expression and its transcripts processing. [PhD thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2014.

The human phagocyte NADPH oxidase is responsible for the generation of superoxide and other reactive oxygen intermediates, critical in the defense against pathogens. Defects in this system result in chronic granulomatous disease (CGD), which is characterized by severe recurrent infections. In this PhD Thesis, we investigated the effect of IFN- $\gamma$  on post-transcriptional events related to the expression of *CYBB* gene (gene of gp91-phox) in leukocytes of healthy individuals and of patients with X-linked CGD, caused by splicing defects. We analyzed the influence of IFN- $\gamma$  on the expression pattern of the proteins that composes the spliceosome, the expression pattern of total *CYBB* gene transcripts, determining the level of total expression of transcripts, and the NADPH oxidase activity by measuring superoxide release before and after IFN- $\gamma$  treatment. The analysis of the mechanisms that regulate the expression and function of this system is of great importance for the understanding of the physiology of phagocytic cells and its microbicidal activity. The mechanisms that leads to different clinical forms of CGD are not clear, as well as the IFN- $\gamma$  effect on this enzymatic system, justifying the present study. The obtained data allow us to conclude that *in vitro* IFN- $\gamma$  increases the mRNA expression of *CYBB* and *NCF1* gene transcripts, in THP1, U937, and GM12878 cells, as well as in the EBV-B cell lineage of healthy individuals and studied patients. In addition, IFN- $\gamma$  causes changes in the expression of genes related to transcription, splicing, genes related to the TNF- $\alpha$  pathway and genes with alternative splicing in THP1, U937, and B-EBV cell lines. We observed that *in vitro* IFN- $\gamma$  decreases *SRPK1* gene expression in THP1 cells, and decreases the expression of *THOC4*, *NONO*, *SF3A1*, *SRRM1*, *UPF3A* genes, and increases the expression of *SRSF10*, *SRSF10*, *SNRPA1*, and *C2* genes in cells from CGD patients, due to splicing defects. We found that IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  induce cell activation causing increased expression of proteins involved in the splicing process, thus activating the spliceosome. In the used experimental model, in mice, the presence of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  induce an increase of the number of activated neutrophils at the inflammation site and influence the production of neutrophils and its activation at the bone marrow. IFN- $\gamma$  and LPS increase the expression of the genes encoding the NADPH oxidase system by modifying expression patterns of transcripts (isoforms or variant pseudogenes in mRNA coding regions). We conclude that IFN- $\gamma$  present a pleiotropic effect able to increase the expression of important genes for an effective immune response. Among them we include the NADPH oxidase system, and genes and proteins related to the *splicing* process, which may be related to the beneficial effects related to the use of IFN- $\gamma$  in CGD patient caused by splicing defects.

**Key Words:** X linked Chronic Granulomatous Disease. X-CGD. Splicing. IFN-gamma. TNF-alpha.

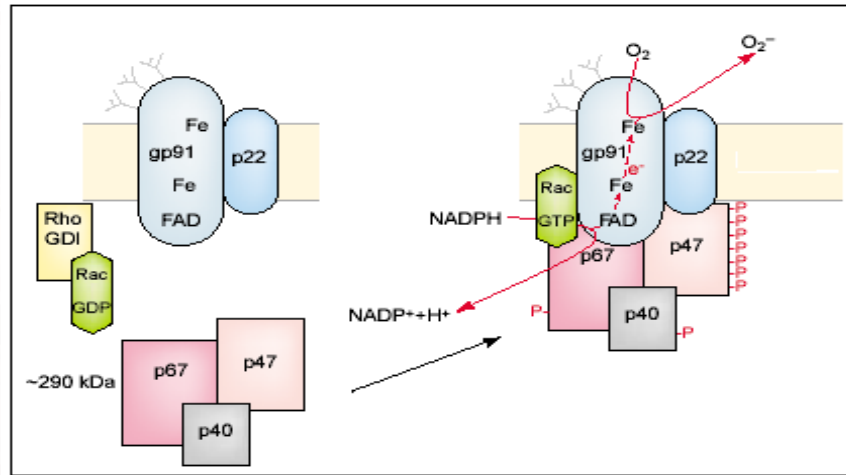
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença Granulomatosa Crônica (DGC)

A doença granulomatosa crônica (DGC), (OMIM # 306400, 233690, 233700, 233710, 608203) é uma imunodeficiência congênita caracterizada pela ocorrência precoce de infecções graves e recorrentes que afetam inicialmente as barreiras naturais do organismo, como os pulmões, nódulos linfáticos, pele e, eventualmente, órgãos como o fígado, baço, ossos e cérebro. A ocorrência de abscesso hepático é uma característica da DGC. A incidência estimada desta doença é 1/250.000 nascidos vivos por ano (1).

As infecções são geralmente causadas por bactérias catalase negativas, como *Staphylococcus aureus* e bacilos gram-negativos, e espécies de fungos, tais como *Aspergillus* e *Candida* (1). Outros patógenos incluem *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium violaceum*, *Nocardia*, e *Serratia marcescens* invasivos. Nos países em desenvolvimento como o Brasil, a vacina BCG causa efeitos adversos em até 20% dos pacientes com DGC (2).

O mecanismo imunopatológico da DGC é uma atividade microbicida defeituosa nos fagócitos, associada a uma falha da NADPH-oxidase de fagócitos ao produzir radicais livres derivados do oxigênio. Os defeitos moleculares que causam a DGC decorrem da ausência ou baixa expressão de um ou mais componentes do sistema NADPH-oxidase, levando a uma falha na explosão respiratória de fagócitos (1). A forma ligada ao X da doença é a mais frequente (aproximadamente 60%) e causada por defeitos na gp91-*phox* (proteína codificada pelo gene *CYBB*) (1). As formas autossômicas recessivas são causadas por defeitos em um dos componentes citosólicos da NADPH-oxidase: p47-*phox* (associado a aproximadamente 30% dos casos e codificado pelo gene *NCF1*), p67-*phox*, p22-*phox*, ou p40-*phox* (codificados pelos genes *NCF2*, *CYBA* e *NCF4* respectivamente; respondem em conjunto por 10% dos casos) (1). A p22-*phox* e gp91-*phox*, são os componentes de membrana e se associam formando o citocromo *b<sub>558</sub>* (cit *b<sub>558</sub>*) (3). Além destes, existem dois casos relatados de deficiência de RAC2 associada a uma explosão respiratória defeituosa e deficiência de adesão de leucócitos (4). Uma figura esquemática do sistema NADPH-oxidase é apresentada abaixo (**Figura 1**).



**Figura 1:** Sistema NADPH-oxidase. As duas subunidades de membrana, gp91-*phox* e p22-*phox*, formam o citocromo  $b_{558}$ . No citosol, após estímulo do sistema, as proteínas p40-*phox*, p47-*phox* e p67-*phox* formam um complexo que sofre alterações conformacionais e translocam-se até a membrana, ligando-se ao citocromo  $b_{558}$ . É no interior da gp91-*phox* que ocorre a transferência de elétrons para o oxigênio molecular.

A classificação atual da DGC foi proposta de acordo com o defeito molecular específico (5). O padrão de herança é definido por "A" para autossômica ou "X" para ligados ao X, enquanto o componente defeituoso é representado pelo peso molecular da proteína, "91", "22", "47", "67", ou "40", e o nível de expressão de proteína é designado como "0" para ausente, "+" para o presente, e "-" para reduzido. O fenótipo X91<sup>0</sup> é o mais frequente, resultado da ausência de expressão da gp91-*phox* e ausência de explosão respiratória. O fenótipo X91<sup>-</sup> é menos frequente e designa a forma variante leve da DGC. O fenótipo X91<sup>+</sup> possui níveis normais de gp91-*phox*, no entanto, a explosão respiratória é reduzida ou ausente. A maioria das formas autossômicas recessivas da DGC não apresenta expressão residual do componente defeituoso (fenótipos A22<sup>0</sup>, A47<sup>0</sup>, A67<sup>0</sup>). Dentre os defeitos genéticos encontrados em pacientes com DGC, existem deleções, inserções ou substituições. A diversidade dessas mutações e os vários genes afetados explicam a heterogeneidade clínica e genética encontrados na DGC (5, 6). Mutações próximas aos sítios de *splicing* que levam à DGC, por interferir com o processamento do RNA mensageiro, foram documentadas em 39 de 251 casos estudados (5, 7-9) A maioria das mutações que ocorrem em sítios de *splicing* acarretam no fenótipo X91<sup>0</sup> devido a deleção de um ou mais exons, isto é uma característica da maioria das mutações do tipo *splicing* que levam a DGC ligada ao sexo anteriormente documentadas (10). Entretanto, em uma minoria de casos, tais mutações levam ao fenótipo X91<sup>-</sup>, devido à manutenção parcial do *splicing* normal (2, 5).

Mutações no gene *CYBB* são encontradas em cerca de 70% de todos os pacientes com DGC. Publicações mais recentes analisaram 1267 famílias não relacionadas com 1415 pacientes com DGC ligado ao X e identificaram um total de 681 mutações diferentes. Destas 681 mutações, 498 mutações (73,1%) são exclusivas de uma família. Documentaram a deleções (35,6%), inserções (7,9%), deleções/inserções (2,8%), mutações em sítios de *splicing* (17,6%), mutações *missense* (21,3%), mutações *nonsense* (14,1%) e mutações em sítios promotores (0,7%). Além disso, polimorfismos aparentemente benignos no *CYBB* também se encontram descritos (6).

O manejo de pacientes com DGC inclui o uso de antibióticos profiláticos, antifúngicos e IFN- $\gamma$ , juntamente com o tratamento prolongado e agressivo de infecções (1, 7, 11). O uso de IFN- $\gamma$  na dose de 50mcg/m<sup>2</sup> dado 3 vezes na semana é bem tolerado e reduz em 70% a ocorrência de infecções graves de acordo com o The International CGD Cooperative Study Group (12), sendo esta observação corroborada por outros estudos (13-15). O transplante de medula óssea e terapia gênica oferece cura em potencial para DGC, embora com risco e toxicidade considerável (16).

## **1.2 Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e Doença Granulomatosa Crônica (DGC)**

As citocinas regulam a proliferação e diferenciação de linfócitos na fase de ativação da resposta imune adaptativa e medeia a ativação de células efetoras especializadas na fase final da imunidade adaptativa. No entanto, elas são também importantes em vários processos mediados pela resposta imune inata. Dentre as várias citocinas, o IFN- $\gamma$  produzido por células T CD4<sup>+</sup> e células NK, ativa macrófagos, promove a diferenciação de células Th1 e inibe a proliferação de células Th2. O IFN- $\gamma$  estimula a atividade microbicida dos fagócitos, a síntese de reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio, e a produção de opsoninas e anticorpos IgG fixadores de complemento (17). O IFN- $\gamma$  exerce seus efeitos a nível celular ao interagir com receptores específicos para o IFN- $\gamma$  (composto por duas subunidades, IFNGR1 e IFNGR2). A ligação do IFN- $\gamma$  ao seu receptor induz sua oligomerização e ativação, via transfosforilação, do receptor-associado à Janus Kinases 1 e 2 (JAK1 e JAK2). A ativação das JAKs fosforilam o domínio intracelular do receptor (como exemplo, tirosina 440 do IFNGR1 humano) que serve como sítio de ligação para o *Signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1). O STAT1 é fosforilado na tirosina 701, sofre dimerização, transloca para o núcleo e regula a expressão gênica por meio da ligação aos elementos *Gamma-*

*activated sequence* (GAS) nos promotores dos genes regulados pelo IFN- $\gamma$  (18). Algumas quinases podem fosforilar o STAT1 na Serina 727 (Ser727). Essa fosforilação não é requerida para a translocação do STAT1 para o núcleo ou para sua ligação aos promotores. No entanto, é essencial para a ativação transcricional completa. Estas quinases incluem *Protein kinase C delta* (PKC-delta) e *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II* (CaMK II) (19, 20). O IFN- $\gamma$  ativa a via de sinalização do *Phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K)/*v-AKT murine thymoma viral oncogene homolog* (AKT), possivelmente por meio do adaptador Cas-Br-M, sequência transformadora ecotrópica retroviral (c-Cbl) que se liga a subunidade reguladora do PI3K (PI3K reg class 1A). PKC-delta é uma molécula efetora da via do PI3K (21). Embora o mecanismo de ativação do PKC-delta dependente do PI3K ainda não tenha sido esclarecido, a fosforilação do PKC-delta dependente do PI3K pelo *3-Phosphoinositide dependent protein kinase-1* (PDPK1) já foi descrito (22).

O IFN- $\gamma$  também induz ativação do *v-CRK avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like* (CrkL) mediado pelo c-Cbl, o que propicia uma ligação entre o receptor de IFN- $\gamma$  e *Rap guanine nucleotide exchange factor 1* (C3G) e resulta na ativação do RAPIA (membro da família do oncogene RAS, Rap1A), uma proteína conhecida por suprimir tumor e mediar respostas inibitórias de crescimento de forma dependente do IFN- $\gamma$  (23).

IFN- $\gamma$  também induz a fosforilação de *Phospholipase C gamma 2* (PLC-gamma 2) por JAK1/2. Diacilglicerol (DAG) é o produto da atividade enzimática de *PLC-gamma 2* que pode ativar algumas das isoformas da protein kinase C, incluindo PKC-alpha. O PKC-alpha pode estimular a atividade da *tyrosine-protein kinase SRC-1* (c-Src). Apesar de PKC-alpha fosforilar o c-Src de forma direta, *Actin filament associated protein* (AFAP) é essencial para esta ativação do c-Src (24). c-Src por sua vez ativa STAT1 pela fosforilação na tirosina 701. Esta indução da via PLC-gamma 2/PKC-alpha/c-Src/STAT1 pelo IFN- $\gamma$  causa a expressão do gene do *Intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) (25).

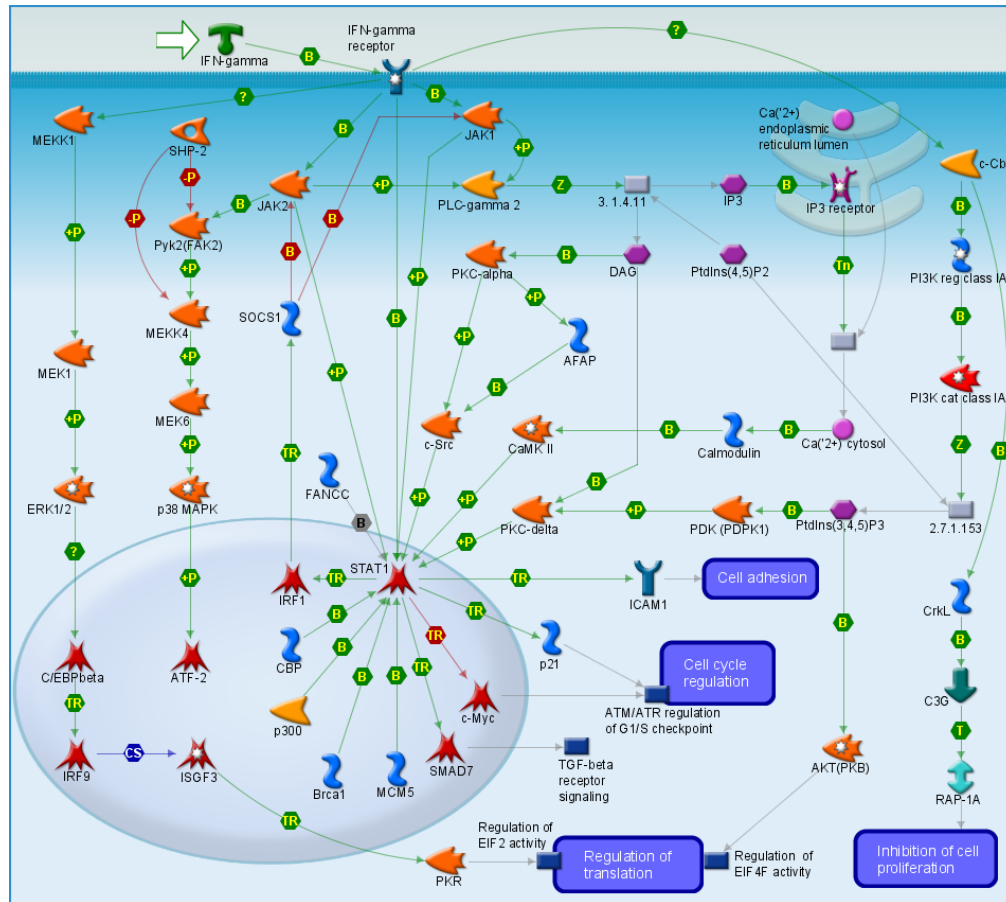
Há vários alvos conhecidos do STAT1 na sinalização mediada pelo IFN- $\gamma$  como o *SMAD family member 7* (SMAD7), *Interferon regulatory factor 1* (IRF1) e proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular, como por exemplo, *v-Myc myelocytomatosis viral oncogene homolog* (c-Myc) e *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A* (p21) (26, 27). IRF1 participa na ativação do *Suppressor of cytokine signaling-1* (SOCS-1). A proteína SOCS-1 é crítico para a inibição de respostas do IFN- $\gamma$  (28). O IFN- $\gamma$  induz a expressão de SOCS1 indiretamente, pela indução da expressão do fator de transcrição IRF-1 via STAT1. IRF-1 por sua vez estimula a transcrição do gene SOCS-1 (29).

Várias proteínas interagem com STAT1 e modulam sua atividade transcricional: *CREB-binding proteins* (CBP e p300), *Minichromosome maintenance protein 5* (MCM5) e *Breast cancer susceptibility gene 1* (BRCA1). CBP e p300 possuem atividade histona acetil transferase e funcionam como co-activators. MCM5 e BRCA1 se associam com STAT1 fosforilado e aumentam sua atividade transcricional (18).

Adicionalmente, IFN- $\gamma$  pode ativar a via independente de JAK-STAT. A tirosina quinase dependente de calcio, *PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta* (Pyk2(FAK2)) é substrato para JAK2. Pyk2(FAK2) fosforila *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4* (MEKK4). MEKK4 fosforilada por sua vez fosforila *Mitogen-activated protein kinase kinase 6* (MEK6). Subsequentemente, MEK6 fosforila p38 MAPK que fosforila e ativa *Activating transcription factor 2* (ATF-2). A *Protein-tyrosine phosphatase 2C* (SHP-2) regula esta via de sinalização através da defosforilação do MEKK4 e de sua quinase ativadora, Pyk2(FAK2) (30).

Outra via estimulado pelo IFN- $\gamma$  envolve o *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1* (MEKK1), *Mitogen-activated protein kinase kinase 1* (MEK1) e *Extracellular signal-regulated protein kinases 1 e 3* (ERK1/2). A cascata MEKK1/MEK1/ERK1/2 regula a atividade de *CCAAT/enhancer binding protein beta* (C/EBP-beta) e expressão induzida pelo gene *Interferon regulatory factor 9* (IRF9) pelo C/EBP-beta. IRF9 é a subunidade do complexo transcricional ISGF3 que participa na sinalização do interferon (31). Uma figura esquemática das vias de ativação celular mediado pelo IFN- $\gamma$  é apresentada abaixo (**Figura 2**).





**Figura 2:** Vias de ativação celular mediado pelo IFN- $\gamma$ . O IFN- $\gamma$  produzido por células T CD4<sup>+</sup> e células NK, ativa macrófagos, promove a diferenciação de células Th1 e inibe a proliferação de células Th2. O IFN- $\gamma$  estimula a atividade microbicida dos fagócitos, a síntese de reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio, a produção de opsoninas e anticorpos IgG fixadores de complemento (17). O IFN- $\gamma$  une-se a receptores específicos da membrana celular e ativa tirosina quinases da família Janus (JAK1 e JAK2) associadas com seu receptor. As quinases fosforilam e ativam um fator de transcrição citoplasmático latente, STAT-1 $\alpha$ , que logo após transloca para núcleo como um homodímero ativo (fator de ativação de IFN- $\gamma$ ) (32).

**FONTE:** [http://pathwaymaps.com/maps/432\\_map.png](http://pathwaymaps.com/maps/432_map.png)

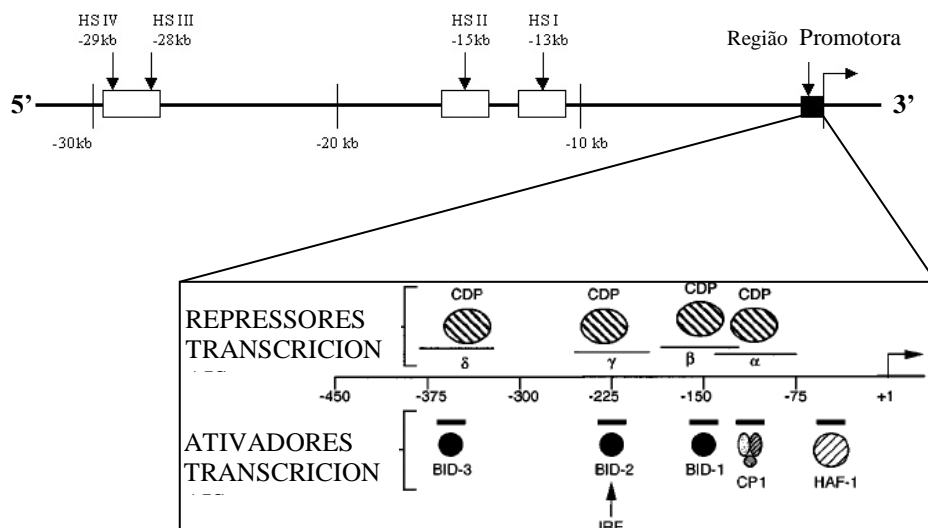
Outras citocinas também apresentam papel importante na regulação da inflamação, pelo menos em parte por seus efeitos moduladores sobre o sistema NADPH-oxidase (13, 33-35). O IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  induzem células HL-60 clone 15 a se diferenciar numa linhagem eosinofílica após dois dias de cultura (36), liberar superóxido em quantidades relevantes e expressar transcritos para os componentes gp91-*phox* e p47-*phox* do sistema NADPH-oxidase, sendo o mesmo observado com as células mielomonocíticas THP-1 (37). Não só o IFN- $\gamma$  (38) e o TNF- $\alpha$  (9), mas também a IL-5 (39) regulam positivamente o sistema NADPH-oxidase em diferentes linhagens celulares. O IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  incrementam a

quimiluminescência dependente de luminol e a liberação de peróxido de hidrogênio pelas células EoL-1 (40, 41), o IFN- $\gamma$  induz a expressão gênica do *CYBB*, coincidindo com a diferenciação monócítica de progenitores (42) e incrementa sua transcrição em monócitos maduros *ex vivo* (43).

Dois mecanismos de regulação positivos têm sido propostos para explicar a transcrição do *CYBB* induzida por IFN- $\gamma$ . Um mecanismo é a união de BID/YY1 a quatro sítios de uma região de -90 a -355 pb do promotor após dissociação de CDP do gene (44, 45). O outro é a união de um complexo multiprotéico (PU.1/HAF-1) localizado a -53 do promotor (46, 47), embora seja proposta a formação de um grande complexo composto por STAT-1 $\alpha$ , IRF-1, PU.1, ICSBP e CBP no promotor proximal do *CYBB* após a estimulação com IFN- $\gamma$  (48). A **Figura 3** mostra um esboço de alguns elementos transcripcionais ativadores e repressores que competem pela ligação à região promotora do gene *CYBB*. Anrather et al., (2006) demonstraram que o NF- $\kappa$ B está envolvido na transcrição do gene codificador do componente gp91-*phox* da NADPH-oxidase em modelo experimental murino (49). Estudos realizados em células de pacientes com displasia ectodérmica anidrótica (EDA-ID), uma imunodeficiência humana relacionada a defeitos na ativação do NF- $\kappa$ B, revelaram que a expressão do *CYBB* e atividade do *burst* oxidativo encontram-se diminuídas quando comparados com células de indivíduos saudáveis e apresentam valores similares aos encontrados em pacientes com DGC ligado ao X (X91<sup>0</sup> DGC). Valores similares de expressão do gene *NCF1* foram encontrados entre células S32I EDA-ID e DGC com forma autossômica recessiva (A47<sup>0</sup>). Estes resultados demonstram que o NF- $\kappa$ B é necessário para a expressão gênica do *CYBB* e *NCF1* e ativação da NADPH oxidase de fagócitos (50).

Uma vez que o IFN- $\gamma$  é capaz de induzir a expressão gênica do *CYBB*, isso propiciou em parte, a base para o uso clínico do IFN- $\gamma$  para a prevenção de infecções em pacientes com DGC – The International CGD Cooperative Study Group (12). O IFN- $\gamma$  humano recombinante está indicado na dose de 50  $\mu$ g/m<sup>2</sup> de superfície corporal, por via subcutânea, três vezes por semana. Ele reduz em 70% o risco da ocorrência de infecções graves. Embora seu mecanismo de ação não esteja totalmente esclarecido, atribui-se muito de seus efeitos benéficos à estimulação do sistema NADPH-oxidase, agindo particularmente bem nas formas variantes e autossômicas recessivas de DGC (12, 15, 35, 51). Dados provenientes do nosso grupo demonstram que o IFN- $\gamma$  corrige parcialmente o fenótipo de uma forma variante de DGC ligada ao sexo, ao melhorar a fidelidade do *splicing* no primeiro intron do gene *CYBB* e

aumentar a exportação nuclear de transcritos estáveis deste gene para o citoplasma (13), fato corroborado por outros estudos de outros grupos de pesquisa (52, 53).



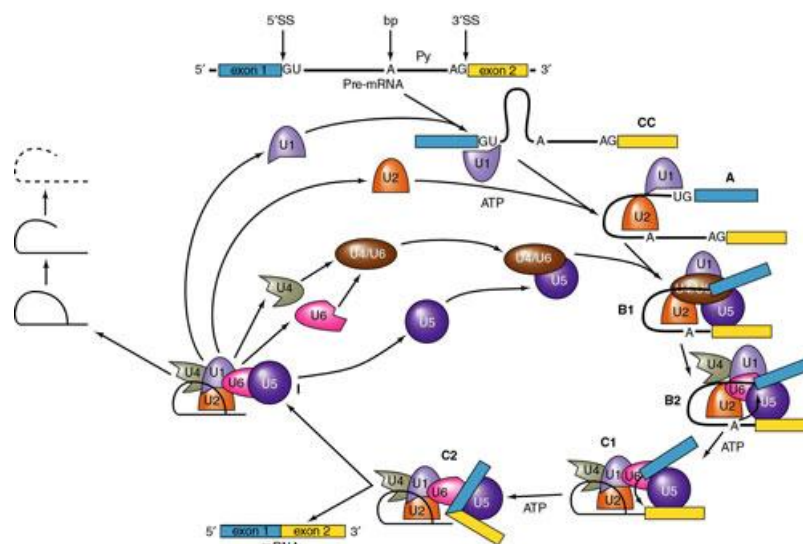
**Figura 3.** Região promotora do gene *CYBB*. Os repressores transcricionais (CDP) competem com fatores ativadores de transcrição por quatro sítios de ligação dentro da região promotora do gene codificador do componente gp91 *phox* da NADPH-oxidase. +1 indica o sítio transcrição inicial. Linhas acima de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , indicam posições de cada um dos quatro oligonucleotídeos utilizados como sítios de ligação para CDP. Barras acima dos fatores de ativação transcricional denotam correspondência à DNase I

**FONTE:** Adaptado de: (44).

Em nosso laboratório, investigamos o efeito do IFN- $\gamma$  num grupo de pacientes com defeitos de *splicing* no gene *CYBB*, sendo esses casos aparentemente os que mais se beneficiam desta citocina. Demonstramos que o IFN- $\gamma$  promove aumento da expressão de transcritos totais do gene *CYBB* e aumento na marcação de fatores anti-núcleo (Fapesp 06/51005-9), demonstrando que o IFN- $\gamma$  pode estar envolvido na ativação do complexo spliceossoma e dessa forma auxiliando na correção do fenótipo visto em estudos anteriores (13, 52, 53).

Após o processo de transcrição, os precursores de mRNA de células eucarióticas contêm exons codificadores de proteínas e introns não-codificantes. No *splicing*, processo que ocorre posterior à transcrição, os introns são excisados e os exons unidos por um complexo macromolecular chamado spliceossoma. O spliceossoma é um macro-complexo que compreende centenas de proteínas com várias interações funcionais. Uma figura esquemática do processo de *splicing* encontra-se representada na **Figura 4**. O spliceossoma padrão é

constituído por cinco pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs): U1, U2, U4, U5 e U6 snRNPs, e várias proteínas spliceossomais associadas (spliceosome-associated proteins, SAP). Spliceossomas não são um complexo estável simples, mas uma família dinâmica de partículas que se reúnem no mRNA precursor para dobrá-lo numa conformação que permita a transesterificação. Várias formas de spliceossoma (por exemplo, Complexos A-, B-e C-) têm sido identificadas. O processo de formação do spliceossoma pertence a um processo chave que possibilita o *splicing* de mRNA e a modulação de *splicing* alternativos. Uma lista detalhada de fatores envolvidos em reações spliceossomais foi construída ao longo dos anos, porém suas interrelações funcionais são ainda pouco exploradas e conhecidas. É uma tarefa desafiadora a montagem de um modelo biológico e computacional para a realização de um estudo da dinâmica do *splicing* que integre conhecimento multidisciplinar. O nosso modelo de estudo visa analisar a dinâmica do *splicing* nos leucócitos de um grupo de pacientes com DCG secundária a defeitos de *splicing* que reconhecidamente se beneficiam da terapia de IFN- $\gamma$  para o restabelecimento pelo menos parcial, da atividade do sistema NADPH-oxidase. Buscamos no presente estudo elucidar alguns questionamentos sobre o mecanismo de *splicing* que corrige transcritos truncados do *CYBB* e definir perfis de expressão gênica que se encontram modificados quando se estimula os leucócitos com IFN- $\gamma$ .



**Figura 4.** A formação do Spliceossoma e a representação do *Splicing*. A remoção dos introns exige um complexo formado por um complexo ribonucleoprotéico, chamado spliceossomo. Esse complexo reconhece o início e fim dos íntrons, depois os unem, formando uma alça que então é cortada.

**FONTE:** <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/mike/spring2003/spliceosome.jpg>

## 2 CONCLUSÃO

Os dados obtidos com o presente trabalho nos permitem concluir que:

1. O uso do IFN- $\gamma$  interfere no processamento da mensagem do RNAm causando modificação nos padrões de expressão de transcritos dos genes da NADPH-oxidase (*CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* e *NOX1*), fator de splicing 2 rico em arginina/serina (*SFRS2*) e para os genes das proteínas spliceossomais U2, U5, U6 snRNPs (*SF3B4*, *PRPF8* e *LSM2*);
2. O uso do IFN- $\gamma$  interfere no processamento da mensagem do RNAm aumentando a expressão de transcritos do gene *CYBB* e *NCF1* ambos componentes do sistema NADPH oxidase tanto de células THP1 U937 e GM12878 quanto de células de linhagem BEBV de indivíduos sadios e dos pacientes estudados;
3. O IFN- $\gamma$  causa modificações na expressão de transcritos relacionados a transcrição, ao processo de *splicing*, à genes de fatores de transcrição, genes relacionados à via do TNF- $\alpha$  e em genes com *splicing* alternativos em células THP1, U937 e B-EBV;
4. O IFN- $\gamma$  causa modificações de expressão do gene *SRPK1* em células THP1, e alterações de expressão dos genes *THOC4*, *NONO*, *SF3A1*, *SRRM1*, *UPF3A*, *SRSF10*, *SRSF10*, *SNRPA1* e *C2* em células de pacientes DGC ocasionados por defeitos de *splicing* analisados;
5. O IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  são capaz de induzir a ativação celular causando um aumento da expressão das proteínas envolvidas no processo do *splicing*, ativando dessa maneira o spliceossoma;
6. A presença do IFN- $\gamma$  e do TNF- $\alpha$  induzem um aumento da presença de neutrófilos ativados no sítio da inflamação e influem na produção de neutrófilos e na ativação destes no compartimento da medula óssea em camundongos;
7. O IFN- $\gamma$  e o LPS causam modificação em níveis de expressão dos genes do sistema NADPH oxidase através da modificação de padrões de expressão desses transcritos (isoformas, pseudogenes ou formas variantes em regiões codantes de mRNA) em neutrófilos purificados da medula óssea em camundongos sob estimulação *in vitro*.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

1. Holland SM. Chronic granulomatous disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2010 Feb;38(1):3-10.
2. de Oliveira-Junior EB, Bustamante J, Newburger PE, Condino-Neto A. The human NADPH oxidase: primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes. *Scand J Immunol*. 2011 May;73(5):420-7.
3. Burg ND, Pillinger MH. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol*. 2001 Apr;99(1):7-17.
4. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest*. 1973 Mar;52(3):741-4.
5. Rae J, Newburger PE, Dinauer MC, Noack D, Hopkins PJ, Kuruto R, et al. X-Linked chronic granulomatous disease: mutations in the CYBB gene encoding the gp91-phox component of respiratory-burst oxidase. *Am J Hum Genet*. 1998 Jun;62(6):1320-31.
6. Roos D, Kuhns DB, Maddalena A, Roesler J, Lopez JA, Ariga T, et al. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (third update). *Blood Cells Mol Dis*. 2010 Oct 15;45(3):246-65.
7. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB, Jr., Boyle J, Curnutte J, Gallin JI, et al. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2000 May;79(3):155-69.
8. Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)*. 2000 May;79(3):170-200.
9. Roos D, de Boer M, Kuribayashi F, Meischl C, Weening RS, Segal AW, et al. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood*. 1996 Mar 1;87(5):1663-81.
10. de Boer M, Bolscher BG, Dinauer MC, Orkin SH, Smith CI, Ahlin A, et al. Splice site mutations are a common cause of X-linked chronic granulomatous disease. *Blood*. 1992 Sep 15;80(6):1553-8.
11. Johnston RB, Jr. Clinical aspects of chronic granulomatous disease. *Curr Opin Hematol*. 2001 Jan;8(1):17-22.

---

<sup>1</sup> De acordo com:

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

12. A controlled trial of interferon gamma to prevent infection in chronic granulomatous disease. The International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group. *N Engl J Med*. 1991 Feb 21;324(8):509-16.
13. Condino-Neto A, Newburger PE. Interferon-gamma improves splicing efficiency of CYBB gene transcripts in an interferon-responsive variant of chronic granulomatous disease due to a splice site consensus region mutation. *Blood*. 2000. Jun 1;95(11):3548-54.
14. Marciano BE, Wesley R, De Carlo ES, Anderson VL, Barnhart LA, Darnell D, et al. Long-term interferon-gamma therapy for patients with chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis*. 2004. Sep 1;39(5):692-9.
15. Ezekowitz RA, Dinauer MC, Jaffe HS, Orkin SH, Newburger PE. Partial correction of the phagocyte defect in patients with X-linked chronic granulomatous disease by subcutaneous interferon gamma. *N Engl J Med*. 1988 Jul 21;319(3):146-51.
16. Ott MG, Seger R, Stein S, Siler U, Hoelzer D, Grez M. Advances in the treatment of Chronic Granulomatous Disease by gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2007 Jun;7(3):155-61.
17. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.
18. Ramana CV, Gil MP, Schreiber RD, Stark GR. Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol*. 2002 Feb;23(2):96-101.
19. DeVries TA, Kalkofen RL, Matassa AA, Reyland ME. Protein kinase Cdelta regulates apoptosis via activation of STAT1. *J Biol Chem*. 2004 Oct 29;279(44):45603-12.
20. Nair JS, DaFonseca CJ, Tjernberg A, Sun W, Darnell JE, Jr., Chait BT, et al. Requirement of Ca<sup>2+</sup> and CaMKII for Stat1 Ser-727 phosphorylation in response to IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Apr 30;99(9):5971-6.
21. Deb DK, Sassano A, Lekmine F, Majchrzak B, Verma A, Kambhampati S, et al. Activation of protein kinase C delta by IFN-gamma. *J Immunol*. 2003 Jul 1;171(1):267-73.
22. Belham C, Wu S, Avruch J. Intracellular signalling: PDK1--a kinase at the hub of things. *Curr Biol*. 1999 Feb 11;9(3):R93-6.
23. Alsayed Y, Uddin S, Ahmad S, Majchrzak B, Druker BJ, Fish EN, et al. IFN-gamma activates the C3G/Rap1 signaling pathway. *J Immunol*. 2000. Feb 15;164(4):1800-6.
24. Chang YJ, Holtzman MJ, Chen CC. Differential role of Janus family kinases (JAKs) in interferon-gamma-induced lung epithelial ICAM-1 expression: involving protein interactions between JAKs, phospholipase Cgamma, c-Src, and STAT1. *Mol Pharmacol*. 2004 Mar;65(3):589-98.
25. Gatesman A, Walker VG, Baisden JM, Weed SA, Flynn DC. Protein kinase Calpha activates c-Src and induces podosome formation via AFAP-110. *Mol Cell Biol*. 2004 Sep;24(17):7578-97.

26. Ramana CV, Grammatikakis N, Chernov M, Nguyen H, Goh KC, Williams BR, et al. Regulation of c-myc expression by IFN-gamma through Stat1-dependent and -independent pathways. *EMBO J*. 2000 Jan 17;19(2):263-72.
27. Chin YE, Kitagawa M, Su WC, You ZH, Iwamoto Y, Fu XY. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science*. 1996 May 3;272(5262):719-22.
28. Alexander WS, Starr R, Fenner JE, Scott CL, Handman E, Sprigg NS, et al. SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell*. 1999 Sep 3;98(5):597-608.
29. Saito H, Morita Y, Fujimoto M, Narazaki M, Naka T, Kishimoto T. IFN regulatory factor-1-mediated transcriptional activation of mouse STAT-induced STAT inhibitor-1 gene promoter by IFN-gamma. *J Immunol*. 2000 Jun 1;164(11):5833-43.
30. Halfter UM, Derbyshire ZE, Vaillancourt RR. Interferon-gamma-dependent tyrosine phosphorylation of MEKK4 via Pyk2 is regulated by annexin II and SHP2 in keratinocytes. *Biochem J*. 2005 May 15;388(Pt 1):17-28.
31. Roy SK, Hu J, Meng Q, Xia Y, Shapiro PS, Reddy SP, et al. MEKK1 plays a critical role in activating the transcription factor C/EBP-beta-dependent gene expression in response to IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Jun 11;99(12):7945-50.
32. Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:293-322.
33. Condino-Neto A, Newburger PE. NADPH oxidase activity and cytochrome b558 content of human Epstein-Barr-virus-transformed B lymphocytes correlate with expression of genes encoding components of the oxidase system. *Arch Biochem Biophys*. 1998 Dec 15;360(2):158-64.
34. Cox G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol*. 1995 May 1;154(9):4719-25.
35. Errante PR, Frazao JB, Condino-Neto A. The use of interferon-gamma therapy in chronic granulomatous disease. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2008 Nov;3(3):225-30.
36. Lopez JA, Newburger PE, Condino-Neto A. The effect of IFN-gamma and TNF-alpha on the eosinophilic differentiation and NADPH oxidase activation of human HL-60 clone 15 cells. *J Interferon Cytokine Res*. 2003 Dec;23(12):737-44.
37. Condino-Neto A, Whitney C, Newburger PE. Dexamethasone but not indomethacin inhibits human phagocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity by down-regulating expression of genes encoding oxidase components. *J Immunol*. 1998 Nov 1;161(9):4960-7.
38. Newburger PE, Ezekowitz RA. Cellular and molecular effects of recombinant interferon gamma in chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1988 Jun;2(2):267-76.



39. Horie S, Gleich GJ, Kita H. Cytokines directly induce degranulation and superoxide production from human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 1996 Aug;98(2):371-81.
40. Yoshie O, Majima T, Saito H. Membrane oxidative metabolism of human eosinophilic cell line EoL-1 in response to phorbol diester and formyl peptide: synergistic augmentation by interferon-gamma and tumor necrosis factor. *J Leukoc Biol.* 1989 Jan;45(1):10-20.
41. Ohtsu H, Yamauchi K, Yoshie O, Tanno Y, Saito H, Hayashi N, et al. The effect of cytokines on the differentiation of an eosinophilic leukemia cell line (EoL-1) is associated with down regulation of c-myc gene expression. *Cell Struct Funct.* 1993 Apr;18(2):125-33.
42. Cassatella MA, Hartman L, Perussia B, Trinchieri G. Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically induce cytochrome b-245 heavy-chain gene expression and nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate hydrogenase oxidase in human leukemic myeloid cells. *J Clin Invest.* 1989 May;83(5):1570-9.
43. Newburger PE, Ezekowitz RA, Whitney C, Wright J, Orkin SH. Induction of phagocyte cytochrome b heavy chain gene expression by interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988 Jul;85(14):5215-9.
44. Eklund EA, Luo W, Skalnik DG. Characterization of three promoter elements and cognate DNA binding protein(s) necessary for IFN-gamma induction of gp91-phox transcription. *J Immunol.* 1996 Sep 15;157(6):2418-29.
45. Jacobsen BM, Skalnik DG. YY1 binds five cis-elements and trans-activates the myeloid cell-restricted gp91(phox) promoter. *J Biol Chem.* 1999 Oct 15;274(42):29984-93.
46. Eklund EA, Jalava A, Kakar R. PU.1, interferon regulatory factor 1, and interferon consensus sequence-binding protein cooperate to increase gp91(phox) expression. *J Biol Chem.* 1998 May 29;273(22):13957-65.
47. Eklund EA, Kakar R. Recruitment of CREB-binding protein by PU.1, IFN-regulatory factor-1, and the IFN consensus sequence-binding protein is necessary for IFN-gamma-induced p67phox and gp91phox expression. *J Immunol.* 1999 Dec 1;163(11):6095-105.
48. Kumatori A, Yang D, Suzuki S, Nakamura M. Cooperation of STAT-1 and IRF-1 in interferon-gamma-induced transcription of the gp91(phox) gene. *J Biol Chem.* 2002 Mar 15;277(11):9103-11.
49. Anrather J, Racchumi G, Iadecola C. NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. *J Biol Chem.* 2006 Mar 3;281(9):5657-67.
50. Luengo-Blanco M, Prando C, Bustamante J, Aragao-Filho WC, Pereira PV, Rehder J, et al. Essential role of nuclear factor-kappaB for NADPH oxidase activity in normal and anhidrotic ectodermal dysplasia leukocytes. *Blood.* 2008 Aug 15;112(4):1453-60.
51. Condino-neto A, Muscara MN, Bellinati-Pires R, Carneiro-Sampaio MM, Brandao AC, Grumach AS, et al. Effect of therapy with recombinant human interferon-gamma on the

release of nitric oxide by neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease. *J Interferon Cytokine Res.* 1996 May;16(5):357-64.

52. Ishibashi F, Mizukami T, Kanegasaki S, Motoda L, Kakinuma R, Endo F, et al. Improved superoxide-generating ability by interferon gamma due to splicing pattern change of transcripts in neutrophils from patients with a splice site mutation in CYBB gene. *Blood.* 2001 Jul 15;98(2):436-41.

53. Nunoi H, Ishibashi F, Mizukami T, Hidaka F. Clinical evaluation of interferon-gamma treatment to chronic granulomatous disease patients with splice site mutations. *Jpn J Infect Dis.* 2004 Oct;57(5):S25-6.

54. Chapel H. Classification of primary immunodeficiency diseases by the International Union of Immunological Societies (IUIS) Expert Committee on Primary Immunodeficiency 2011. *Clin Exp Immunol.* 2012 Apr;168(1):58-9.

55. Heyworth PG, Curnutte JT, Rae J, Noack D, Roos D, van Koppen E, et al. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (second update). *Blood Cells Mol Dis.* 2001 Jan-Feb;27(1):16-26.

56. Ezekowitz RA, Orkin SH, Newburger PE. Recombinant interferon gamma augments phagocyte superoxide production and X-linked chronic granulomatous disease gene expression in X-linked variant chronic granulomatous disease. *J Clin Invest.* 1987 Oct;80(4):1009-16.

57. Forrest CB, Forehand JR, Axtell RA, Roberts RL, Johnston RB, Jr. Clinical features and current management of chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1988 Jun;2(2):253-66.

58. Agudelo-Florez P, Prando-Andrade CC, Lopez JA, Costa-Carvalho BT, Quezada A, Espinosa FJ, et al. Chronic granulomatous disease in Latin American patients: clinical spectrum and molecular genetics. *Pediatr Blood Cancer.* 2006 Feb;46(2):243-52.

59. Noack D, Heyworth PG, Newburger PE, Cross AR. An unusual intronic mutation in the CYBB gene giving rise to chronic granulomatous disease. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Sep 28;1537(2):125-31.

60. Cassatella MA, Bazzoni F, Flynn RM, Dusi S, Trinchieri G, Rossi F. Molecular basis of interferon-gamma and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components. *J Biol Chem.* 1990 Nov 25;265(33):20241-6.

61. Schapiro BL, Newburger PE, Klempner MS, Dinauer MC. Chronic granulomatous disease presenting in a 69-year-old man. *N Engl J Med.* 1991 Dec 19;325(25):1786-90.

62. Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Altare F, Fondaneche MC, Tuerlinckx D, Blanche S, et al. Partial interferon-gamma receptor 1 deficiency in a child with tuberculoid bacillus Calmette-Guerin infection and a sibling with clinical tuberculosis. *J Clin Invest.* 1997 Dec 1;100(11):2658-64.

63. Segal AW, Abo A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem Sci.* 1993 Feb;18(2):43-7.
64. Parkos CA, Allen RA, Cochrane CG, Jesaitis AJ. Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. *J Clin Invest.* 1987 Sep;80(3):732-42.
65. Kjeldsen L, Bainton DF, Sengelov H, Borregaard N. Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation. *Blood.* 1993 Nov 15;82(10):3183-91.
66. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 2001 Dec;25(4):386-401.
67. Morris P, Stetler DA. Monoclonal antibody against the lupus antigen Sm cross-reacts with RNA polymerase I. *Autoimmunity.* 1989;2(3):241-51.
68. Nojima Y, Minota S, Yamada A, Takaku F. Identification of an acidic ribosomal protein reactive with anti-Sm autoantibody. *J Immunol.* 1989 Sep 15;143(6):1915-20.
69. Misaki Y, Yamamoto K, Yanagi K, Miura H, Ichijo H, Kato T, et al. B cell epitope on the U1 snRNP-C autoantigen contains a sequence similar to that of the herpes simplex virus protein. *Eur J Immunol.* 1993 May;23(5):1064-71.
70. Lerner MR, Boyle JA, Hardin JA, Steitz JA. Two novel classes of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with lupus erythematosus. *Science.* 1981 Jan 23;211(4480):400-2.
71. Venables PJ, Smith PR, Maini RN. Purification and characterization of the Sjogren's syndrome A and B antigens. *Clin Exp Immunol.* 1983 Dec;54(3):731-8.
72. Wolin SL, Steitz JA. The Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins: identification of the antigenic protein and its binding site on the Ro RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984 Apr;81(7):1996-2000.
73. Yamagata H, Harley JB, Reichlin M. Molecular properties of the Ro/SSA antigen and enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibody. *J Clin Invest.* 1984 Aug;74(2):625-33.
74. Rinke J, Steitz JA. Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell.* 1982 May;29(1):149-59.
75. Pruijn GJ, Slobbe RL, Van Venrooij WJ. Structure and function of La and Ro RNPs. *Mol Biol Rep.* 1990;14(2-3):43-8.
76. Gottlieb E, Steitz JA. Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. *EMBO J.* 1989 Mar;8(3):851-61.

77. Gottlieb E, Steitz JA. The RNA binding protein La influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription in vitro. *EMBO J*. 1989 Mar;8(3):841-50.
78. Bachmann M, Chang S, Slor H, Kukulies J, Muller WE. Shuttling of the autoantigen La between nucleus and cell surface after uv irradiation of human keratinocytes. *Exp Cell Res*. 1990 Dec; 191(2):171-80.
79. Bachmann M, Pfeifer K, Schroder HC, Muller WE. The La antigen shuttles between the nucleus and the cytoplasm in CV-1 cells. *Mol Cell Biochem*. 1989 Feb 21;85(2):103-14.
80. Gui JF, Lane WS, Fu XD. A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature*. 1994 Jun 23;369(6482):678-82.
81. Wang HY, Arden KC, Bermingham JR, Jr., Viars CS, Lin W, Boyer AD, et al. Localization of serine kinases, SRPK1 (SFRSK1) and SRPK2 (SFRSK2), specific for the SR family of splicing factors in mouse and human chromosomes. *Genomics*. 1999 Apr 15;57(2):310-5.
82. Wang HY, Lin W, Dyck JA, Yeakley JM, Songyang Z, Cantley LC, et al. SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J Cell Biol*. 1998 Feb 23;140(4):737-50.
83. Kamachi M, Le TM, Kim SJ, Geiger ME, Anderson P, Utz PJ. Human autoimmune sera as molecular probes for the identification of an autoantigen kinase signaling pathway. *J Exp Med*. 2002 Nov 4;196(9):1213-25.
84. Lukasiewicz R, Velazquez-Dones A, Huynh N, Hagopian J, Fu XD, Adams J, et al. Structurally unique yeast and mammalian serine-arginine protein kinases catalyze evolutionarily conserved phosphorylation reactions. *J Biol Chem*. 2007 Aug 10;282(32):23036-43.
85. Umehara H, Nishii Y, Morishima M, Kakehi Y, Kioka N, Amachi T, et al. Effect of cisplatin treatment on speckled distribution of a serine/arginine-rich nuclear protein CROP/Luc7A. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Feb 7;301(2):324-9.
86. Koizumi J, Okamoto Y, Onogi H, Mayeda A, Krainer AR, Hagiwara M. The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by direct interaction with SR protein kinases (SRPKs). *J Biol Chem*. 1999 Apr 16;274(16):11125-31.
87. Subramanian KK, Jia Y, Zhu D, Simms BT, Jo H, Hattori H, et al. Tumor suppressor PTEN is a physiologic suppressor of chemoattractant-mediated neutrophil functions. *Blood*. 2007 May 1;109(9):4028-37.
88. Mizgerd JP, Quinlan WM, LeBlanc BW, Kutkoski GJ, Bullard DC, Beaudet AL, et al. Combinatorial requirements for adhesion molecules in mediating neutrophil emigration during bacterial peritonitis in mice. *J Leukoc Biol*. 1998 Sep;64(3):291-7.

89. Kirstein M, Brett J, Radoff S, Ogawa S, Stern D, Vlassara H. Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor: role in vascular disease of diabetes and aging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990 Nov;87(22):9010-4.
90. Yui S, Sasaki T, Araki N, Horiuchi S, Yamazaki M. Induction of macrophage growth by advanced glycation end products of the Maillard reaction. *J Immunol*. 1994 Feb 15;152(4):1943-9.
91. Vlassara H, Brownlee M, Manogue KR, Dinarello CA, Pasagian A. Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science*. 1988 Jun 10;240(4858):1546-8.
92. Imani F, Horii Y, Suthanthiran M, Skolnik EY, Makita Z, Sharma V, et al. Advanced glycosylation endproduct-specific receptors on human and rat T-lymphocytes mediate synthesis of interferon gamma: role in tissue remodeling. *J Exp Med*. 1993 Dec 1;178(6):2165-72.
93. Wheelock EF. Interferon-Like Virus-Inhibitor Induced in Human Leukocytes by Phytohemagglutinin. *Science*. 1965 Jul 16;149(3681):310-1.
94. Kerr IM, Stark GR. The antiviral effects of the interferons and their inhibition. *J Interferon Res*. 1992 Aug;12(4):237-40.
95. Staeheli P. Interferon-induced proteins and the antiviral state. *Adv Virus Res*. 1990; 38:147-200.
96. Revel M. Genetic and functional diversity of interferons in man. *Interferon*. 1983;5:205-39.
97. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:571-611.
98. Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 1994 Jun 3;264(5164):1415-21.
99. Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Silvennoinen O. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:369-98.
100. Ihle JN. STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell*. 1996 Feb 9;84(3):331-4.
101. Schindler C, Darnell JE, Jr. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:621-51.
102. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-73.

103. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:227-57.
104. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:635-73.
105. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:251-76.
106. Young HA, Hardy KJ. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J Leukoc Biol.* 1995 Oct;58(4):373-81.
107. Bancroft GJ, Schreiber RD, Unanue ER. Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol Rev.* 1991 Dec;124:5-24.
108. Sher A, Coffman RL. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:385-409.
109. Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:151-77.
110. Green SP, Hamilton JA, Uhlinger DJ, Phillips WA. Expression of p47-phox and p67-phox proteins in murine bone marrow-derived macrophages: enhancement by lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha but not colony stimulating factor 1. *J Leukoc Biol.* 1994 Apr;55(4):530-5.
111. Dusi S, Donini M, Lissandrini D, Mazzi P, Bianca VD, Rossi F. Mechanisms of expression of NADPH oxidase components in human cultured monocytes: role of cytokines and transcriptional regulators involved. *Eur J Immunol.* 2001 Mar;31(3):929-38.
112. Almeida AC, Rehder J, Severino SD, Martins-Filho J, Newburger PE, Condino-Neto A. The effect of IFN-gamma and TNF-alpha on the NADPH oxidase system of human colostrum macrophages, blood monocytes, and THP-1 cells. *J Interferon Cytokine Res.* 2005 Sep;25(9):540-6.
113. Gauss KA, Bungler PL, Larson TC, Young CJ, Nelson-Overton LK, Siemsen DW, et al. Identification of a novel tumor necrosis factor alpha-responsive region in the NCF2 promoter. *J Leukoc Biol.* 2005 Feb;77(2):267-78.
114. Monaco C, Paleolog E. Nuclear factor kappaB: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovasc Res.* 2004 Mar 1;61(4):671-82.
115. Clark RA, Valente AJ. Nuclear factor kappa B activation by NADPH oxidases. *Mech Ageing Dev.* 2004 Oct-Nov;125(10-11):799-810.
116. Weissmann G. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol* 2004. Jun;10(3 Suppl):S26-31.

117. Cathcart MK. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Jan;24(1):23-8.
118. Clempus RE, Griendling KK. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2006 Jul 15;71(2):216-25.
119. Eklund EA, Skalnik DG. Characterization of a gp91-phox promoter element that is required for interferon gamma-induced transcription. *J Biol Chem.* 1995 Apr 7;270(14):8267-73.
120. Gupta JW, Kubin M, Hartman L, Cassatella M, Trinchieri G. Induction of expression of genes encoding components of the respiratory burst oxidase during differentiation of human myeloid cell lines induced by tumor necrosis factor and gamma-interferon. *Cancer Res.* 1992 May 1;52(9):2530-7.
121. Kobayashi SD, Voyich JM, Braughton KR, Whitney AR, Nauseef WM, Malech HL, et al. Gene expression profiling provides insight into the pathophysiology of chronic granulomatous disease. *J Immunol.* 2004 Jan 1;172(1):636-43.
122. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009 Jan;10(1):57-63.
123. Hampton M, Melvin RG, Kendall AH, Kirkpatrick BR, Peterson N, Andrews MT. Deep sequencing the transcriptome reveals seasonal adaptive mechanisms in a hibernating mammal. *PLoS One.* 2011;6(10):e27021.