

**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.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante Mendes

Versão original

São Paulo  
2014

## 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> orquestram 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 PGE<sub>2</sub> inibe a expressão de *fasl* ainda não é conhecido, o presente trabalho tem como objetivo compreender o mecanismo molecular de atuação da PGE<sub>2</sub> 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 sequência 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 PGE<sub>2</sub>, 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 1 hora. 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<sub>2</sub> 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 PGE<sub>2</sub> 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<sup>+</sup> 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 antigen-specific immune response. The adaptive immune response is characterized by different phases, such as, antigen presentation to T lymphocytes by APCs (antigen-presenting 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 PGE<sub>2</sub> 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 PGE<sub>2</sub>, 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<sub>2</sub> 10<sup>-8</sup> 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.

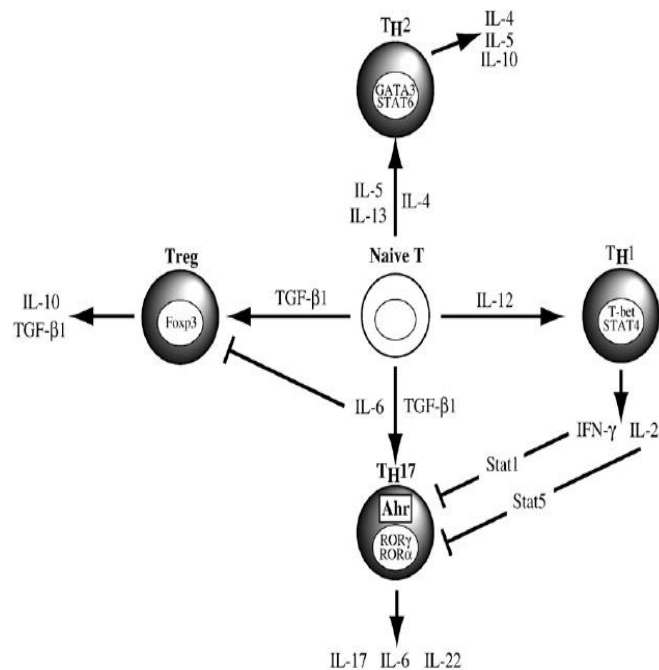
# 1 INTRODUÇÃO

## 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>, 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 naíve 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<sup>+</sup> em diferentes subgrupos, que são capazes de secretar diferentes citocinas (7) (**Figura 1**). Os linfócitos T naíve podem se diferenciar em linfócitos T *helper* 1 (Th1), Th2, Th17 e/ou T regulador (Treg) e são essas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> 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 naíve 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 naíve 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<sup>+</sup>, 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 antígeno-específicos 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- $\alpha$  (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 tímócitos 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).

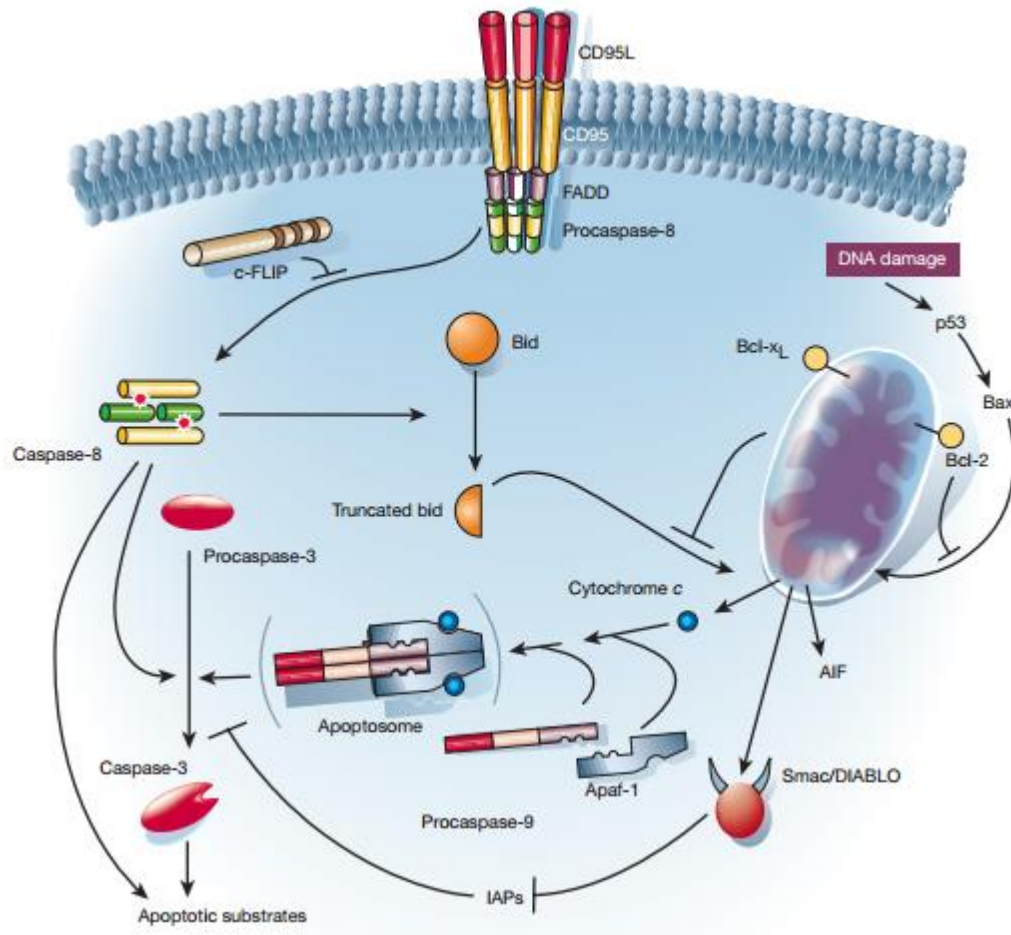
A AICD é a forma de apoptose induzida nos linfócitos T periféricos quando sofrem repetidas estimulações via TCR/CD3, sendo, este tipo de morte, um dos responsáveis pela manutenção da tolerância periférica (34). Exemplo disto é o acúmulo pronunciado de linfócitos no organismo, culminando com o desenvolvimento 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 linfadenomegalia 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, linfadenopatia 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 naíve 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-1 $\beta$ -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- $\kappa$ B (*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- $\gamma$* , *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).

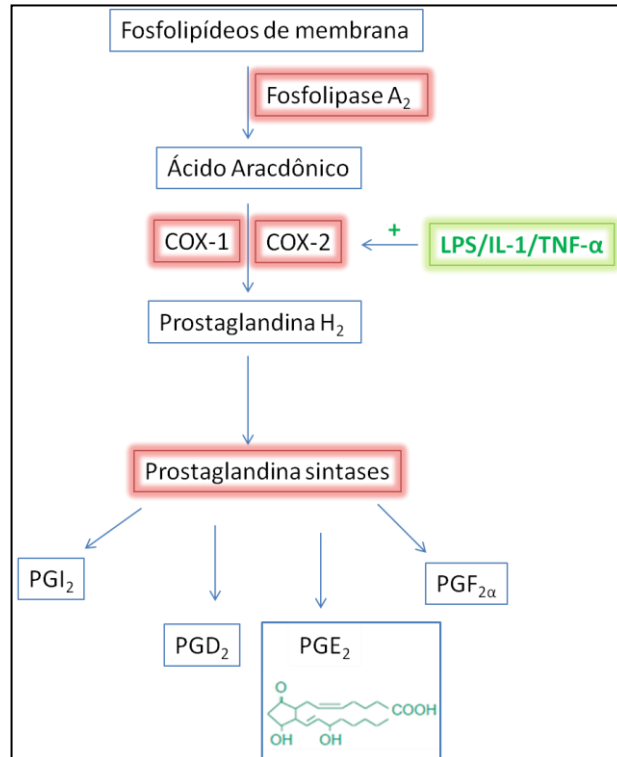
Além dos fatores de transcrição que regulam positivamente a expressão gênica, existem também os que a inibem, como é o caso do repressor transcricional, descrito em 1993, ICER (*inducible cAMP early repressor*) (62). Esse repressor

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 fosfolípidos 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).

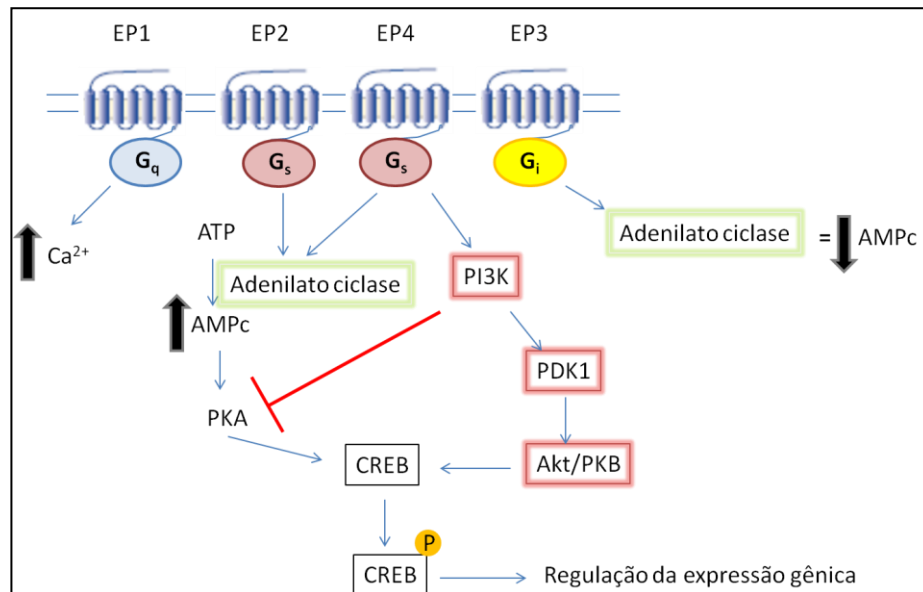
A posterior conversão da PGH<sub>2</sub> em diferentes tipos de PGs é feita através de prostaglandinas sintases, que são células-específicas, mas que também podem ser induzidas por estímulos pró-inflamatórios (69). Após a produção, as PGs são rapidamente liberadas das células e agem perto do seu local 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 A<sub>2</sub>, os fosfolipídeos de membrana são convertidos a ácido araquidônico e sofrem ação das enzimas ciclooxigenases 1 e 2, dando origem à PGH<sub>2</sub>. 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 G<sub>q</sub>, causam elevação dos níveis de cálcio intracelular e os EP3, acoplados à proteína G<sub>i</sub>, possuem ação inibitória, diminuindo os níveis de AMPc (73, 74), os receptores EP2 e EP4 estão acoplados à proteína G<sub>s</sub> e ativam a adenilato ciclase que, conseqüentemente, 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**).

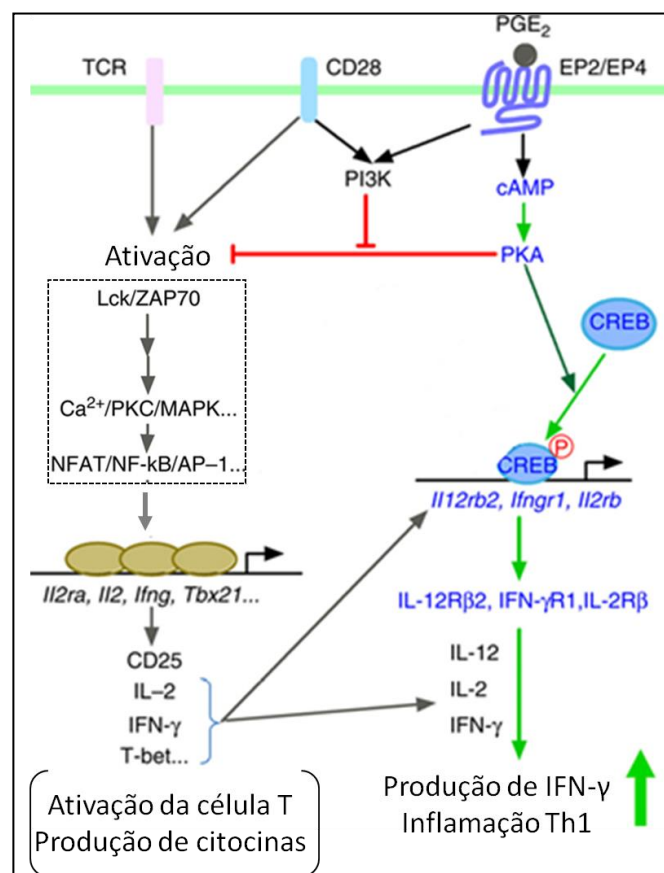


**Figura 4.** Resumo das vias de sinalização dos receptores da prostaglandina  $E_2$  (EP1-EP4). O receptor EP1 está acoplado à proteína Gq e aumenta os níveis de cálcio dentro da célula; EP2 e EP4 ativam a adenilato ciclase e aumentam os níveis de AMPc intracelular, o qual ativa PKA, culminando com 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  $PGE_2$ , 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  $PGE_2$ , via EP2 e EP4, é capaz de contribuir para que os linfócitos T  $CD4^+$  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. Conseqüentemente, 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 proteína 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).

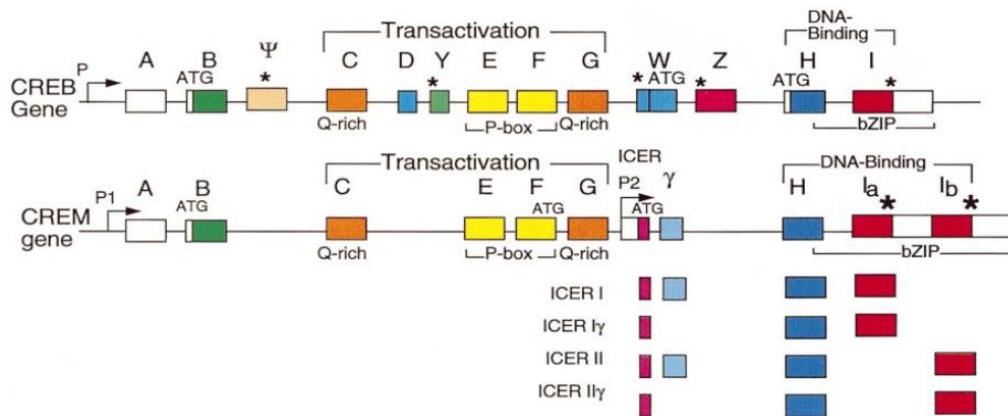
A atividade transcricional de CREB e CREM é regulada pela fosforilação da Ser133 (serina 133) e Ser117 (serina 117), respectivamente, o que permite a formação do complexo com o coativador CBP (*CREB binding protein*), que é um cofator não apenas de CREB, mas de outros fatores de transcrição (86-88), 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 hipotálamo-hipófise-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).

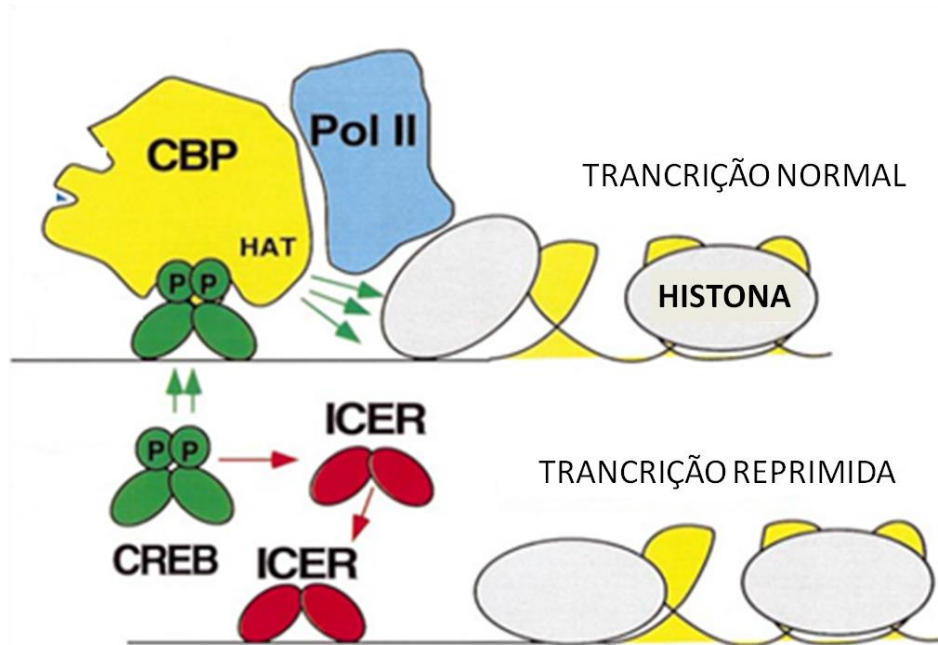
ICER é proveniente de uma quebra em uma região importante da extensão do gene *crem*. Ou seja, *icer* é expresso quando um promotor alternativo (P2), de *crem* é ativado. Este P2 está localizado no meio do gene *crem*, em uma região intrônica (**Figura 6**). Após a transcrição de *icer*, seu RNAm sofre 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 I $\gamma$ , ICER II e ICER II $\gamma$  ((94)). A isoforma I do ICER contém DBD (*DNA-binding domain*) I, enquanto o ICER II contém DBD II. As duas isoformas  $\gamma$  (ICER I $\gamma$  e ICER II $\gamma$ ) 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, conseqüentemente, não ativa a maquinaria de transcrição, fazendo com que ocorra a inibição da transcrição gênica (95) (**Figura 7**).

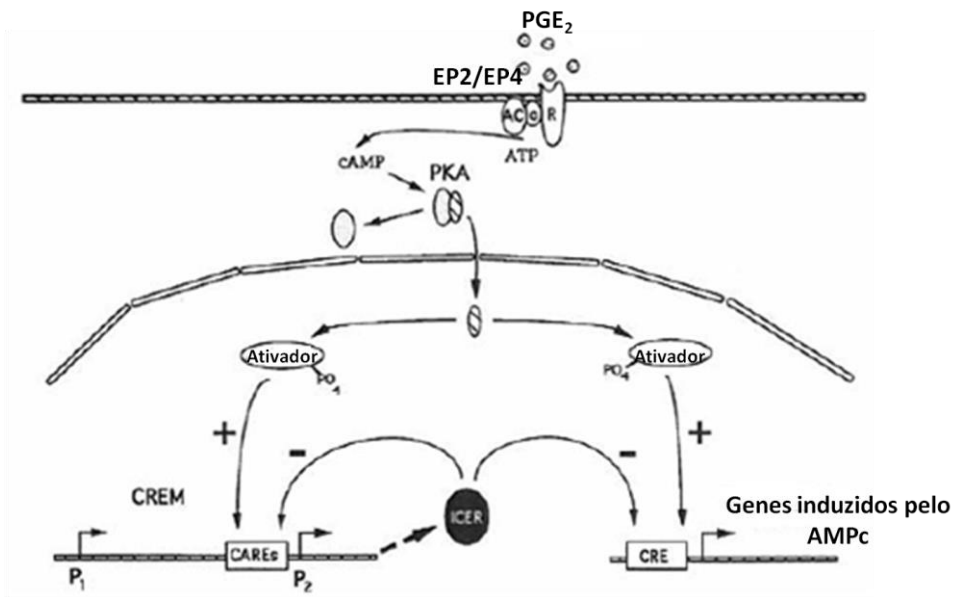




**Figura 7.** Representação esquemática de CREB e ICER competindo por sítios de ligação ao DNA. CREB possui domínios de transativação e recruta CBP para que a transcrição ocorra, enquanto ICER não possui estes sítios e não se liga a CBP, impedindo a transcrição de genes alvos. Adaptado de (96).

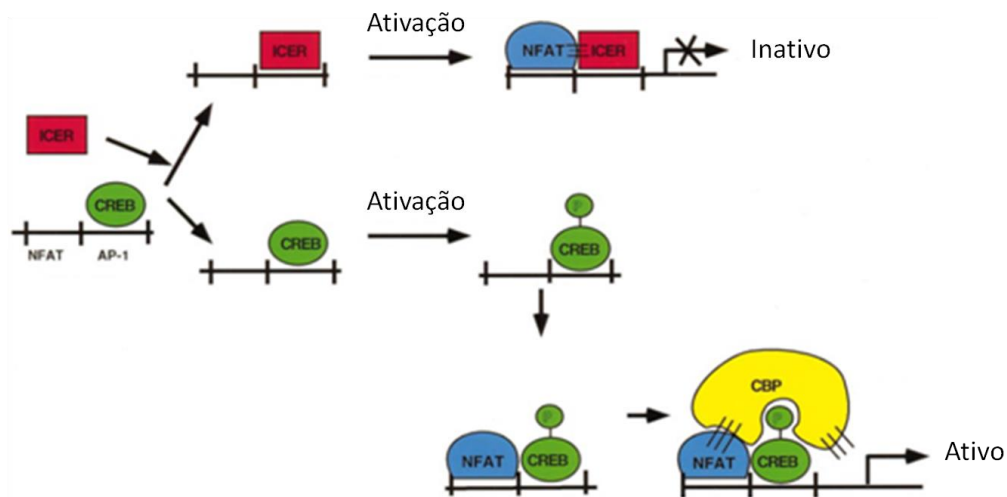
Embora ICER tenha uma função diferente de CREM e CREB, eles possuem grande homologia gênica entre si e são capazes de se ligar à sítios CRE no promotor dos genes e competir por eles (REF). O sítio CRE clássico possui um motivo consenso palindrômico (TGACGTCA) (64), mas ICER é capaz de se ligar a uma 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  $PGE_2$  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  $PGE_2$ , 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).

## 2 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\*

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. 2005/02/03.
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. 2006/01/07.
3. Johansson M, Denardo DG, Coussens LM. Polarized immune responses differentially regulate cancer development. *Immunological Reviews*. 2008;222:145-54. 2008/03/28.
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. 2011/03/26.
5. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007;449(7164):819-26. 2007/10/19.
6. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annual Review of Immunology*. 2010;28:445-89. 2010/03/03.
7. Levy DE, Darnell JE, Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature reviews Molecular Cell Biology*. 2002;3(9):651-62. 2002/09/05.
8. Coffman RL. Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. *Nature Immunology*. 2006;7(6):539-41. 2006/05/23.
9. Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2006;311:17-58. 2006/10/20.
10. Steinman RM. Linking innate to adaptive immunity through dendritic cells. *Novartis Foundation Symposium*. 2006;279:101-9; discussion 9-13, 216-9. 2007/02/07.

---

\* 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>

11. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*. 2009;27:485-517. 2009/01/10.
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. 2007/02/10.
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. 2008/04/11.
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. 2003/09/23.
15. Kimura A, Kishimoto T. Th17 cells in inflammation. *International Immunopharmacology*. 2011;11(3):319-22. 2010/11/03.
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. 1999/07/10.
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. 2010/10/27.
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. 1998/11/04.
19. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annual review of immunology*. 2003;21:335-76. 2003/01/14.
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. 2004/02/21.
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. 2004/03/23.
22. Green DR. Fas Bim boom! *Immunity*. 2008;28(2):141-3. 2008/02/16.
23. Brenner D, Krammer PH, Arnold R. Concepts of activated T cell death. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2008;66(1):52-64. 2008/02/22.

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. 1999/06/08.
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. 1999/02/02.
26. Mitchell T, Kappler J, Murrack P. Bystander virus infection prolongs activated T cell survival. *J Immunol*. 1999;162(8):4527-35. 1999/04/14.
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. 2003/05/20.
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. 2006/09/21.
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. 1998/08/04.
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. 2004/05/26.
31. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science*. 1995;267(5203):1449-56. 1995/03/10.
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. 1989/06/22.
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. 1993/06/01.
34. Kabelitz D, Janssen O. Antigen-induced death of T-lymphocytes. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*. 1997;2:d61-77. 1997/02/15.
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. 2013/12/24.

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. 1998/06/04.
37. Algeciras-Schimmich 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. 1999/05/05.
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. 1995/05/19.
39. Budd RC, Yeh WC, Tschopp J. cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nature Reviews Immunology*. 2006;6(3):196-204. 2006/02/25.
40. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene*. 2003;22(53):8543-67. 2003/11/25.
41. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-6. 2000/10/26.
42. Strasser A. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(3):189-200. 2005/02/19.
43. Zhang J, Xu X, Liu Y. Activation-induced cell death in T cells and autoimmunity. *Cellular & Molecular Immunology*. 2004;1(3):186-92. 2005/10/13.
44. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & Development*. 2003;17(18):2205-32. 2003/09/17.
45. Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(6):472-84. 2005/06/02.
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. 2009/06/16.
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. 2008/01/09.
48. Nolan GP. NF-AT-AP-1 and Rel-bZIP: hybrid vigor and binding under the influence. *Cell*. 1994;77(6):795-8. 1994/06/17.



49. Crabtree GR, Clipstone NA. Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annual Review of Biochemistry*. 1994;63:1045-83. 1994/01/01.
50. Muller MR, Rao A. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10(9):645-56. 2010/08/21.
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. 2002/07/18.
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. 1998/12/10.
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. 2010/02/26.
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. 1996/11/26.
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. 2007/01/25.
56. Schonhaler 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. 2011/02/26.
57. Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(11):859-68. 2003/12/12.
58. Bodor J, Habener JF. Role of transcriptional repressor ICER in cyclic AMP-mediated attenuation of cytokine gene expression in human thymocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(16):9544-51. 1998/05/23.
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. 2012/04/26.
60. Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene*. 2006;25(51):6758-80. 2006/10/31.

61. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annual Review of Immunology*. 2000;18:621-63. 2000/06/03.
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. 1993/12/03.
63. Hoeffler JP, Meyer TE, Yun Y, Jameson JL, Habener JF. Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science*. 1988;242(4884):1430-3. 1988/12/09.
64. Foulkes NS, Borrelli E, Sassone-Corsi P. CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell*. 1991;64(4):739-49. 1991/02/22.
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. 1996/05/01.
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. 1995/08/01.
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. 1991/10/01.
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. 1994/04/18.
69. Fillion 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. 2001/07/13.
70. Narumiya S. Prostanoid receptors. Structure, function, and distribution. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1994;744:126-38. 1994/11/15.
71. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in Immunology*. 2002;23(3):144-50. 2002/02/28.
72. Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2001;41:661-90. 2001/03/27.

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. 2001/07/04.
74. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiological Reviews*. 1999;79(4):1193-226. 1999/10/03.
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. 2013/04/12.
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. 2005/04/28.
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. 1996/04/16.
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. 1988/07/01.
79. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*. 1997;88(4):435-7. 1997/02/21.
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. 1998/07/25.
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. 2008/09/30.
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. 1980/01/01.
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. 2004/05/28.
84. Sands WA, Palmer TM. Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cellular Signalling*. 2008;20(3):460-6. 2007/11/13.

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. 2009/12/23.
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. 2002/04/24.
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. 2000/06/29.
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. 2009/04/09.
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. 1993/08/26.
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. 1994/07/21.
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. 2001/06/19.
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. 1994/12/20.
93. Blencowe BJ. Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell*. 2006;126(1):37-47. 2006/07/15.
94. Borlikova G, Endo S. Inducible cAMP early repressor (ICER) and brain functions. *Molecular Neurobiology*. 2009;40(1):73-86. 2009/05/13.
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. 1993/10/28.
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. 2000/06/17.