

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA

TANIA CAROLINA BRAGA DOS REIS

**PAPEL DAS MIOSINAS NÃO-CONVENCIONAIS NA ATIVAÇÃO DOS
LINFÓCITOS T CD4+**

SÃO PAULO

2023

TANIA CAROLINA BRAGA DOS REIS

Papel das miosinas não-convencionais na ativação dos linfócitos T
CD4+

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador(a): Prof(a) Dr(a). Bruna Cunha de Alencar Bargieri

Versão Corrigida.

São Paulo

2023

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Braga dos Reis, Tania Carolina
Papel das miosinas não-convencionais na ativação
dos linfócitos T CD4+ / Tania Carolina Braga dos
Reis; orientadora Bruna Cunha de Alencar Bargieri. -
- São Paulo, 2023.
106 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Citoesqueleto. 2. Miosinas. 3. Linfócito T. 4.
Miosina IG. 5. Ativação de Linfócito T. I. Cunha de
Alencar Bargieri, Bruna, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Tania Carolina Braga dos Reis

Título da Dissertação/Tese: Papel das Miosina Não-Convencionais na Ativação dos Linfócitos TCD4+.

Orientador: Bruna cunha de Alencar Bargieri

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

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

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 24 de março de 2020.

PARECER 1471 /CEPSH

CAAE nº 29636819.3.0000.5467

Protocolo CEPESH-ICB nº 1526/20

O Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, em 19/03/2020, **APROVOU** o projeto intitulado: "**Papel das miosinas não-convencionais na ativação dos linfócitos T CD4+**", da pesquisadora: **Tania Carolina Braga dos Reis**.

Caberá ao pesquisador, em conformidade com a Resolução CNS nº 466/2012: 1) elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) conforme modelo constante no site: ww2.icb.usp.br/icb/cepsh; 2) desenvolver o projeto conforme metodologia apresentada; 3) manter em arquivo sob sua guarda (impresso ou digital), por até 5 anos após conclusão da pesquisa, toda documentação relacionada a pesquisa; 4) encaminhar os resultados para publicação; 5) justificar ao CEP, via Plataforma Brasil, interrupção do projeto ou a não publicação de resultados; 6) finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto. O primeiro relatório deverá ser enviado, via Plataforma Brasil, até **19/03/2021**.

Atenciosamente,

Profa. Dra. **CAMILA SQUARZONI DALE**

Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

A minha família, meu companheiro de vida,
meus amigos, e todos aqueles que de alguma
forma me ajudaram a chegar até aqui.
Muito Obrigado

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, que muitos dizem ser a minha cópia, por sua orientação excepcional, que resultou em um trabalho do qual tenho grande carinho e orgulho. Mas antes de agradecer pelo trabalho, gostaria de agradecer pelo processo, o caminho até aqui não foi nada fácil, muito pelo contrário, foi mais difícil do que poderíamos imaginar. Passamos por diversas dificuldades, de diversas formas, e ainda assim tive a sorte de ter uma orientação regada a paciência e cuidado. Além de uma mulher maravilhosa ela é uma profissional incrível, sempre muito cuidadosa e atenciosa com todos. Por esses e outros diversos motivos, sempre guardarei na memória nosso tempo juntas e a experiência inexplicável de tê-la ao meu lado durante este processo.

As minhas grandes amigas Taís Matozo e Letícia Kogachi, que são cientistas incríveis, e agora estão traçando seu caminho lindamente. Por me receberem e acolherem desde o começo quando apareci completamente desnorreada, sequer sabendo como segurar uma pipeta sorológica. Sou eternamente grata, por todos os ensinamentos e aprendizados, pela parceria que construímos durante todo esse tempo, pelos experimentos de sucessos - outros nem tanto - pelas broncas, risadas e choros. Estiveram, e estão, sempre do meu lado nos momentos bons, ruins, alegres, tristes e memoráveis. Sou muito grata por ter conhecido vocês e por agora serem parte da minha vida e da minha história; levarei vocês sempre comigo, e no meu coração. Desejo um futuro lindo e brilhante a vocês minhas queridas, estou certa que esse mundo será pequeno para a grandeza de vocês.

Jonathan, Tiago, Laura, Raquel, Luísa, Sandrinha, Maria, Carol, Najela, Lilian, Yan, Leo e muitos outros amigos que o departamento de Imunologia do ICB/USP me deu. Aos que ainda estão pela imuno, e aos que já foram trilhar seu caminho mundo a fora. Guardo o amor de vocês no meu coração. Vocês são luz, e sou muito grata por terem entrado na minha vida.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Celular do Sistema Imune, um lugar cheio de pessoas brilhantes, trabalhar com vocês faz meus dias passarem mais rápido, afinal o tempo voa quando a gente se diverte.

À FAPESP, pelo apoio financeiro no projeto geral do laboratório (nº 2014/23225-0).

À CAPES, pelo suporte financeiro nesse projeto (nº 88887.475141/2020-00) de fevereiro de 2020 a julho de 2022.

As enfermeiras e médicos do Hospital Oswaldo Cruz.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas e ao CEFAP pela infraestrutura e suporte, aos funcionários da portaria instituto de ciência biomédicas, por todo carinho que tem e sempre tiveram conosco, sempre muito atenciosos com nosso bem-estar, mesmo saindo tarde da noite, eles sempre estavam conosco preocupados e cuidadosos. Aos técnicos e funcionários que nos dão todo o suporte, sempre atenciosos e cuidadosos. Vocês fazem diferença no nosso dia-a-dia.

Ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, e todos os professores do Departamento de Imunologia.

Pelas minhas queridas amigas “cansadas”, Amanda, Camis, Suzane e Miu, que me acompanham desde as loucuras da faculdade e continuarão para a minha vida todinha. Obrigada por todos os anos, pelo suporte, de diversas maneiras, pelas risadas e momentos de alegrias. Vocês merecem tudo de lindo desse mundo. E não menos importante a Juju, outro presentinho que a São Camilo me deu; agradeço pela nossa jornada junta, desde as noites a dentro nas salas da faculdade, aos nossos almoços no Bandeirão da USP. Essa cientista brilhante, que vai ter muito sucesso no caminho que escolher, essa mulher maravilhosa, amiga incrível que sempre está comigo nas minhas aventuras e me apoia em tudo. Amiga, obrigado por partilhar a vida comigo, desejo anos de alegrias juntas, obrigada por tanto.

Aos meus amigos de vida Thais e Eduardo, que mesmo não nos vendo com tanta frequência ou estando muito longe, a vida soube me mostrar o quão é bom ter

peessoas com quem podemos dividi-la, que estarão ao seu lado e cuidarão de você mesmo quando parece fisicamente improvável. Obrigada por serem meus irmãos de alma, por fazerem parte da minha vida, e por me permitir fazer parte da de vocês.

Aos meus rolezeiros maravilhosos que fazem parte do que eu sou também; Leo, Bruno e Kisha Kota (Alex). Vocês fazem a vida ser mais leve, me ajudam a ver o mundo da melhor forma em que ele pode se apresentar, obrigada por me aguentarem e estarem ao meu lado me permitindo respirar no meio desse processo. Parte do que sou hoje é graças a vocês, meus queridos amigos.

A minha família que sempre me deram base, e força para alcançar meus sonhos, e nunca descreditaram de mim, sempre me incentivando a ir atrás daquilo que me faz sorrir. Vocês são a base do meu sorriso diário.

Ao meu companheiro de vida Marcos Mariuzzo, aquele que escolheu seguir a vida ao meu lado, que sempre me apoia e me dá forças de seguir em frente, independente das dificuldades. Uma das pessoas mais maravilhosas e bondosas que eu pude conhecer, e ainda me escolheu como parceira de vida. Sou muito grata por todo apoio, toda força, companheirismo, toda a felicidade e todo amor que você me dá diariamente. A vida é muito melhor ao seu lado.

Ao meu pai, que me proporcionou ter uma família grande, e cheia de energia e amor, e sempre esteve do meu lado, me apoiando. Obrigada por todo seu amor.

E minha mãe, esse ser repleto de amor. Mãe agradeço imensamente por você ser essa pessoa, obrigada por sempre acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava, obrigada por sempre me incentivar e mover céus e terras, para que eu tenha que mover apenas um montinho de terra para alcançar meus sonhos. Você é luz, não só na minha vida, como na vida de todas as pessoas a cerca. O mundo é um lugar muito melhor, só pelo fato de você estar nele e nos permitir ter você ao nosso lado. Sua alegria, seu carinho, sua confiança no melhor das pessoas, o jeito que você vê a vida mais leve e sem complicações, faz os dias parecerem mais fáceis de seguir. Obrigada por ser você, e estar comigo e com o Charles para tudo. Te amo.

Se Não Formos, Não Seremos.

- Provérbio Cabo - Verdiano, autor Desconhecido

RESUMO

Reis, T, C, B. Papel das miosinas não-convencionais na ativação dos linfócitos T CD4+, 2023.nº de páginas 106p. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

As miosinas são motores moleculares associados à actina. As miosinas convencionais do tipo II estão presentes em todas as células nucleadas e são essenciais durante o processo da sinapse imunológica. Por outro lado, as miosinas não-convencionais estão presentes em diversos tipos celulares, inclusive células T, onde já foi visto que estão diretamente relacionadas à migração celular. Entretanto, pouco se sabe sobre seu papel na ativação antigênica desses linfócitos. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o papel das miosinas não convencionais expressas em linfócitos T (myo IC, myo IG, myo VA, myo IXA, myo IXB e myo XVIIIA), na ativação dessas células. Para tal, silenciámos cada uma dessas miosinas utilizando RNAi em células de linhagem Jurkat (uma linhagem celular de TCD4+ humana). Para as miosinas cujo silenciamento foi significativo (myo IG e IC) avaliamos se a ativação das células silenciadas era similar à ativação observada em células controle. Em resposta à ativação usando anti-CD3/anti-CD28, as células silenciadas para a myo IC apresentaram expressão de CD69 e produção de IL-2 semelhantes aos observados nas células controle. Já as células silenciadas para a myo IG, observamos redução tanto na expressão da molécula CD69 quanto na produção de IL-2 no sobrenadante. Por outro lado, essas alterações não foram observadas após ativação com PMA/IONO, sugerindo um papel para a myo IG nas etapas iniciais da ativação. Corroborando esses dados, a myo IG foi observada nas regiões de contato célula-célula em sinapses imunológicas de células Jurkat com células dendríticas pulsadas com superantígenos. A análise da expressão das moléculas CD3 e CD28 na superfície das células Jurkat silenciadas para myo IG mostrou alterações, que, porém, divergiram dependendo da sequência de shRNA utilizada. Por outro lado, células Jurkat *knockout* para myo IG pelo sistema CRIPR/Cas9 não mostraram alteração da ativação e nem da expressão de receptores. Nossos dados sugerem um possível papel para essa miosina na ativação dos linfócitos T CD4, porém mais estudos serão necessários para definir o papel exato da myo IG na ativação das células Jurkat.

Palavras-chave: Miosina, Linfócito T, Ativação, Myo IG

ABSTRACT

Reis, T.C. B. Role of unconventional myosins in the activation of CD4+ T lymphocytes, 2023. 106p. Dissertation (Master thesis in Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2023.

Myosins are actin-associated molecular motors. Conventional type II myosins are present in all nucleated cells and are essential during the process of the immunological synapse. On the other hand, unconventional myosins are present in only a few cell types, such as T cells, where it has already been seen that they are directly related to cell migration. However, little is known about their role in intracellular events. Therefore, this work aims to evaluate the role of the unconventional expression in T lymphocytes (myo IC, myo IG, myo VA, myo IXA, myo IXB e myo XVIIIA), in the activation of these cells. For that, we silenced each of these myosins using RNAi in Jurkat cells (a human CD4+ T cell line). For myosins whose silencing was significant (myo IG and IC) we evaluated whether the activation of silenced cells was similar to the activation observed in control cells. In response to activation using anti-CD3/anti-CD28, myo IC silenced cells showed CD69 expression and IL-2 production similar to those observed in control cells. As for the *MYO1G*-silenced Jurkats, expressed lower levels of CD69 on their surface than cells expression and in the production of IL-2 in the supernatant. On the other hand, these changes were not observed after activation with PMA/IONO, suggesting a role for Myo1g in the initial steps of activation. Corroborating these data, myo1g was observed in the cell-cell contact regions in immunological synapses of Jurkat cells with dendritic cells pulsed with superantigens. Analysis of the expression of CD3 and CD28 molecules on the surface of Jurkat cells silenced for myo IG showed alterations, that, although, diverged depending on the shRNA sequence used. However, myo IG knockout Jurkat cells by the CRIPR/Cas9 system did not show changes in activation or expression of receptors. Our data suggest a possible role for this myosin in the activation of CD4 T lymphocytes, but further studies are needed to define the exact role of myo IG in the activation of Jurkat cells.

Keywords: Myosin, T Lymphocyte, Activation, myo IG

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESQUEMA DE MATURAÇÃO DO LINFÓCITO.	22
FIGURA 2: ESQUEMA DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS T.	23
FIGURA 3: CASCATA DE ATIVAÇÃO DO LINFÓCITO T.....	26
FIGURA 4: ESQUEMA DO GRUPO DE ATIVAÇÃO SUPRAMOLECULAR.....	30
FIGURA 5: ESQUEMA DAS ETAPAS DA SINAPSE IMUNOLÓGICA	35
FIGURA 6: ESQUEMA DAS FUNÇÕES DAS MIOSINAS NAS CÉLULAS.....	38
FIGURA 7: ESQUEMA DA ESTRUTURA DAS MIOSINAS NÃO-CONVENCIONAIS.....	40
FIGURA 8: ESQUEMA ILUSTRATIVO DA PRODUÇÃO LENTIVIRAL A FIM DE FAZER KNOCKDOWN E KNOCKOUT NAS CÉLULAS.	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 9: ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS JURKAT SILENCIADAS E CONTROLE.	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 10: ESTRATÉGIA DE GATING.	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 11: PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR CÉLULAS JURKAT.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 12: EXPRESSÃO DE CD69 NAS CÉLULAS JURKAT.	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 13: EXPRESSÃO DE MIOSINAS EM CÉLULAS JURKAT.	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 14: EXPRESSÃO DAS MIOSINAS EM CÉLULAS JURKAT SILENCIADAS.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 15: EXPRESSÃO PROTEICA DA MYO IC EM CÉLULAS JURKAT..	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 16: EXPRESSÃO DE CD69 EM CÉLULAS JURKAT SILENCIADAS PARA A MYO IC.	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 17: EXPRESSÃO DA MYO IG EM CÉLULAS JURKAT.	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 18: EXPRESSÃO DE CD69 E PRODUÇÃO DE IL-2 POR CÉLULAS JURKAT SILENCIADAS PARA A MYO IG.	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 19: EXPRESSÃO DA MYO IG EM CÉLULAS JURKAT ESTIMULADAS E NÃO ESTIMULADAS COM ANTI-CD3/CD28.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

FIGURA 20: LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA MYO IG DURANTE A SINAPSE IMUNOLÓGICA.

..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 21: CASCATA DE ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS T ATIVADOS COM PMA/IONO... **ERRO!**

INDICADOR NÃO DEFINIDO.

FIGURA 22: EXPRESSÃO DE CD69 E IL-2 POR CÉLULAS JURKAT ATIVADAS COM PMA/IONO E SILENCIADAS PARA A MYO IG..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 23: EXPRESSÃO DOS RECEPTORES CD3 E CD28 EM CÉLULAS JURKAT SILENCIADAS PARA A MYO IG. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 24: EXPRESSÃO DA MYO IG EM CÉLULAS JURKAT KNOCKOUT. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 25: EXPRESSÃO DE CD69 EM CÉLULAS KNOCKOUT PARA A MYO IG. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 26: EXPRESSÃO DE RECEPTORES CD3 E CD28 EM CÉLULAS JURKAT KNOCKOUT PARA A MYO IG **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 27: EXPRESSÃO DA MYO IG EM CÉLULAS HEK293T TRANSFECTADAS. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 28: : EXPRESSÃO PROTÉICA DA MYO IG EM CÉLULAS HEK293T... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 29: EXPRESSÃO DA MYO IG EM CÉLULAS HEK293T TRANSDUZIDAS.. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 30: EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MYO IG EM CÉLULAS JURKAT.. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 31: EXPRESSÃO DA MYO IG EM CÉLULAS A3.01 SILENCIADAS. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 32: EXPRESSÃO DE CD69 E PRODUÇÃO DE IL-2 POR CÉLULAS A3.01. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 33: EXPRESSÃO DOS RECEPTORES CD3 E CD28 EM CÉLULAS A3.01..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 34: EXPRESSÃO DE CD69 EM CÉLULAS A3.01 ESTIMULADAS COM PHA-L. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: SEQUÊNCIAS PARA O *KNOCKDOWN* DA *MYO1C*, *MYO1G*, *MYO5A*, *MYO9A*, *MYO18A* E *KNOCKOUT* DA *MYO1G*..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

TABELA 2: PRIMERS UTILIZADOS NO qPCR. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB – Actina- β

ADP – Adenosina Difosfato

APC – Células Apresentadora de Antígeno

Arp2/3 – Proteínas 2 e 3 Relacionadas com a Actina

ATP – Adenosina Trifosfato

Ca²⁺_i – Cálcio Intracelular

CBA – *Cytometry Bead Array*

cDNA – DNA complementar

c-SMAC – Grupo de Ativação Supramolecular Central

CT – *Threshold Cycles*

DAG – Diacilglicerol

DAPI – 4',6'-diamino-2-fenil-indol

DC – Célula Dendrítica

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

d-SMAC – Grupo de Ativação Supramolecular Distal

Fc γ R – Receptores Fc γ

FSC – *Forward Scatter*

GOLPH3 – Fosfoproteína 3 de Golgi

IFN- γ – Interferon Gama

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

IL-2R – Receptor da Citocina IL-2

IONO – Ionomicina

IP3 – Inositol 1,4,5 trisfosfato

IP3R – Receptor de Inositol 1,4,5 Trisfosfato

ISGs – Genes Estimulados Por IFNs

ITAM – Tirosina de Imunorreceptor

JNK – Quinase N-terminal c-Jun

K877A – pDEST732-GFP-Myo1g-K877

LAT – Proteína Adaptadora para a Ativação de Células T

LPS – Lipopolissacarídeo

LRS – *Leukocyte Reduction System*

MDDCs – Células Dendríticas Derivados de Monócitos

MFI – Mediana de Intensidade de Fluorescência

MHC – Complexo Principal De Histocompatibilidade

miRNA – Micros RNAs

MTOC – Centro de Organização de Microtúbulos

NFAT – Fator Nuclear das Células T Ativadas

NF-κB – Fator de Transcrição Nuclear κB

PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PEI – Polietilenoimina

Pen/Strep – Penicilina e Estreptomicina

PFA – Paraformaldeído

PHA-L – Fitohemaglutinina

PI3K – Proteína Fosfoinosítido 3-Quinase ou Fosfatidilinositol 3-Quinases

PIP2 – Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PKC – Proteína Quinase C

PLCγ1 – Enzima Fosfolipase C γ 1

PMA – *Phorbol Myristate Acetate*

p-SMAC – Grupo de Ativação Supramolecular Periférico

psPAX-2 – Plasmídeo de Empacotamento Lentiviral de Segunda Geração

PVDF – Fluoreto de Polivinilideno

pVSV-G – Vesicular Stomatitis Virus G Glycoprotein

qPCR – PCR Quantitativo em Tempo Real

RAG1 e RAG2 – Gene 1/2 de Ativação da Recombinação

Rho – *Ras Homolog Family*

RhoA – *Ras Homolog Family Member A*

RNA – Ácido Ribonucleico

RNA_m – RNA Mensageiro

SCR – Scramble

SEA e SEB – Enterotoxina tipo A e B do *Staphylococcus aureus*

sgRNA - *Single Guide RNA*

SH3 – Domínio de Homologia SRC 3

shRNA – *Short-Hairpin RNA*

SI – Sinapse Imunológica

SMAC – Grupo de Ativação Supramolecular

SSC – *Side Scatter*

TCR – Receptor De Célula T

TFH – Linfócitos T Auxiliares Foliculares

Th – Linfócitos T auxiliares (do inglês T *helper*)

TH1/2/3 – Homologia de Cauda 1, 2 e 3

TNF- α – Tumor Necrosis Factor Alpha

WB – *Western Blot*

WT – pDEST732-GFP-Myo1g-Wild Type

Δ CT – Delta CT

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. Linfócito T.....	21
1.1.1. Estrutura e Função.....	21
1.1.2. Cascata De Ativação Celular	25
1.2. A Sinapse Imunológica.....	28
1.3. Citoesqueleto.....	30
1.3.1. Microtúbulos.....	31
1.3.2. Filamentos Intermediários	32
1.3.3. Citoesqueleto de Actina	32
1.3.4. Citoesqueleto na Ativação da Célula T	33
1.4. Miosinas	36
1.4.1. As Miosinas Não Convencionais.....	39
1.4.1.1. Miosinas de Classe I (myo I).....	40
1.4.1.2. Miosinas de Classe V (myo V)	42
1.4.1.3. Miosinas de Classe IX (myo IX)	43
1.4.1.4. Miosinas de Classe XVIII (myo XVIII)	43
2. OBJETIVO	21
2.1. Objetivo Gerais.....	21
2.2. Objetivo Específicos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
3.1. Células	Erro! Indicador não definido.
3.2. Diferenciação Celular	Erro! Indicador não definido.
3.3. Produção Lentiviral.....	Erro! Indicador não definido.
3.3.1. Plasmídeos	Erro! Indicador não definido.

- 3.3.2. Geração de plasmídeo *CRISPR/CAS9* para *MYO1G* **Erro! Indicador não definido.**
- 3.3.3. Clonagem da *Myo1g* WT ou K877A no plasmídeo pCDH-puro **Erro! Indicador não definido.**
- 3.3.4. Transformação bacteriana **Erro! Indicador não definido.**
- 3.3.5. Pré-Inóculo e Inóculo **Erro! Indicador não definido.**
- 3.3.6. Mid Prep..... **Erro! Indicador não definido.**
- 3.3.7. Transfecção e Purificação..... **Erro! Indicador não definido.**
- 3.4. Transdução..... **Erro! Indicador não definido.**
- 3.5. Avaliação do silenciamento das Miosinas **Erro! Indicador não definido.**
- 3.6. Extração de RNA..... **Erro! Indicador não definido.**
- 3.7. Produção de cDNA..... **Erro! Indicador não definido.**
- 3.8. PCR quantitativo em tempo real..... **Erro! Indicador não definido.**
- 3.9. *Western Blot*..... **Erro! Indicador não definido.**
- 3.10. Ativação Celular **Erro! Indicador não definido.**
- 3.11. Marcação de superfície para Citometria..... **Erro! Indicador não definido.**
- 3.12. CBA..... **Erro! Indicador não definido.**
- 3.13. Estratégia de *Gating*..... **Erro! Indicador não definido.**
- 3.14. Análise Estatística **Erro! Indicador não definido.**
- 4. Resultados..... **Erro! Indicador não definido.**
- 4.2. Expressão de CD69 na superfície de células Jurkat **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3. Expressão das miosinas em células Jurkat..... **Erro! Indicador não definido.**
- 4.4. Silenciamento da expressão de miosinas em células Jurkat..... **Erro! Indicador não definido.**
- 4.5. Silenciamento da *myo* IC em células Jurkat..... **Erro! Indicador não definido.**
- 4.6. Avaliação da ativação de células Jurkat silenciadas para *myo* IC..... **Erro! Indicador não definido.**

- 4.7. Silenciamento da myo IG em células Jurkat.....**Erro! Indicador não definido.**
- 4.8. Avaliação da ativação de células Jurkat silenciadas para myo IG..... **Erro! Indicador não definido.**
- 4.9. Expressão da myo IG em células Jurkat após ativação**Erro! Indicador não definido.**
- 4.10. Localização subcelular da myo IG durante a sinapse imunológica. **Erro! Indicador não definido.**
- 4.11. Avaliação da ativação das células Jurkat silenciadas para a myo IG com PMA/IONO.**Erro! Indicador não definido.**
- 4.12. Expressão de receptores CD3 e CD28 na superfície de células Jurkat silenciadas para a myo IG.**Erro! Indicador não definido.**
- 4.13. *Knockout* da myo IG em células Jurkat.**Erro! Indicador não definido.**
- 4.14. Análise da ativação de células Jurkat *knockout* para a myo IG. **Erro! Indicador não definido.**
- 4.15. Expressão dos receptores CD3 e CD28 em células *knockout* para a myo IG. **Erro! Indicador não definido.**
- 4.16. Superexpressão da myo IG nas células Jurkat.**Erro! Indicador não definido.**
- 4.17. Silenciamento da myo IG em células A3.01**Erro! Indicador não definido.**
- 4.18. Avaliação da ativação de células A3.01 silenciadas para myo IG..... **Erro! Indicador não definido.**
- 4.19. Expressão de receptores CD3 e CD28 em células A3.01..... **Erro! Indicador não definido.**
- 4.20. Mudança do protocolo de ativação das células para avaliação da ativação de células A3.01.....**Erro! Indicador não definido.**
5. DISCUSSÃO.....**Erro! Indicador não definido.**
- REFERÊNCIAS.....22

1. INTRODUÇÃO

1.1. Linfócito T

1.1.1. Estrutura e Função

Os linfócitos T são parte da imunidade adaptativa, responsáveis pela resposta adaptativa celular. Como algumas das células do sistema imune, os linfócitos são derivados da medula óssea. Entretanto, os linfócitos T são maturados no timo (um órgão linfoide primário), de onde é originado seu nome. Ao longo do seu processo de maturação no timo, os precursores dos linfócitos T diferenciam-se em alguns subtipos como: auxiliares TCD4⁺, citotóxicos TCD8⁺, Natural Killer NKT, γ - δ , e reguladores naturais FOXP3⁺, as células T auxiliares foliculares (TFH), entre outros sub tipos celulares (CHOUDHURI et al., 2014; KUMAR; CONNORS; FARBER, 2018).

Depois de da maturação no timo, os linfócitos seguem para a periferia, onde recirculam entre os órgãos linfóides secundários por meio da corrente sanguínea e dos vasos linfáticos. Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ estão em maior número entre os linfócitos da corrente sanguínea. Os linfócitos TCD8 fazem o reconhecimento e eliminação de células infectadas, recrutamento de monócitos e ativação de macrófagos para a eliminação de patógenos intracelulares. Os linfócitos TCD4 são as células que, por meio da produção de citocinas, direcionam a resposta imunológica, participando da ativação de linfócitos B, ativando e recrutando neutrófilos, macrófagos e granulócitos. O tipo de resposta apresentada pelos linfócitos T dependerá dos estímulos recebidos do sistema imunológico inato durante sua ativação, que por sua vez dependem do tipo de patógeno invasor (KUMAR; CONNORS; FARBER, 2018; RUTERBUSCH et al., 2020).

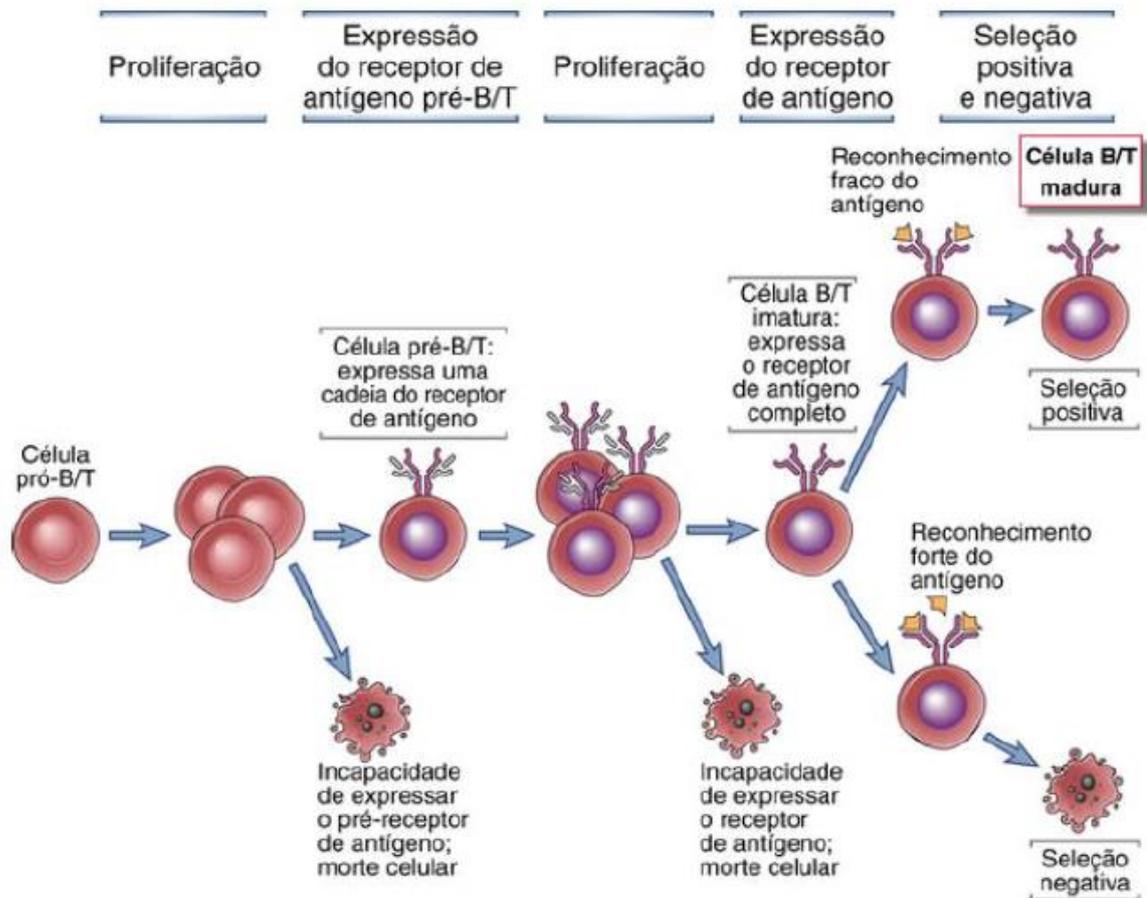


Figura 1: Esquema de maturação do linfócito. Esquema ilustrativo da cascata de maturação e seleção dos linfócitos, apresentando os pontos de seleção positiva e proliferação das células. Adaptado de (ABBAS, ABUL K; LICHTMAN, ANDREW H; PILLAI, 2015)

Dependendo das citocinas presentes, as células T CD4+ se sub diferenciam em células T auxiliares (Th), que possuem 4 perfis principais: Th1, Th2 e Th17 e Treg. Essas células diferem em função e citocinas liberadas. Cada uma é responsável pela resposta a determinados patógenos, como nas células Th1, que são conhecidas pela ação contra vírus e bactérias intracelulares; as células Th2, que possuem importante ação contra helmintos; as Th17, importantes para a resposta contra microrganismos extracelulares e fungos; e as Tregs (Células TCD4+ regulatórias) que são classificadas pela expressão de FOXP3+, e pela expressão de CD25 na membrana, elas são responsáveis pela supressão da resposta imune para a manutenção da homeostase inibindo a proliferação de celular e a produção de citocinas. Os linfócitos T CD4+ podem ainda se diferenciar em células T auxiliares foliculares (TFH), cuja principal função é auxiliar as respostas de linfócitos B, ou ainda podem se tornar

linfócitos T reguladores induzidos, capazes de inibir ou reduzir a ativação e a função efetora de diversas células do sistema imunológico, impedindo assim respostas autoimunes ou respostas indesejadas, e reduzindo o dano tecidual em respostas a antígenos de patógenos, elas também podem ser caracterizadas para expressão da proteína 6 do linfoma de células B do fator de transcrição (BCL-6) (OLATUNDE; HALE; LAMB, 2021; RUTERBUSCH et al., 2020; WOOD; BUSHELL; HESTER, 2014; ZHU, 2018).

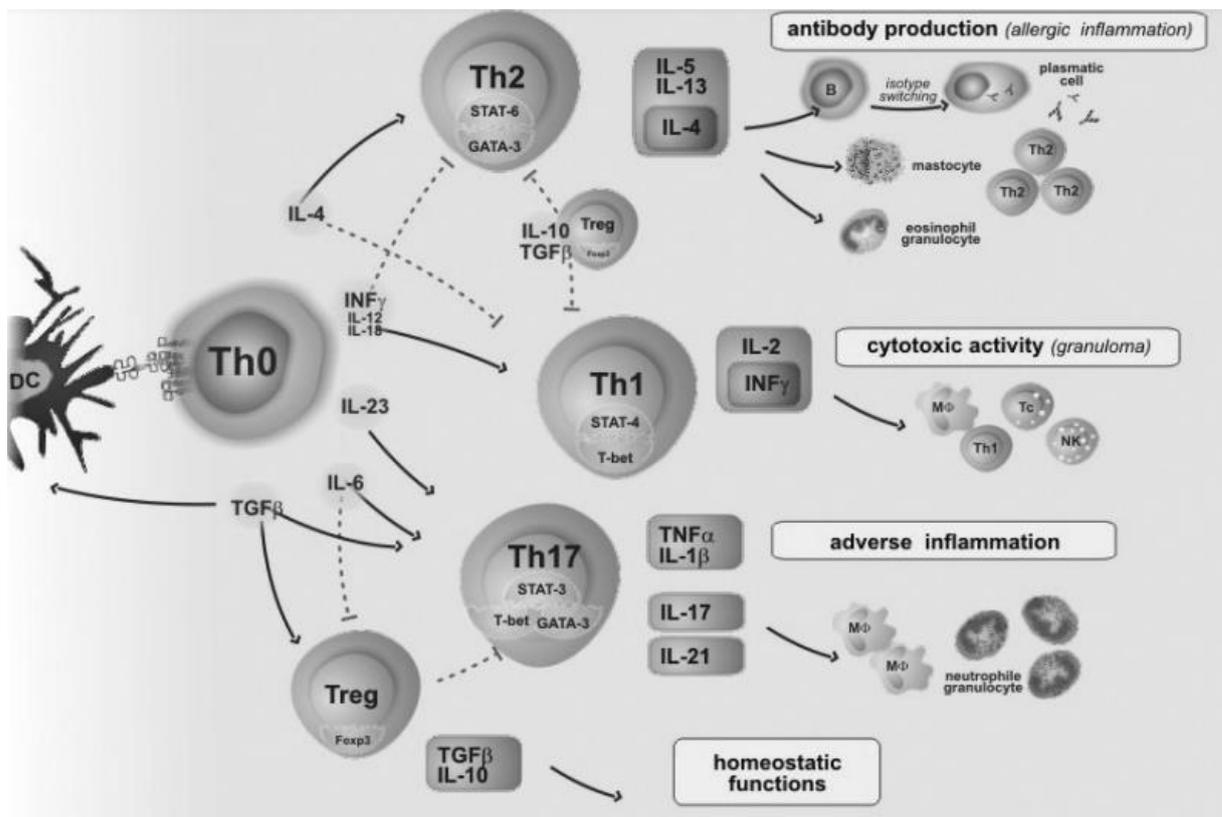


Figura 2: Esquema de diferenciação de células T. Esquema ilustrativo das células T naive são expostas aos peptídeos presentes nas células APC. Dependendo do peptídeo que foi exposto e ao ambiente a célula irá se diferenciar em um subtipo específico. Adaptado de (WOOD; BUSHELL; HESTER, 2014)

O receptor de célula T (TCR) é o principal receptor presente na membrana das células T. Na maior parte dos linfócitos T, o TCR é composto por duas cadeias polipeptídicas que estão diretamente ligadas, a cadeia α e a cadeia β . O TCR também pode ser formado por cadeias γ e δ , que estão presentes nos linfócitos γ/δ , que são a menor população entre os linfócitos circulantes e mais presentes nas mucosas e na pele. As cadeias α e β são as responsáveis pelo reconhecimento de fragmentos de proteínas (peptídeos), apresentados às células T pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC), presente em células apresentadoras de antígenos

(APCs). As cadeias α e β são codificadas por segmentos gênicos variáveis e constantes. Enquanto a cadeia α apresenta dois segmentos variáveis, V e J, a cadeia β é constituída por 3 segmentos variáveis, V, D e J. Esses segmentos são combinados de forma aleatória no genoma pela junção dos segmentos D e J, e depois do segmento V aos segmentos DJ (no caso da cadeia β). Para a cadeia α , ocorre a junção dos segmentos V e J. Durante todo esse processo há adição e remoção de nucleotídeos aleatórios, aumentando ainda mais a diversidade dos receptores. O processo de recombinação é mediado pelas proteínas RAG1 e RAG2 (gene 1/2 de ativação da recombinação). A alta variabilidade de TCRs dada pela recombinação que ocorre em cada célula precursora de linfócito T faz com que milhares de peptídeos diferentes possam ser reconhecidos pelo sistema imunológico (RUTERBUSCH et al., 2020; SZETO et al., 2021).

As cadeias α e β do TCR tem uma porção intracitoplasmática curta, sem domínios de transdução de sinal. Para que a ligação de um peptídeo específico/MHC ao TCR gere uma sinalização intracelular, o complexo do TCR conta ainda com outras cadeias. As moléculas CD3 no organismo estão majoritariamente presentes em células T, associada ao TCR. Elas são compostas por cadeias CD3- γ , CD3- δ , CD3- ϵ e ζ . Essas cadeias possuem motivos de ativação baseados em tirosina de imunorreceptor (ITAM) e ficam dispostas na membrana plasmática próximas ao TCR. As cadeias CD3 auxiliam na transdução do sinal do TCR na ativação celular (MARIUZZA; AGNIHOTRI; ORBAN, 2020; SMITH-GARVIN; KORETZKY; JORDAN, 2009).

Associadas ao TCR também temos duas importantes moléculas acessórias: CD4 e CD8, que diferenciam o subtipo do linfócito T. Durante a maturação do linfócito T no timo, as células chegam a expressar as duas moléculas, sendo denominadas células duplo positivas. Ao longo da maturação da célula, o TCR se ligará em um MHC específico. A ligação do TCR ao MHC de classe I ou II é responsável por determinar qual molécula, CD4 ou CD8, será expressa na superfície celular após a maturação (DUTTA; VENKATAGANESH; LOVE, 2021; KUMAR; CONNORS; FARBER, 2018). Dependendo de qual molécula estiver presente na membrana, a célula se comprometerá com a linhagem CD4 ou CD8. Células portadoras da molécula CD4 são as células auxiliares ou Th (do inglês, T *helper*), devido a sua capacidade de

estimular a resposta de outros tipos celulares e que estão em maior número na circulação sanguínea. E células portadoras da molécula CD8 são as células citotóxicas, responsáveis pelo reconhecimento e eliminação de células infectadas e/ou cancerosas. As moléculas acessórias CD4 e CD8 auxiliam no processo de ativação celular, e levam também a uma ligação mais estável entre o TCR-MHC, que juntamente com o complexo TCR iniciam a formação da sinapse imunológica (SI). A SI é uma estrutura especializada responsável pela ligação estável entre a célula T e a APC, potencializando a ativação e ação dos linfócitos (KUMARI et al., 2014; ZHU, 2018).

Um importante grupo de moléculas de superfície que auxilia na ativação dos linfócitos T são os co-estimuladores. Dentre eles, o mais bem descrito na literatura é o CD28, que auxilia na ativação da célula T após reconhecimento do antígeno, principalmente em linfócitos virgens. As APCs expressam moléculas co-estimuladoras denominadas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), que são ligantes da molécula CD28 expressa em células T, e ao se ligarem, levam um sinal positivo de ativação para a célula T. As moléculas CD28 também podem se ligar aos receptores CTLA-4 ou PD-1 que geram um sinal negativo para as células T, inibindo sua ativação (CHAPMAN; BOOTHBY; CHI, 2020; DUSTIN, 2014).

As moléculas CD28 são um homodímero ligado por pontes de dissulfeto e suas subunidades possuem apenas um domínio de Imunoglobulina (Ig) extracelular. Em humanos, são expressas em mais de 90% das células TCD4+ e 50% das células TCD8+ circulantes. A CD28 tem como principal função ativar vias de sinalização que potencializam e trabalham em conjunto com os sinais do TCR, favorecendo a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células T (DUSTIN, 2014).

1.1.2. Cascata De Ativação Celular

Os linfócitos T são ativados através do TCR, que reconhece um peptídeo ligado ao MHC carregado por uma APC. Para que ocorra a ativação precisa haver uma transdução de sinal intracelular. Além do MHC, tanto a célula T como as APCs carregam diversas moléculas em sua membrana que são necessárias para a célula

ser ativada. Além dessas moléculas, outros estímulos são indispensáveis para uma ativação efetiva, como as citocinas (SZETO et al., 2021).

A cascata de sinalização envolvida na ativação dos linfócitos T por meio de seus TCRs está descrita a seguir e também ilustrada na figura 3.

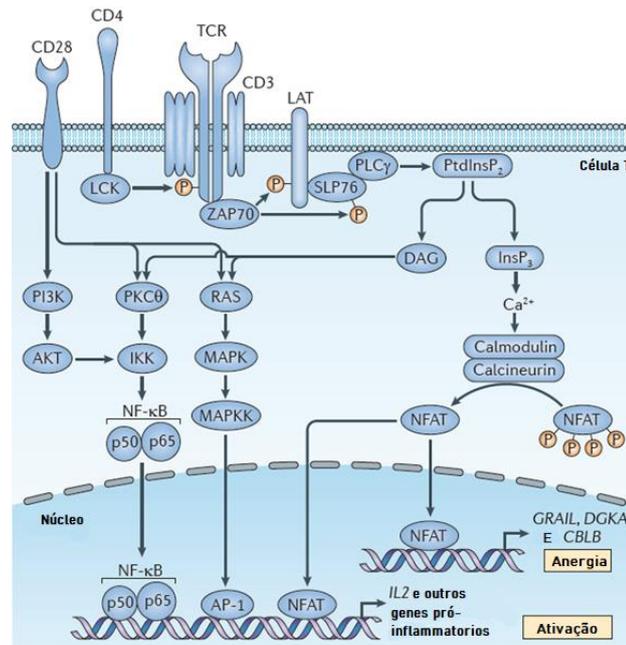


Figura 3: Cascata de Ativação do Linfócito T. Esquema da cascata de ativação do linfócito T, com as vias de ativação dos fatores de transcrição NF- κ B (fator de transcrição nuclear κ B), AP-1 e NFAT (fator nuclear das células T ativadas). Adaptado de (POLLIZZI; POWELL, 2014).

Com o reconhecimento do peptídeo/MHC pelo TCR, há um agrupamento das cadeias do complexo TCR e correceptores, culminando na fosforilação dos ITAMs das cadeias CD3. Os ITAMs são fosforilados pela quinase Lck, associada às caudas citoplasmáticas das moléculas CD4 e CD8, e iniciam a transdução de sinal e ativação das próximas tirosina quinases que serão recrutadas, como por exemplo a ZAP-70 (DUSTIN, 2014; KANE; LIN; WEISS, 2000; KUMARI et al., 2014).

Após a fosforilação, os ITAMs das cadeias CD3 e ζ se tornam sítios de ancoragem para a ZAP-70, e esta pode então ser fosforilada (e ativada) pela Lck. A ZAP-70 ativada fosforila proteínas como a proteína adaptadora para a ativação de células T (LAT), e a proteína leucocitária contendo domínio SH2 de 76 kDa (SLP-76).

A proteína LAT ativada se liga à enzima fosfolipase C γ 1 (PLC γ 1) e conduz o recrutamento de outras proteínas adaptadoras como GRB-2, VAV e GADS (DUSTIN, 2014; KUMARI et al., 2014; SMITH-GARVIN; KORETZKY; JORDAN, 2009).

A proteína fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K) também é ativada durante a transdução de sinal do TCR. A PI3K fosforila o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol trifosfato, auxiliando no recrutamento de outras proteínas que auxiliam na transdução de sinal, como a Itk (SMITH-GARVIN; KORETZKY; JORDAN, 2009).

As proteínas adaptadoras GRB-2 têm a função de recrutar fatores de troca de GDP por GTP da proteína Ras, denominado de SOS. A troca de GDP por GTP leva a proteína Ras da sua forma inativa para a forma ativa, e isso leva a ativação da via MAP quinase, que leva à ativação de fatores de transcrição no núcleo da célula como o AP-1. Em paralelo a essa via de ativação, as proteínas GRB-2 e SOS também recrutam outra proteína de troca de GDP por GTP, a VAV, que ativa uma outra proteína membro da família de GTPases, a Rac. A Rac é responsável pela ativação de outra via MAP quinase paralela à via ativada pela proteína Ras. Essa via agirá sobre a quinase N-terminal c-Jun (JNK). A proteína Ras ativada também tem importante ação na reorganização do citoesqueleto e no agrupamento dos complexos de receptores, facilitando a SI (SMITH-GARVIN; KORETZKY; JORDAN, 2009).

A PLC γ 1 fosforilada pela LAT impulsiona a quebra do fosfolípido de membrana plasmática PIP2. O PIP2 hidrolisado irá gerar 2 produtos: o inositol 1,4,5 trisfosfato (IP3) e o diacilglicerol (DAG). O IP3 desencadeia um rápido aumento de cálcio intracelular (SMITH-GARVIN; KORETZKY; JORDAN, 2009), e o DAG ativa a proteína quinase C (PKC). A ativação da PKC ocasiona a fosforilação de diversas outras proteínas. Uma das isoformas da PKC, a PKC- θ , está presente na SI e diretamente envolvida na ativação do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), importante fator de transcrição de citocinas (DUSTIN, 2014; SMITH-GARVIN; KORETZKY; JORDAN, 2009).

Após a produção de IP3 e o DAG, o IP3 se liga aos seus receptores (IP3R) presentes no retículo endoplasmático. Isso gera um pico na concentração de Ca²⁺ intracelular (Ca²⁺ⁱ). Após o esgotamento das reservas de Ca²⁺, ocorre a abertura dos canais de Ca²⁺ presentes na membrana plasmática, aumentando ainda mais a

concentração de Ca^{2+} . O aumento de Ca^{2+} permite a interação entre a calmodulina e a enzima calcineurina. Essa interação leva à desfosforilação do fator de transcrição do fator nuclear das células T ativadas (NFAT), que se ativa e vai para o núcleo juntamente com os fatores de transcrição NF- κ B e AP-1, que juntos regulam a transcrição de genes como o da citocina IL-2 (GALLO; CANTÉ-BARRETT; CRABTREE, 2005).

Os fatores de transcrição são cruciais para a maioria das respostas celulares. Para a ativação de células T, os principais fatores são AP-1, NF- κ B e NFAT. O NFAT será fundamental na expressão de genes codificadores das citocinas IL-2, IL-4 entre outras (GALLO; CANTÉ-BARRETT; CRABTREE, 2005; KUMARI et al., 2014).

Com a ativação do linfócito T, haverá diversas mudanças nas moléculas de superfície, que foram mais bem descritas em células TCD4+. Uma das moléculas de ativação presentes na superfície de células ativadas é o CD69, considerado um marcador de ativação precoce, e que pode ser identificado dentro de algumas horas após a ligação TCR-MHC. Outra importante molécula expressa na superfície de células ativadas são as cadeias que compõem os receptores da citocina IL-2 (por exemplo IL-2R α / CD25). A presença de receptores de IL-2 permitirá a ligação da citocina IL-2, que é uma das citocinas responsáveis pela proliferação, sobrevivência e diferenciação das células T, e pode também ser utilizada como marcador de ativação (ALONSO-CAMINO et al., 2009; BANKOVICH; SHIOW; CYSTER, 2010; CHAPMAN; BOOTHBY; CHI, 2020; MORGAN; RUSCETTI; GALLO, 1976).

1.2. A Sinapse Imunológica

Como citado anteriormente, a SI tem como função estabilizar a ligação entre o MHC/peptídeo e TCR através da mobilização de várias moléculas sinalizadoras e adesivas, formando uma estrutura semelhante a um alvo, conhecida como grupo de ativação supramolecular (SMAC). Algumas das moléculas presentes ao longo da membrana plasmática da célula T são mobilizadas para o centro da sinapse (ou SMAC central, c-SMAC) incluindo o complexo TCR, correceptores CD4 ou CD8, e receptores coestimuladores (como CD28), enzimas como a PKC- θ e proteínas adaptadoras associadas às caudas citoplasmáticas. As integrinas como a LFA-1 ficam na periferia

da SI e são responsáveis por manter a ligação entre célula T e APC mais estável. Essa região é denominada de grupo de ativação supramolecular periférico (p-SMAC). Foi ainda identificada mais uma estrutura na SI, o grupo de ativação supramolecular distal (d-SMAC), que é essencial na formação dos arcos de actina e no movimento de microagrupamentos de TCR que são direcionados para o c-SMAC. É no d-SMAC também que se concentram moléculas com ectodomínios maiores como CD43 e CD45, além da F-actina (BURKHARDT; CARRIZOSA; SHAFFER, 2008; DUSTIN, 2014; KUMARI et al., 2014).

As SMACs estão inicialmente localizadas em regiões da membrana plasmática que possuem proporções de lipídios diferentes do restante da mesma. Essas regiões são denominadas de *lipid-rafts*. A sinalização dos receptores e correceptores são iniciadas nas *lipid-rafts*, que iniciam um rearranjo no citoesqueleto promovendo a união das *lipid-rafts*, e assim a formação da SI. A SI é importante pois sua formação implica a aglomeração de diversas moléculas em um pequeno espaço permitindo uma ligação prolongada entre as moléculas de TCR e MHC/pep não obstante a baixa afinidade entre elas. Adicionalmente a SI assegura a entrega localizada de citocinas provenientes da célula T para a APC (ABBAS, ABUL K; LICHTMAN, ANDREW H; PILLAI, 2015; DUSTIN, 2014; ROY; BURKHARDT, 2018).

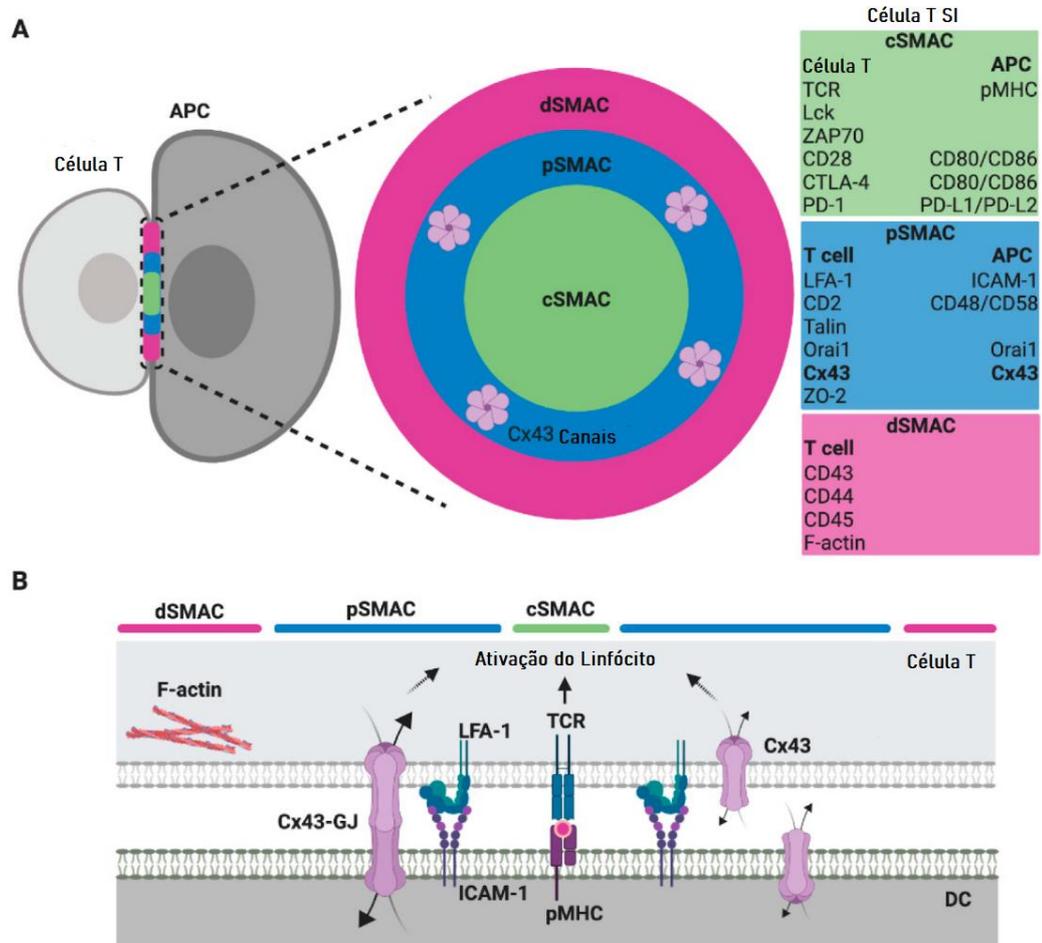


Figura 4: Esquema do Grupo de Ativação Supramolecular. Esquema ilustrativo da disposição do SMAC na membrana plasmática. (A) Disposição do SMAC na membrana plasmática, e da organização entre as estruturas do SMAC com os receptores e moléculas acessórias respectivas. (B) Disposição dos receptores, moléculas acessórias na membrana plasmática durante a ligação do TCR - MHC/pep. Adaptado de (TITTARELLI et al., 2020).

1.3. Citoesqueleto

A célula tem capacidade de se movimentar, interagir com outras células do organismo e se multiplicar, entre diversas características. Esses processos são mediados pela montagem e desmontagem de proteínas de uma estrutura proteica denominada citoesqueleto. Entre suas diversas funções, o citoesqueleto é o responsável por manter o formato e a estrutura celular. Adicionalmente, o citoesqueleto é uma estrutura dinâmica que se adapta de acordo com a função celular e o ambiente externo (FLETCHER; MULLINS, 2010; HOHMANN; DEGHANI, 2019).

O citoesqueleto também é determinante na origem da mecânica das respostas à carga das células (PEGORARO; JANMEY; WEITZ, 2017), além de estabilizar as células contra stress, mudança conformacional, e de fazerem a conexão bioquímica entre a célula e o ambiente externo. O citoesqueleto também está envolvido no tráfego intracelular e no posicionamento das organelas e moléculas nas células, como por exemplo quando a célula B ativada se diferencia em plasmócito a fim de produzir anticorpos e para isso muda toda a sua conformação. Para que isso ocorra, essas proteínas precisam interagir entre si (FLETCHER; MULLINS, 2010; HOHMANN; DEHGHANI, 2019).

O citoesqueleto é composto de diversas proteínas, dentre as quais podemos destacar 3 principais grupos: microtúbulos, microfilamentos de actina e filamentos intermediários. As estruturas diferem em diversos fatores como em sua função na célula, estrutura química, rigidez, polaridade, e os tipos de proteínas motoras associadas (PEGORARO; JANMEY; WEITZ, 2017).

1.3.1. Microtúbulos

Os microtúbulos são filamentos ocos de tubulina que são gerados a partir do centro de organização de microtúbulos (MTOC). Os microtúbulos apresentam uma instabilidade dinâmica caracterizada por uma alternância repentina de polimerização e despolimerização rápida. Entretanto, são considerados polímeros rígidos quando comparados com os outros componentes do citoesqueleto (FLETCHER; MULLINS, 2010; HOHMANN; DEHGHANI, 2019).

Uma das ações importantes dos microtúbulos é o transporte de cargas como mRNA, vesículas entre outras, utilizando proteínas motoras como cinesinas e dineínas. Além da sua indispensável ação durante a divisão celular como na mitose durante a separação dos cromossomos, no controle do formato da célula e no tráfego de vesículas (FLETCHER; MULLINS, 2010; HALL, 1998; HOHMANN; DEHGHANI, 2019).

1.3.2. Filamentos Intermediários

Os filamentos intermediários são estruturas menos rígidas que as outras proteínas do citoesqueleto, mas, ao contrário dos microtúbulos e dos filamentos de actina, os filamentos intermediários não são polarizados e não estão associados a motores moleculares (HOHMANN; DEHGhani, 2019).

Possuem grande importância para o funcionamento celular por estarem presentes no processo de migração e adesão à matriz extracelular. Além disso, por estarem ancorados na membrana plasmática, os filamentos intermediários são capazes de formar um andaime para as mitocôndrias, aparelho de Golgi e para outras organelas se organizarem (HOHMANN; DEHGhani, 2019).

1.3.3. Citoesqueleto de Actina

Presentes no citoplasma e no núcleo das células, os filamentos de actina são considerados filamentos semiflexíveis (HOHMANN; DEHGhani, 2019), e os mais dinâmicos entre os três principais componentes do citoesqueleto, por serem eficientes em fazer mudanças estruturais em poucos minutos. Nas células, eles apresentam dois estados: a actina-G monomérica e a actina-F filamentosa. A actina forma uma rede de filamentos polarizados que estão associados à geração de força para adesão, mudanças de forma e movimento da célula (FLETCHER; MULLINS, 2010).

Já foram descobertas mais de 150 proteínas que contêm domínios de ligação à actina. Entre elas, encontram-se proteínas reguladoras, que estimulam a polimerização ou despolimerização, proteínas aglomeradoras de filamentos, proteínas motoras, etc. (FLETCHER; MULLINS, 2010). Os principais reguladores de actina são as RhoGTPases, como Rac, que promove a formação de lamelipódios; Cdc42, que estimula a extensão de filopódios; e RhoA que gera longas fibras de stress (DALY, 2004; EL MASRI; DELON, 2021).

Os filamentos de actina possuem alguns mecanismos responsáveis pela despolimerização, um deles é pela ação da família de proteínas ADF/cofilina que se ligam à actina e são capazes de fragmentar os filamentos de actina (KUMARI et al.,

2014). Outro mecanismo é o inibidor do complexo Arp2/3 o Arpin, ou lamelipodia, entre outros mecanismo (ROTTNER et al., 2017).

Os fatores promotores de nucleação ativam proteínas como o complexo Arp2/3 (proteínas relacionadas com a actina), que se liga a filamentos de actina já existentes, e promove a ramificação dos mesmos. Já as forminas induzem a polimerização de filamentos de actina não ramificados (DALY, 2004; FLETCHER; MULLINS, 2010; TANG; GERLACH, 2017).

Diferente dos microtúbulos, os filamentos de actina não oscilam entre os estados de polimerização e despolimerização, eles se alongam de uma forma constante na presença de monômeros ligados a nucleotídeos e se desmontam quando há uma sinalização para isso (FLETCHER; MULLINS, 2010).

Como os microtúbulos, os filamentos de actina possuem as miosinas como motores moleculares cujo movimento depende de sua polaridade estrutural. Esses motores moleculares se movem pelo citoesqueleto em um único sentido, preferencialmente, e são capazes de transportar cargas e moléculas ao longo dos microtúbulos e dos filamentos de actina (FLETCHER; MULLINS, 2010; TANG; GERLACH, 2017).

1.3.4. Citoesqueleto na Ativação da Célula T

As células T são altamente móveis e capazes de se deslocar por todos os tecidos do corpo. Dentre as células sanguíneas, a célula T é a que se move mais rápido pelos vasos e tecidos, com seu movimento sendo principalmente no modo amebóide. É através do citoesqueleto de actina formando pseudópodes na parte da frente da célula que faz com que a motilidade celular ocorra. Acredita-se que a formação dos pseudópodes na região anterior, assim como a ausência de pseudópodos na parte posterior, sejam controladas por RhoGTPases (BURKHARDT; CARRIZOSA; SHAFFER, 2008).

A mudança na conformação estrutural da célula T está presente em diversas fases da célula, sendo indispensável durante a ativação da célula T e na formação da SI. Ao reconhecer o complexo MHC-pep, o linfócito T passa de uma ligação fraca para

uma mais forte, e tem uma desaceleração na motilidade da célula com intuito de que ela fique aderida por mais tempo naquela região, a fim de propiciar uma interação TCR - MHC/peptídeo mais longa. Isso ocorre em questão de segundos (KUMARI et al., 2014).

A célula T é capaz de mudar sua conformação de amebóide para uma forma mais arredondada, e estende grande pseudópodes e lamelipódios em direção à APC formando uma interface mais achatada e rica em F-actina com a APC (BURKHARDT; CARRIZOSA; SHAFFER, 2008). Com a ativação da célula T ocorre então a sinalização intracelular e a polimerização de actina que se retroalimenta, levando a um aumento no contato célula-célula e estabilizando ainda mais a ligação APC - célula T (KUMARI et al., 2014).

São os filamentos de actina presentes na região anterior de células migratórias os responsáveis pela formação de estruturas como d-SMAC que é rico em actina, p-SMAC rico em actomiosina e c-SMAC que tem uma baixa quantidade de F-actina. No início da formação da SI, há uma alta taxa de polimerização da actina a fim de formar essas estruturas que têm o intuito de tornar a SI o mais estável possível, e intensificar o sinal intracelular da ativação da célula T (KUMARI et al., 2014). Não só a falta de actina interfere em uma boa formação da SI, como seu excesso também prejudica o conjugado APC - célula T, por isso se faz importante a ação plena dos fatores

polimerizadores e despolimerizadores de actina durante a ativação do linfócito T (BURKHARDT; CARRIZOSA; SHAFFER, 2008; KUMARI et al., 2014).

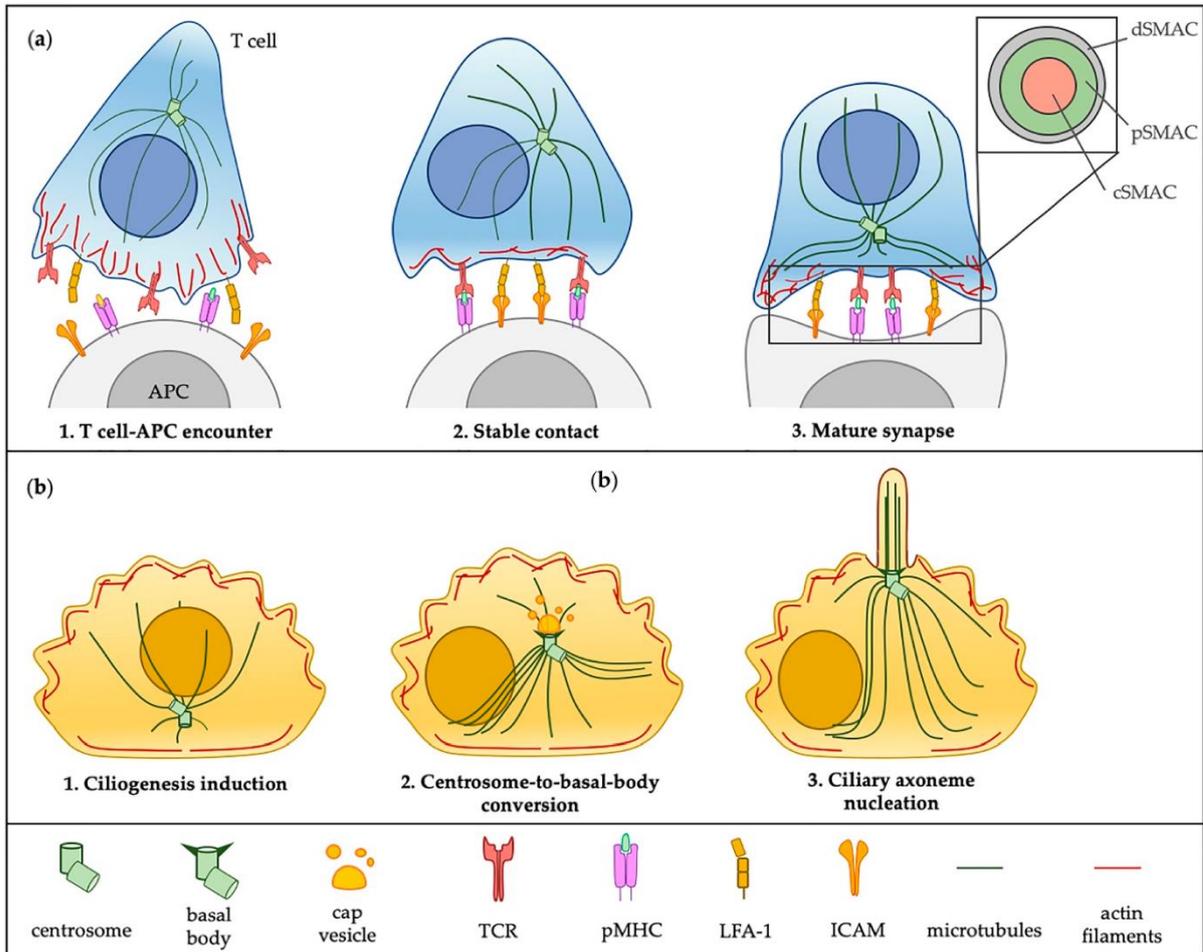


Figura 5: Esquema das Etapas da Sinapse Imunológica . Esquema ilustrativo da disposição do SMAC na membrana plasmática durante a SI. (A) Disposição do SMAC na membrana plasmática, e da organização entre as estruturas do SMAC com os receptores e moléculas acessórias respectivas durante a SI. (B) Disposição das proteínas do citoesqueleto durante a sinapse imunológica, (CASSIOLI; BALDARI, 2019)

Após a descoberta da importância da polimerização de actina na formação de sinapses imunológicas e ativação da célula T, tem havido uma crescente produção de trabalhos nessa área, entretanto ainda há muitos detalhes dessa relação que precisam ser melhor esclarecidos.

A polimerização de actina no núcleo parece também ser importante para a ativação dos linfócitos T. Um trabalho do grupo do Dr. Oliver Fackler mostrou que a

estimulação do TCR com diferentes estímulos resulta em um aumento expressivo na polimerização de actina no núcleo da célula. Além dessa relação direta, eles observaram durante o estudo que essa actina nuclear é indispensável na produção de citocinas efetoras como IL-2, IL-6, IL-9, IL-10, IL-21, IFN- γ e TNF- α . Esse evento foi observado tanto em células de linhagem quanto em células primárias de humanos e camundongos (TSOPOULIDIS et al., 2019).

O citoesqueleto de actina também está diretamente relacionado com a migração celular. Durante a passagem da corrente sanguínea para os tecidos temos diversas moléculas de adesão que auxiliam a célula a diminuir sua velocidade e aderir à parede dos vasos sanguíneos a fim de migrar de um tecido para outro. Durante esse processo temos uma relação forte entre integrinas e a F-actina. Essa ligação faz com que a F-actina intracelular interaja com a matriz extracelular (SUN; GUO; FÄSSLER, 2016).

Certamente o citoesqueleto de actina é importante em outras fases da ativação dos linfócitos T, como no tráfego de vesículas para a sinapse e secreção de citocinas e outras moléculas, assim como na expressão de moléculas na superfície. O papel do citoesqueleto de actina em etapas anteriores, como a translocação de fatores de transcrição para o núcleo, por exemplo, ainda não está bem elucidado (revisto pelo grupo do Dr. Di Bartolo) (MASTROGIOVANNI et al., 2020).

1.4. Miosinas

Uma célula pode, em dado momento, expressar dezenas de proteínas motoras capazes de realizar uma variedade de funções indispensáveis (HARTMAN et al., 2011).

As miosinas são o grupo de motores moleculares pertencentes ao citoesqueleto de actina. Elas utilizam a energia derivada da hidrólise do ATP para se mover ao longo dos filamentos transportando cargas e moléculas, influenciando em sua localização e conformação, ou gerando tensão sobre eles (COLUCCIO, 2020; HOHMANN; DEHGHANI, 2019). Esta superfamília de proteínas está diretamente relacionada a diversas funções biológicas como motilidade celular, tráfego de organelas, citocinas, manutenção do formato celular, endo e exocitose, contração

muscular e diversas outras (MARAVILLAS-MONTERO; SANTOS-ARGUMEDO, 2011; MATOZO; KOGACHI; DE ALENCAR, 2022).

As miosinas são formadas por um domínio motor ou cabeça (HARTMAN et al., 2011), que possui sítios de ligação ao ATP e à actina; um domínio de ligação de cadeia leve ou pescoço, que contém um ou mais motivos isoleucina-glutamina (IQ) aos quais se ligam calmodulina ou uma cadeia leve semelhante à calmodulina; e uma região C-terminal ou domínio de cauda que é a região mais variável das miosinas e que pode conter um ou vários motivos envolvidos em diversas funções como dimerização, ligação à membrana ou a carga. É a cauda a região responsável pela interação da miosina com outras proteínas, permitindo assim que as miosinas participem de diversos processos celulares (COLUCCIO, 2020; MARAVILLAS-MONTERO; SANTOS-ARGUMEDO, 2011).

As miosinas são heteroméricas e podem ser formadas por uma ou duas cadeias pesadas e um variável número de cadeias leves. As cadeias leves mantêm a rigidez da região do pescoço, na cadeia pesada das miosinas. Outra grande diferença entre as miosinas será a quantidade de tempo em que os motores moleculares ficam ligados à actina durante o ciclo de hidrólise de ATP (HARTMAN et al., 2011; MARAVILLAS-MONTERO; SANTOS-ARGUMEDO, 2011).

Sua atividade ATPásica na ligação e liberação da actina é capaz de gerar movimentos mecânicos, e durante o ciclo de hidrólise de ATP o domínio motor é capaz de dar um “passo” ou deslizar sobre o filamento de actina, se ligando à região seguinte. O direcionamento do movimento da miosina é dependente da região do pescoço, que amplifica as mudanças conformacionais ocorridas na cabeça (HARTMAN et al., 2011; MATOZO; KOGACHI; DE ALENCAR, 2022).

Nos seres humanos foram encontrados cerca de 40 genes que representam 12 classes miosinas, e uma única célula pode expressar diversas classes, subtipos e formas de *splicing* dessas moléculas (COLUCCIO, 2020). De acordo com a análise do grupo da Dr^a Titus, foi determinado que a nomenclatura ideal para se referir aos genes das miosinas é utilizar *MYO1G* (exemplo), e para proteína o ideal é utilizar *myo1G* (exemplo) (GILLESPIE et al., 2001).

As miosinas se diferenciam em estrutura, função, localização e expressão nas células. Sua disfunção está associada a diversas doenças como cardiomiopatias, surdez, cegueira, doença renal, defeitos neurológicos entre outras (COLUCCIO, 2020).

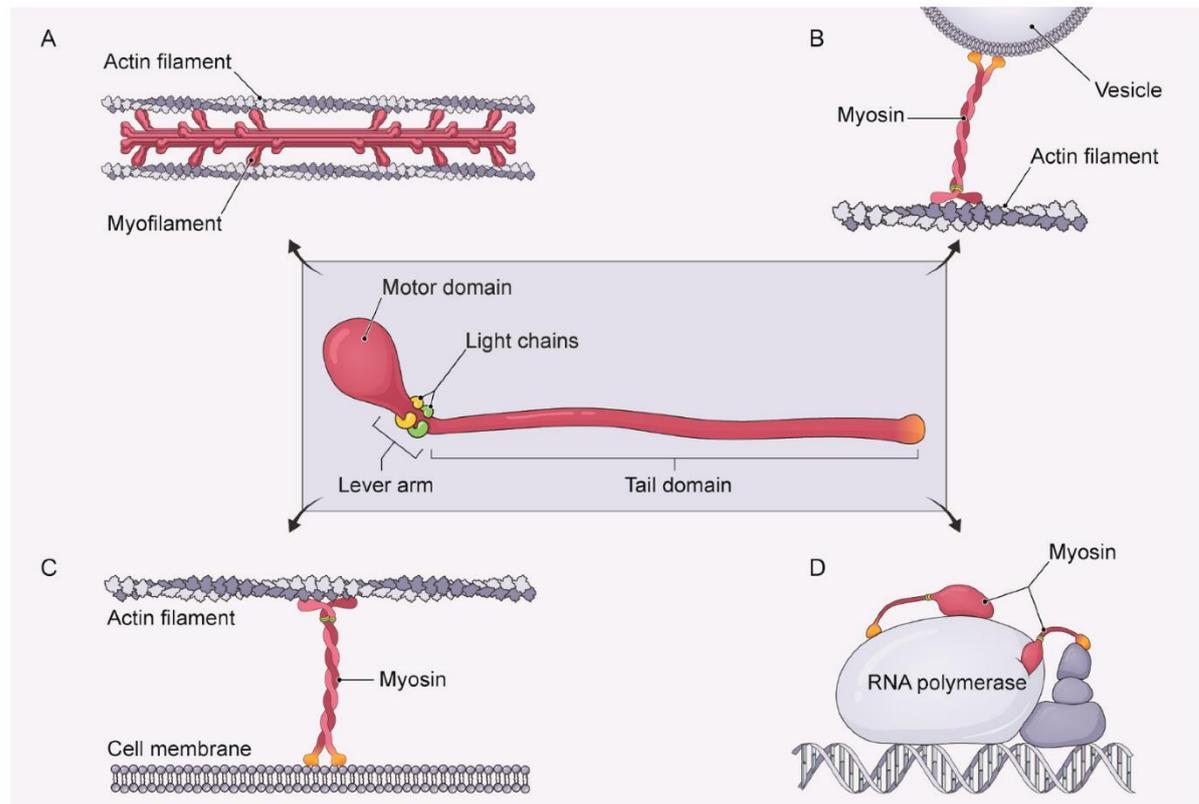


Figura 6: Esquema das funções das miosinas nas células. Esquema representativo da estrutura comum de diferentes miosinas convencionais e não convencionais e suas funções nas células. Adaptado de (NAYDENOV et al., 2021)

A primeira miosina descoberta e a mais estudada até os dias de hoje é a miosina de classe II. Ela foi descoberta durante estudos da contração muscular no músculo esquelético por Kühne há mais de 150 anos (KÜHNE, 1864), mas foi depois de muitos anos que ela foi reconhecida como uma ATPase responsável pela contração muscular.

Além da miosina II muscular, temos também as miosinas tipo II não musculares (NMMII), que são expressas em praticamente todas as células animais. Elas estão relacionadas com diversas funções celulares como migração, citocinese, morfogênese de organelas entre outras. Em humanos, as NMMII são codificadas pelos genes *MYH9*, *MYH10* e *MYH14* (GOLOMB et al., 2004; SHUTOVA; SVITKINA, 2018). As NMMII são tão essenciais para o funcionamento celular, que em um estudo

realizado por Mhatre et al. (2007), foi observado que camundongos *knockout* para um único alelo da miosina IIA (*MYH9*) não sobrevivem à fase embrionária (MHATRE et al., 2007).

Nos linfócitos, dentre outras funções, as miosinas II também medeiam uma contração no arco de actina na área do p-SMAC, o que é um fator adicional no movimento do S-MAC e na formação de SI. Foi visto que a inibição da miosina II resulta na formação prejudicada do SMAC na região do c-SMAC. Adicionalmente, foi visto pelo grupo do Dr. Dustin e do Dr. Hammer III^o, que a inibição da miosina II levou a uma formação defeituosa do c-SMAC (ILANI et al., 2009; KUMARI et al., 2014; YI et al., 2012).

A miosina tipo II é uma peça chave na adaptação da motilidade celular da célula T em diferentes tecidos. Acredita-se que a miosina II regule a interação das células T com o substrato pela mediação de quantas moléculas de adesão estarão interagindo com o mesmo (KRUMMEL; FRIEDMAN; JACOBELLI, 2014).

Em resumo, as miosinas tipo II não-musculares apresentam importantes funções nas células, inclusive durante a ativação dos linfócitos T. Essa classe de miosinas é sem dúvida a mais estudada, não somente por ter sido a primeira a ser descoberta, mas também em consequência da existência de um inibidor razoavelmente específico, a blebistatina.

1.4.1. As Miosinas Não Convencionais

Após a descoberta das miosinas tipo II, que ficaram conhecidas como miosinas convencionais, outras classes de miosinas (denominadas “não convencionais”) também foram descritas (COLUCCIO, 2020). No genoma humano existem cerca de 24 miosinas não convencionais que são classificadas em 11 subfamílias de acordo com a sua estrutura (COLUCCIO, 2020). Segundo a literatura, destas 11 subfamílias, apenas 7 são expressas em linfócitos T, sendo elas myo IC, IG, II, VA, IXA, IXB e XVIIIA (MARAVILLAS-MONTERO; SANTOS-ARGUMEDO, 2011).

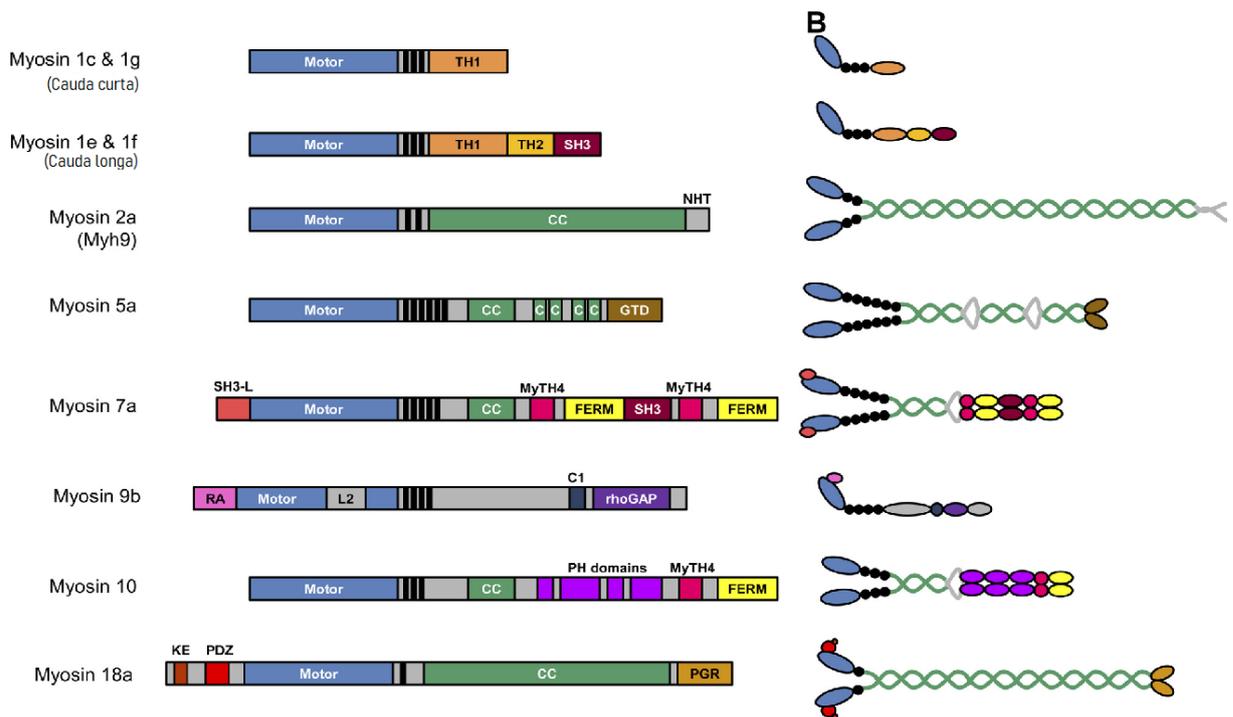


Figura 7: Esquema da Estrutura das Miosinas Não-Convencionais. Esquema da estrutura das miosinas dividido por classes. (A) Esquema representativo da sequência gênica das classes de miosinas. (B) Esquema representativo da estrutura da proteína na célula. Adaptado de MARAVILLAS-MONTERO (MARAVILLAS-MONTERO; SANTOS-ARGUMEDO, 2011).

1.4.1.1. Miosinas de Classe I (myo I)

Sendo a primeira classe de miosinas não-convencionais a serem descritas, as miosinas de classe I compõem a maior e mais antiga evolutivamente subfamília de miosina não-convencionais por possuir 8 membros (MATOZO; KOGACHI; DE ALENCAR, 2022). Elas são responsáveis pela regulação de diversas funções celulares como transporte de organelas, regulação do citoesqueleto, motilidade celular, geração de lamelipódios, exocitose, endocitose entre outras (COLUCCIO, 2020; MARAVILLAS-MONTERO; SANTOS-ARGUMEDO, 2011; PATINO-LOPEZ et al., 2010a).

Elas contêm uma única cadeia pesada, sendo, portanto, proteínas monoméricas e não formando filamentos. O número de domínios IQ varia nas diferentes miosinas de classe I. A cauda apresenta 1 ou 3 domínios: as miosinas tipo I de cauda curta (myo IA, IB, IC, ID, IG, IH) possuem apenas o domínio de homologia

de cauda 1 (TH1) enquanto as miosinas tipo I de cauda longa (myo IE e IF) apresentam, além do TH1, domínios TH2 e TH3. A região TH1 está relacionada à ligação a fosfoinosítídeos de membrana. Já a região TH2 é rica em glicina, prolina, guanina/alanina, e também possui um sítio de ligação à actina insensível ao ATP; e a região TH3 é um domínio de homologia SRC 3 (SH3), uma região de interação proteína-proteína (MARAVILLAS-MONTERO; SANTOS-ARGUMEDO, 2011; PATINO-LOPEZ et al., 2010a).

Um importante membro da classe I das miosinas é a myo IC. Sua expressão pode variar de tecido para tecido, mas essa miosina é conhecida por sua presença em estruturas ricas em actina próximas à membrana plasmática. Foi classificada como um motor versátil por desempenhar diversas funções como participar do movimento das vesículas contendo o receptor GLUT4 em adipócitos. Essa miosina também está associada à membrana plasmática de linfócitos B nos *lipid-rafts* com uma forte co-localização de MHC-II. O *knockdown* da myo IC em células B evidenciou uma menor apresentação de antígenos, que levou posteriormente a uma quantidade menor de células T ativadas (GIESE et al., 2021; HARTMAN et al., 2011; MARAVILLAS-MONTERO et al., 2011; MARAVILLAS-MONTERO; SANTOS-ARGUMEDO, 2011).

Outra miosina bastante expressa em células hematopoiéticas é a myo IG. É o subtipo de miosina de classe I mais expresso em linfócitos T (PATINO-LOPEZ et al., 2010). Boa parte da sua expressão está concentrada na membrana plasmática e enriquecida nas microvilosidades. Pode ser encontrada em *lipid-rafts* co-localizando com GM1 (LINKERMANN et al., 2008; MARAVILLAS-MONTERO; SANTOS-ARGUMEDO, 2011; PATINO-LOPEZ et al., 2010).

A myo IG está associada a diversas funções como na regulação da elasticidade celular, motilidade celular, e tensão de membrana (OLETY et al., 2010). Em células T, ela é essencial na varredura das APCs e conseqüentemente na resposta a patógenos (GÉRARD et al., 2014b).

Nos linfócitos B, a myo IG está envolvida no controle da endocitose de microrganismos e na exocitose de hormônios e citocinas (MARAVILLAS-MONTERO et al., 2014), além de estar relacionado com a motilidade da célula (LÓPEZ-ORTEGA; SANTOS-ARGUMEDO, 2017a), e com a expressão de moléculas adesivas

(MARAVILLAS-MONTERO et al., 2014). Também em linfócitos B, a Myo1g está implicada na reciclagem de moléculas CD44 da membrana, e, portanto, sua ausência interferiu na adesão das células e na formação da sinapse imunológica (LÓPEZ-ORTEGA; SANTOS-ARGUMEDO, 2017a; MARAVILLAS-MONTERO et al., 2014).

A myo IG também é importante no funcionamento de outras células como nos macrófagos, onde participa da fagocitose mediada por receptores Fc γ (Fc γ R) (DART et al., 2012). Foi visto também que a myo IG está diretamente relacionada com a progressão do câncer de pulmão, no qual a proliferação celular tumoral levou à superexpressão da miosina no local, em nível de RNAm (LV et al., 2023).

1.4.1.2. Miosinas de Classe V (myo V)

Miosinas da classe V são as mais bem caracterizadas dentre as não-convencionais em relação à função celular, propriedade enzimática e regulação. Presentes no citoplasma, as myo V são diméricas e seu pescoço possui motivos de IQ capazes de fazer ligações em seis cadeias leves da família das calmodulinas. Sua região de cauda apresenta domínios superhélice, que auxiliam na dimerização (CHENEY et al., 1993; MARAVILLAS-MONTERO; SANTOS-ARGUMEDO, 2011; ZHANG; YAO; LI, 2018).

Os membros dessa classe de miosinas são conhecidos pelo transporte de carga como melanossomas, vesículas secretoras e alguns tipos de RNAs. Essas proteínas, além de interagirem com microfilamentos, também têm uma importante interação com outras proteínas do citoesqueleto como microtúbulos, motores de cinesina, filamentos intermediários e proteínas de ancoragem de organelas (MARAVILLAS-MONTERO; SANTOS-ARGUMEDO, 2011; ZHANG; YAO; LI, 2018).

Uma das miosinas mais bem caracterizadas da classe V é a myo VA. Dentre as suas diversas funções, é sabido que a myo VA também auxilia no transporte baseado em actina no retículo endoplasmático liso das espinhas dendríticas dos neurônios (SELLERS et al., 2008; VAN GELE; DYNODT; LAMBERT, 2009).

1.4.1.3. Miosinas de Classe IX (myo IX)

Vertebrados possuem apenas dois genes dessa classe de miosinas que também são expressos por linfócitos T. São a myo IXA e a myo IXB. As miosinas tipo IX são monoméricas, porém capazes de se deslocar processivamente sobre o filamento de actina graças a um domínio extra de ligação à actina encontrado na região da cabeça. Um outro diferencial da myo IX é que suas caudas possuem um domínio RhoGAP (BÄHLER et al., 2011; MARAVILLAS-MONTERO; SANTOS-ARGUMEDO, 2011).

RhoGAPs são proteínas capazes de induzir a hidrólise do GTP ligado às RhoGTPases, de modo que elas passam a suas formas inativas, ligadas ao GDP. Assim, as myo IX são capazes de inativar proteínas da família Rho, incluindo RhoA (*Ras Homolog Family Member A*), B, C, Rac1 e Cdc42 (GRAF et al., 2000; MÜLLER et al., 2020). As RhoGTPases são proteínas importantes para o controle da dinâmica do citoesqueleto de actina, influenciando sua polimerização e despolimerização, a contração de miosinas tipo II e a estabilidade de microtúbulos (DUNCAN et al., 2021).

A myo IXA é expressa em células do rim, testículos, da glândula adrenal e é amplamente expressa na região do sistema nervoso central (COLUCCIO, 2020).

A myo IXB é expressa em diversos tecidos como como fígado, baço, pulmão, e em diversas células como as do sistema imunológico, estando presente em macrófagos, linfócitos, células dendríticas, entre outros. Essa miosina está fortemente relacionada com a motilidade das células imunes, como de linfócitos TCD8+ e DCs (MOALLI et al., 2018; XU et al., 2014). A myo IXB também está presente na copa fagocítica de macrófagos (DIAKONOVA; BOKOCH; SWANSON, 2002), e sua ausência afetou a internalização de alguns tipos de partículas por macrófagos derivados de células U937 (HANLEY et al., 2010).

1.4.1.4. Miosinas de Classe XVIII (myo XVIII)

Possuindo apenas dois membros, as myo XVIII A e B, essa classe de miosinas está entre as menos estudadas, e algumas das mais recentemente descobertas na família das miosinas (MARAVILLAS-MONTERO; SANTOS-ARGUMEDO, 2011).

Dentre o grupo da myo XVIII, a miosina mais caracterizada é a myo XVIIIA. Essa miosina se difere das outras por algumas características estruturais como mutações na região gênica que codifica o domínio motor. Os estudos com myo XVIII não conseguiram mostrar uma atividade ATPase para essa miosina, entretanto ela co-localiza com microfilamentos (MARAVILLAS-MONTERO; SANTOS-ARGUMEDO, 2011; OUYANG et al., 2021) A myo XVIIIA forma um complexo com a proteína GOLPH3 (fosfoproteína 3 de Golgi) na região trans-Golgi, região responsável pela excreção de vesículas do complexo de Golgi. O complexo GOLPH3/myo XVIII gera uma força de tração na membrana trans-Golgi, participando do brotamento de vesículas do complexo de Golgi para outras regiões da célula (NG et al., 2013).

Dentre diversas funções da miosina XVIIIA ela está diretamente ligada ao desenvolvimento cardíaco e organização do sarcômero de camundongos. Além disso, ela desempenha vários papéis em estruturas como adesões focais, fibras de estresse de actina, feixes lamelares de actomiosina (HARTMAN et al., 2011; MARAVILLAS-MONTERO; SANTOS-ARGUMEDO, 2011; OUYANG et al., 2021).

Todas essas miosinas vem sendo mais e mais estudadas nos últimos anos, porém suas funções nos linfócitos T, em especial durante a ativação dos mesmos, foram pouco exploradas. De acordo com o local em que essas proteínas estão, e a função das mesmas na célula, elas podem vir a ser indispensáveis para uma ativação celular eficiente.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Gerais

Avaliar o papel das miosinas não-convencionais na ativação das células TCD4+ da linhagem Jurkat E6.1.

2.2. Objetivo Específicos

- Silenciar a expressão de myo IC, IG, VA, IXA, IXB e XVIIIA em células Jurkat usando shRNA.
- Realizar o *knockout* da myo IG nas células Jurkat utilizando a maquinaria crispr/cas9.
- Avaliar a ativação das células Jurkat, silenciadas ou não para as miosinas, usando como parâmetros marcadores de ativação e produção de citocinas.
- Caso haja diferença significativa nos parâmetros analisados, avaliar possíveis mecanismos de ação das miosinas durante a ativação das células silenciadas e *knockout*. Investigaremos as diversas etapas da ativação: estado de ativação de proteínas das vias de sinalização, translocação de fatores de transcrição para o núcleo, expressão de RNAm, expressão intracelular da molécula, possível ação direta na sinapse imunológica, etc.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, ABUL K; LICHTMAN, ANDREW H; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular Shiv Pillai*, MBBS, PHD. **Imunologia celular e molecular**, p. 1 a 1262, 2015.
- ALONSO-CAMINO, V. et al. Lymphocyte display: A novel antibody selection platform based on T cell activation. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, 2009.
- BAEK, S. T. et al. Off-target effect of doublecortin family shRNA on neuronal migration associated with endogenous microRNA dysregulation. **Neuron**, v. 82, n. 6, p. 1255–1262, 18 jun. 2014.
- BÄHLER, M. et al. **Cellular functions of class IX myosins in epithelia and immune cells**. **Biochemical Society Transactions**, 2011. Disponível em: <<http://portlandpress.com/biochemsoctrans/article-pdf/39/5/1166/551393/bst0391166.pdf>>. Acesso em: 8 jul. 2023
- BANKOVICH, A. J.; SHIOW, L. R.; CYSTER, J. G. CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 29, p. 22328–22337, 2010.
- BURKHARDT, J. K.; CARRIZOSA, E.; SHAFFER, M. H. The actin cytoskeleton in T cell activation. **Annual Review of Immunology**, v. 26, p. 233–259, 2008.
- CASSIOLI, C.; BALDARI, C. T. A ciliary view of the immunological synapse. **Cells**, v. 8, n. 8, 2019.
- CHAPMAN, N. M.; BOOTHBY, M. R.; CHI, H. Metabolic coordination of T cell quiescence and activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 1, p. 55–70, 2020.
- CHEN, J. L.; NONG, G. M. **Advances in application of jurkat cell model in research on infectious diseases**. **Chinese Journal of Contemporary Pediatrics** Xiangya Hospital, Central South University, , 3 mar. 2018. Disponível em: <pmc/articles/PMC7389782/>. Acesso em: 10 jun. 2023
- CHENEY, R. E. et al. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. **Cell**, v. 75, n. 1, p. 13–23, 1993.
- CHOUDHURI, K. et al. Polarized release of T-cell-receptor-enriched microvesicles at the immunological synapse. **Nature**, v. 507, n. 7490, p. 118–123, 2014.
- COLUCCIO, L. M. (ED.). **Myosins: A Superfamily of Molecular Motors**. Second Edi ed. Boston, MA, USA: Springer International Publishing, 2020. v. 1239
- DALY, R. J. **Cortactin signalling and dynamic actin networks**. **Biochemical Journal** Portland Press Ltd, , 8 ago. 2004. Disponível em: <pmc/articles/PMC1133910/>. Acesso em: 5 jul. 2023
- DART, A. E. et al. The motor protein myosin 1G functions in FcγR-mediated phagocytosis. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 24, p. 6020–6029, 2012.

DAS, V. et al. Activation-Induced Polarized Recycling Targets T Cell Antigen Receptors to the Immunological Synapse: Involvement of SNARE Complexes. **Immunity**, v. 20, p. 577–588, 2004.

DIAKONOVA, M.; BOKOCH, G.; SWANSON, J. A. Dynamics of cytoskeletal proteins during Fc γ receptor-mediated phagocytosis in macrophages. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 2, p. 402–411, 2002.

DIAZ-VALENCIA, J. D. et al. Class I Myosins, molecular motors involved in cell migration and cancer. <https://doi.org/10.1080/19336918.2021.2020705>, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2022.

DUNCAN, B. W. et al. Semaphorin3F Drives Dendritic Spine Pruning Through Rho-GTPase Signaling. **Molecular Neurobiology**, v. 58, n. 8, p. 3817–3834, 2021.

DUONG, C. P. M. et al. Engineering T Cell Function Using Chimeric Antigen Receptors Identified Using a DNA Library Approach. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013a.

DUONG, C. P. M. et al. Engineering T cell function using chimeric antigen receptors identified using a DNA library approach. **PloS one**, v. 8, n. 5, 7 maio 2013b.

DUSTIN, M. L. **The immunological synapse. Cancer immunology research**, 2014. Disponível em: <www.aacrjournals.org>. Acesso em: 5 jul. 2023

DUTTA, A.; VENKATAGANESH, H.; LOVE, P. E. New insights into epigenetic regulation of T cell differentiation. **Cells**, v. 10, n. 12, p. 1–18, 2021.

EL-BROLOS, M. A.; STAINIER, D. Y. R. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. **PLoS Genetics**, v. 13, n. 7, p. 1–17, 2017.

EL MASRI, R.; DELON, J. **RHO GTPases: from new partners to complex immune syndromes. Nature Reviews Immunology** Nature Publishing Group, , 5 fev. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41577-021-00500-7>>. Acesso em: 5 jul. 2023

FLETCHER, D. A.; MULLINS, R. D. **Cell mechanics and the cytoskeleton. Nature**, 2010.

FOLKS, T. et al. Characterization of a continuous T-cell line susceptible to the cytopathic effects of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-associated retrovirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 13, p. 4539–4543, 1985.

GALLO, E. M.; CANTÉ-BARRETT, K.; CRABTREE, G. R. Lymphocyte calcium signaling from membrane to nucleus. **Nature Immunology** **2006 7:1**, v. 7, n. 1, p. 25–32, 15 dez. 2005.

GÉRARD, A. et al. Detection of rare antigen-presenting cells through T cell-intrinsic meandering motility, mediated by Myo1g. **Cell**, v. 158, n. 3, p. 492–505, 2014a.

GÉRARD, A. et al. Detection of rare antigen-presenting cells through T cell-intrinsic meandering motility, mediated by Myo1g. **Cell**, v. 158, n. 3, p. 492–505, 31 jul. 2014b.

GIESE, S. et al. Mechanochemical properties of human myosin-1C are modulated by isoform-specific differences in the N-terminal extension. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, p. 100128, 2021.

GILLESPIE, P. G. et al. **Myosin-I nomenclature**. **Journal of Cell Biology**, 2001. Disponível em: <<http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.200110032703>>. Acesso em: 8 nov. 2023

GIOIA, L. et al. A genome-wide survey of mutations in the Jurkat cell line. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2018.

GÖDECKE, A.; SCHRADER, J. **Adaptive mechanisms of the cardiovascular system in transgenic mice - Lessons from eNOS and myoglobin knockout mice**. Basic Research in Cardiology. **Anais...Springer**, 2000. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s003950070026>>. Acesso em: 11 jul. 2023

GOLOMB, E. et al. Identification and Characterization of Nonmuscle Myosin II-C, a New Member of the Myosin II Family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 4, p. 2800–2808, 23 jan. 2004.

GRAF, B. et al. Functional role for the class IX myosin myr5 in epithelial cell infection by *Shigella flexneri*. **Cellular Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 601–616, 2000.

HALL, A. **Rho GTPases and the actin cytoskeleton**. **Science**, 1998.

HANLEY, P. J. et al. Motorized RhoGAP myosin IXb (Myo9b) controls cell shape and motility. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 27, p. 12145–12150, 2010.

HARTMAN, M. A. et al. Principles of unconventional myosin function and targeting. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, p. 133–155, 2011.

HELD, P. PROTOCOL Stimulation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Agilent**, 2020.

HIBINO, S. et al. Tenascin suppresses CD3-mediated T cell activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 250, n. 1, p. 119–124, 1998.

HOHMANN, T.; DEHGhani, F. The cytoskeleton—a complex interacting meshwork. **Cells**, v. 8, n. 4, p. 1–55, 2019.

IIZUKA, Y. et al. UNC-45A Is a Nonmuscle Myosin IIA Chaperone Required for NK Cell Cytotoxicity via Control of Lytic Granule Secretion. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 10, p. 4760–4770, 15 nov. 2015.

ILANI, T. et al. T cell antigen receptor signaling and immunological synapse stability require myosin IIA. **Nature Immunology**, v. 10, n. 5, p. 531–539, 2009.

JEONG, D. E.; LEE, Y.; LEE, S. J. V. Western blot analysis of *C. elegans* proteins. **Methods in Molecular Biology**, v. 1742, p. 213–225, 2018.

KANE, L. P.; LIN, J.; WEISS, A. Signal transduction by the TCR for antigen.

Current Opinion in Immunology, v. 12, n. 3, p. 242–249, 2000.

KENWORTHY, R. et al. Short-hairpin RNAs delivered by lentiviral vector transduction trigger RIG-I-mediated IFN activation. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 19, p. 6587–6599, 2009.

KHALAF, H.; JASS, J.; OLSSON, P. E. The role of calcium, NF- κ B and NFAT in the regulation of CXCL8 and IL-6 expression in Jurkat T-cells. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 4, n. 3, p. 150–156, 2013.

KRUMMEL, M. F.; FRIEDMAN, R. S.; JACOBELLI, J. Modes and Mechanisms of T cell Motility: Roles for Confinement and Myosin-IIA. **Current opinion in cell biology**, v. 0, n. 1, p. 9, 2014.

KÜHNE, W. **Untersuchungen über das Protoplasma und die Contractilität.** [s.l: s.n.].

KUMAR, B. V.; CONNORS, T. J.; FARBER, D. L. **Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life.** ImmunityCell Press, , 20 fev. 2018.

KUMARI, S. et al. T cell antigen receptor activation and actin cytoskeleton remodeling. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1838, n. 2, p. 546–556, 2014.

LINKERMANN, A. et al. Identification of interaction partners for individual SH3 domains of Fas ligand associated members of the PCH protein family in T lymphocytes. **BBA - Proteins and Proteomics**, v. 1794, p. 168–176, 2008.

LÓPEZ-ORTEGA, O.; SANTOS-ARGUMEDO, L. Myosin 1g contributes to CD44 adhesion protein and lipid rafts recycling and controls CD44 capping and cell migration in B lymphocytes. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. DEC, p. 302031, 11 dez. 2017a.

LÓPEZ-ORTEGA, O.; SANTOS-ARGUMEDO, L. Myosin 1g contributes to CD44 adhesion protein and lipid rafts recycling and controls CD44 capping and cell migration in B lymphocytes. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. DEC, p. 302031, 11 dez. 2017b.

LV, D. et al. Activation of MYO1G by lncRNA MNX1-AS1 Drives the Progression in Lung Cancer. **Molecular Biotechnology**, v. 65, n. 1, p. 72–83, 2023.

MARAVILLAS-MONTERO, J. L. et al. Myosin 1c Participates in B Cell Cytoskeleton Rearrangements, Is Recruited to the Immunologic Synapse, and Contributes to Antigen Presentation. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 6, p. 3053–3063, 15 set. 2011.

MARAVILLAS-MONTERO, J. L. et al. Myosin 1g regulates cytoskeleton plasticity, cell migration, exocytosis, and endocytosis in B lymphocytes. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 3, p. 877–886, 1 mar. 2014.

MARAVILLAS-MONTERO, J. L.; SANTOS-ARGUMEDO, L. The myosin family: unconventional roles of actin-dependent molecular motors in immune cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 91, n. 1, p. 35–46, 2011.

MARIUZZA, R. A.; AGNIHOTRI, P.; ORBAN, J. **The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma.** *Journal of Biological Chemistry*, 2020.

MASTROGIOVANNI, M. et al. Coordinating Cytoskeleton and Molecular Traffic in T Cell Migration, Activation, and Effector Functions. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 8, n. October, p. 1–30, 2020.

MATOZO, T.; KOGACHI, L.; DE ALENCAR, B. C. **Myosin motors on the pathway of viral infections.** *Cytoskeleton* John Wiley & Sons, Ltd, , 1 jun. 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cm.21718>>. Acesso em: 18 maio. 2023

MENG, Z. et al. Inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by endoribonuclease-prepared siRNA. *Journal of Virological Methods*, v. 150, n. 1–2, p. 27–33, 2008.

MHATRE, A. N. et al. Generation and characterization of mice with Myh9 deficiency. *NeuroMolecular Medicine*, v. 9, n. 3, p. 205–215, 2007.

MOALLI, F. et al. The Rho regulator Myosin IXb enables nonlymphoid tissue seeding of protective CD8+ T cells. *Journal of Experimental Medicine*, v. 215, n. 7, p. 1869–1890, 2 jul. 2018.

MONTANO, M. **Translational biology in medicine.** [s.l.: s.n.].

MORGAN, D. A.; RUSCETTI, F. W.; GALLO, R. Selective in Vitro Growth of T Lymphocytes from Normal Human Bone Marrows. *Science*, v. 193, n. 4257, p. 1007–1008, 10 set. 1976.

MOTAMEDI, M.; XU, L.; ELAHI, S. Correlation of transferrin receptor (CD71) with Ki67 expression on stimulated human and mouse T cells: The kinetics of expression of T cell activation markers. *Journal of Immunological Methods*, v. 437, p. 43–52, 2016.

MUCCI, I. et al. The methodological approach for the generation of humandendritic cells from monocytes affects the maturation state of the resultant dendritic cells. *Biologicals*, v. 37, n. 5, p. 288–296, 2009.

MÜLLER, P. M. et al. Systems analysis of RhoGEF and RhoGAP regulatory proteins reveals spatially organized RAC1 signalling from integrin adhesions. *Nature Cell Biology*, v. 22, n. 4, p. 498–511, 2020.

NAYDENOV, N. G. et al. Myosin Motors: Novel Regulators and Therapeutic Targets in Colorectal Cancer. *Cancers* 2021, Vol. 13, Page 741, v. 13, n. 4, p. 741, 11 fev. 2021.

NG, M. M. et al. GOLPH3L antagonizes GOLPH3 to determine Golgi morphology. *Molecular Biology of the Cell*, v. 24, n. 6, p. 796–808, 2013.

NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer research*, v. 20, p. 462–466, maio 1960.

OLATUNDE, A. C.; HALE, J. S.; LAMB, T. J. **Cytokine-skewed Tfh cells: functional consequences for B cell help.** *Trends in Immunology* Trends Immunol, , 1 jun. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33972167/>>. Acesso em: 7 nov. 2023

OLEJNICZAK, M. et al. Recent Advances in Understanding of the Immunological Off-Target Effects of siRNA. **Current Gene Therapy**, v. 11, n. 6, p. 532–543, 2011.

OLETY, B. et al. Myosin 1G (Myo1G) is a haematopoietic specific myosin that localises to the plasma membrane and regulates cell elasticity. **FEBS Letters**, v. 584, n. 3, p. 493–499, 2010.

OUYANG, Z. et al. **Multifaceted Function of Myosin-18, an Unconventional Class of the Myosin Superfamily.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology* Frontiers Media S.A., , 9 fev. 2021.

PATINO-LOPEZ, G. et al. Myosin 1G is an abundant class I myosin in lymphocytes whose localization at the plasma membrane depends on its ancient divergent pleckstrin homology (PH) domain (Myo1PH). **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 12, p. 8675–8686, 2010a.

PATINO-LOPEZ, G. et al. Myosin 1G Is an Abundant Class I Myosin in Lymphocytes Whose Localization at the Plasma Membrane Depends on Its Ancient Divergent Pleckstrin Homology (PH) Domain (Myo1PH) * □ S. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 8675–8686, 2010b.

PEGORARO, A. F.; JANMEY, P.; WEITZ, D. A. Mechanical properties of the cytoskeleton and cells. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 9, n. 11, 1 nov. 2017.

PERETZ, L. et al. Combined shRNA over CRISPR/cas9 as a methodology to detect off-target effects and a potential compensatory mechanism. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

POLLIZZI, K. N.; POWELL, J. D. **Integrating canonical and metabolic signalling programmes in the regulation of T cell responses.** *Nature Reviews Immunology*, 2014. Disponível em: <www.nature.com/reviews/immunol>. Acesso em: 5 jul. 2023

ROSSI, A. et al. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. **Nature**, v. 524, n. 7564, p. 230–233, 2015.

ROTTNER, K. et al. Actin assembly mechanisms at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 130, n. 20, p. 3427–3435, 2017.

ROY, N. H.; BURKHARDT, J. K. The actin cytoskeleton: A mechanical intermediate for signal integration at the immunological synapse. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 6, n. SEP, p. 1–7, 2018.

RUTERBUSCH, M. et al. **In Vivo CD4+ T Cell Differentiation and Function: Revisiting the Th1/Th2 Paradigm.** *Annual Review of Immunology*, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-103019->>. Acesso em: 4 jul.

2023

SANJANA, N. E.; SHALEM, O.; ZHANG, F. **Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening.** *Nature Methods* Nature Publishing Group, , 30 jul. 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nmeth.3047>>. Acesso em: 11 jun. 2023

SCHNEIDER, U.; SCHWENK, H. -U; BORNKAMM, G. Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. **International Journal of Cancer**, v. 19, n. 5, p. 621–626, 1977.

SELLERS, J. R. et al. Calcium and cargoes as regulators of myosin 5a activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 369, n. 1, p. 176–181, 2008.

SHARON, N.; LIS, H. **History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules.** *Glycobiology*, 2004.

SHUTOVA, M. S.; SVITKINA, T. M. Mammalian nonmuscle myosin II comes in three flavors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 506, n. 2, p. 394–402, 11 nov. 2018.

SIMMS, P. E.; ELLIS, T. M. Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, n. 3, p. 301–304, 1996.

SMITH-GARVIN, J. E.; KORETZKY, G. A.; JORDAN, M. S. **T cell activation.** *Annual Review of Immunology*, 2009. Disponível em: <www.annualreviews.org>. Acesso em: 5 jul. 2023

SUN, Z.; GUO, S. S.; FÄSSLER, R. **Integrin-mediated mechanotransduction.** *Journal of Cell Biology* The Rockefeller University Press, , 21 nov. 2016.

SZETO, C. et al. TCR recognition of peptide–MHC-I: Rule makers and breakers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 1–26, 2021.

TANG, D. D.; GERLACH, B. D. **The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration.** *Respiratory Research* BioMed Central, , 8 abr. 2017. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC5385055/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31385055/)>. Acesso em: 5 jul. 2023

TITTARELLI, A. et al. **Connexin-mediated signaling at the immunological synapse.** *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/ijms>. Acesso em: 5 jul. 2023

TSOPOULIDIS, N. et al. T cell receptor–triggered nuclear actin network formation drives CD4+ T cell effector functions. **Science Immunology**, v. 4, n. 31, p. 1987, 4 jan. 2019.

TYAGARAJAN, K. **Kinetics of lymphocyte activation in cytokine**

expression studies (P6317) Kimvan Tran, Julie Clor, Kamala Tyagarajan The Journal of Immunology May 1, 2013, 190 (1 Supplement) 184.20; [s.l: s.n.].

VAN GELE, M.; DYNOODT, P.; LAMBERT, J. Griscelli syndrome: A model system to study vesicular trafficking. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 22, n. 3, p. 268–282, 2009.

WOOD, K. J.; BUSHELL, A.; HESTER, J. Mechanisms of Immune Regulation. In: **Textbook of Organ Transplantation**. [s.l: s.n.]. p. 79–86.

XU, Y. et al. Dendritic Cell Motility and T Cell Activation Requires Regulation of Rho-Cofilin Signaling by the Rho-GTPase Activating Protein Myosin IXb. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 8, p. 3559–3568, 2014.

YI, J. et al. Actin retrograde flow and actomyosin II arc contraction drive receptor cluster dynamics at the immunological synapse in Jurkat T cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 23, n. 5, p. 834–852, 2012.

ZHANG, N.; YAO, L. L.; LI, X. DONG. Regulation of class V myosin. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 2, p. 261–273, 2018.

ZHU, J. T helper cell differentiation, heterogeneity, and plasticity. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 10, 2018.

ZIMMERMAN, M. et al. IFN- γ upregulates survivin and Ifi202 expression to induce survival and proliferation of tumor-specific T cells. **PloS one**, v. 5, n. 11, 2010.