



Instituto Nacional de Câncer
Programa de Pós-Graduação em Oncologia

**Regulação da expressão gênica pelo NFAT1: o proto-oncogene
c-Myc e o papel da proteína IRF-2BP2**

GIULIANA PATRÍCIA MOGNOL

Rio de Janeiro,

2012

GIULIANA PATRÍCIA MOGNOL

Regulação da expressão gênica pelo NFAT1: o proto-oncogene *c-Myc* e o papel da proteína IRF-2BP2

Tese de doutorado submetida à secretaria do Programa de Pós-graduação em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer (INCA), como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Oncologia.

ORIENTADOR: Dr. João Paulo de Biaso Viola

Rio de Janeiro,
2012.

M696r Mognol, Giuliana Patrícia.

Regulação da expressão gênica pelo NFAT1: o proto-oncogene c-myc e o papel da proteína IRF-2BP2./ Giuliana Patrícia Mognol. __ Rio de Janeiro, 2012.

129f.:il.tab.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2012.

Orientador: João Paulo de Biaso Viola.

1. Regulação da Expressão Gênica. 2. Fatores da Transcrição. I. Viola, João Paulo de Biaso (Orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.9940277

Este trabalho foi realizado no Programa de Biologia Celular do Instituto Nacional de Câncer (INCA), sob orientação do Dr. João Paulo de Biaso Viola e com auxílio financeiro da Fundação Ary Frauzino (FAF/INCA), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do *Fogarty International Research Collaboration Award* (FIRCA/NIH), da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e do *International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology* (ICGEB).

"It is our choices, Harry, that show what we truly are, far more than our abilities."

Dumbledore - Harry Potter and the Chamber of Secrets.

*“São as nossas escolhas, Harry, que mostram o que realmente somos, muito mais do
que nossas habilidades.”*

Prof. Dumbledore – Harry Potter e a Câmara Secreta.

Dedico este trabalho aos meus avôs, Segundo Mognol e Ignácio Moerschbacher, que saíram de cena vítimas de câncer. Direta ou indiretamente, vocês contribuíram para que eu escolhesse estar aqui. Vocês estão em mim e estarão nos filhos dos meus filhos.

Saudades eternas...

AGRADECIMENTOS

Novamente por ordem dos acontecimentos...

Aos meus pais, Nilse e Leoniro Mognol por todo amor, educação e incentivo pra que eu fosse em busca dos meus sonhos, agora falta pouco! Obrigada especialmente à minha mãe, por ser tão próxima e participar de tudo! Quero ser uma mãe como você!

À minha maninha querida, Jacqueline Raquel Mognol, por ser parte de mim em todas as fases da minha vida. Por termos compartilhado tanto desde muito pequenas, por sermos amigas, por poder contar contigo pra absolutamente tudo e sempre! Estarei sempre aqui também!!!

À minha grande família, sempre presente!

Ao Fernando Porrua, por esses dez anos de relacionamento. Aprendemos e crescemos muito nesse tempo juntos. Você esteve ao meu lado quando todas as minhas certezas se tornaram dúvidas! E agora que elas voltam a ser certezas... Obrigada também pela ajuda com a formatação da tese, quando me descabelava, pela paciência, incentivo e pela ajuda com o inglês durante o artigo.

Aos meus amigos de tempos, que quando aparecem parece que o tempo não passou: Luana N.C. Cruz, Emerielle C. Vanzela, Alessandro Gonçalves e Anna Paula Bonato.

Ao meu orientador João Viola, pela oportunidade de estar sendo formada em seu laboratório, por pegar no nosso pé em relação aos conceitos, pela liberdade de poder dizer tudo o que eu penso e saber que você vai respeitar e por estar com a porta da sala sempre aberta.

Ao pessoal que contribuiu diretamente com experimentos durante a tese: Patrícia S.A. Souza, Bruno K. Robbs, Leonardo K. Teixeira, Renata Ramalho e Amanda Medeiros.

A todo pessoal do lab: André, Pedrinho, Bia, Steffi, Paty, Rê, Flavinha, Cris, Vanessa, Douglas, Miriam, Erika, Marina, Luciano, Miriam, Bruno, Matheus e Amanda, pela ajuda no dia a dia, pelas discussões científicas (ou não), pelas saídas pra desestressar ou comemorar, pelos conselhos, sugestões... Pelas reuniões no lab pra falar da vida, dos planos, das dificuldades e, claro, pra desabafar e não esganar um de vez em quando...

À Flávia Carneiro, que dividiu parte do seu projeto com a IRF-2BP2 num momento que o meu projeto com o *c-Myc* não andava e que eu estava muito preocupada! Fico muito feliz por ter contribuído com um trabalho que agora abriu tantas linhas no laboratório. Você também se tornou uma amiga muito querida.

Ao André, a pessoa mais desastrada e confusa do lab, mas que tem um coração enorme e que é sempre muito solícito e companheiro. Você é um grande amigo!

Ao Douglas, que resolve meus problemas com a tecnologia... programas, versões, figuras.... Brigadão!

À Paty e à Bia, que são as pessoas pra quem eu corro quando tenho algum problema ou pra dividir um momento importante. Amigas pra todas as horas!

Aos meus filhotes, Carocinho e Fofa, que só têm o lado bom do ser humano, que sempre me recebem felizes e carinhosos e que saciam meu instinto Felícia!

Aos alunos e pesquisadores dos outros grupos do INCA, pela ajuda com equipamentos, reagentes e sugestões.

Ao pessoal que mantêm tudo funcionando: Alexsandra, Amanda, pessoal do sequenciamento da FioCruz e da UFRJ e pessoal do biotério.

À FAPERJ, pela provisão da bolsa de doutorado e às agências de fomento.

RESUMO

Durante a transcrição gênica em eucariotos, a produção de níveis significativos de mRNA é conferida pela presença de diversos sítios de ligação para fatores de transcrição específicos, localizados dentro e fora do promotor basal. Dentre os fatores de transcrição que se ligam a estes sítios estão as proteínas da família NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), composta pelos NFAT1-5, sendo o NFAT1 o alvo desse estudo. O NFAT pode regular seus genes alvo direta ou indiretamente e, neste processo, a ativação ou a repressão da transcrição pode ser alterada pela interação com diferentes parceiros proteicos. Esses dois pontos da regulação transcricional mediados pelo NFAT foram avaliados em duas etapas distintas. Na primeira, avaliamos se a regulação do proto-oncogene *c-Myc* pelo NFAT1 ocorria de forma direta. Tanto NFAT quanto *c-Myc* estão envolvidos na regulação de genes de ciclo celular, apoptose e angiogênese. Já tinha sido mostrado que as vias de sinalização que ativam NFAT induzem a expressão de *c-Myc* e que o NFAT1 se liga a um elemento localizado no promotor mínimo de *c-Myc*, apesar da importância desse elemento não ter sido avaliada no contexto do promotor completo de *c-Myc*. Nós mostramos que a regulação desse promotor pelo NFAT1 é mais complexa do que se acreditava. Além desse sítio proximal, o NFAT1 se liga a sítios distais com diferentes afinidades. Nossos resultados sugerem que alguns elementos NFAT são negativos e dominantes, enquanto outros são positivos e recessivos. Além disso, demonstramos que a cooperação com p300 aumenta a transativação do promotor de *c-Myc* mediada pelo NFAT1. Por último, mostramos que os novos sítios identificados também são responsivos ao NFAT2, outro membro da família, que pode tanto ter funções opostas quanto redundantes com o NFAT1. Assim, sugerimos que a contribuição do NFAT para a regulação da expressão de *c-Myc* é direta e depende do balanço entre a ligação do NFAT aos sítios positivos e negativos e da cooperação com cofatores transcricionais. Na segunda parte do trabalho, focamos nas implicações da interação recém-identificada entre NFAT1 e a proteína IRF-2BP2. A IRF-2BP2 foi pescada num ensaio de duplo híbrido com a região TAD-C do NFAT1, região esta que é menos conservada entre as proteínas NFAT. Mostramos que a IRF-2BP2 reprime a expressão de genes de citocina induzida pelo NFAT1 e que ela age somente sobre a função do NFAT1 dentro da família NFAT. Nossos dados também sugerem que a IRF-2BP2 não se ligue ao DNA e, portanto, funcione como um corepressor transcricional. Ainda mostramos que a superexpressão de IRF-2BP2 leva ao atraso da progressão das fases G₀/G₁ para a fase S do ciclo celular e à alteração da expressão de genes de ciclo celular, como de *c-Myc*, que também é regulado por NFAT1. Esses dados sugerem que a IRF-2BP2 possa ter um papel bem mais amplo na regulação do NFAT1, não se restringindo apenas à modulação de genes de citocinas. Se isso se confirmar, a interação entre NFAT1 e IRF-2BP2 poderá contribuir para explicar as diferenças fenotípicas exercidas pelos diferentes membros da família NFAT.

Palavras chave: Regulação transcricional, NFAT1, *c-Myc*, IRF-2BP2, fatores de transcrição.

ABSTRACT

During gene transcription in eukaryotes, the production of significant mRNA levels is conferred by the presence of several binding sites for specific transcription factors, located inside and outside of the basal promoter. Among the transcription factors that bind to these sites are proteins of the NFAT family (*nuclear factor of activated T cells*), comprising the NFAT1-5, being the NFAT1 the target of this study. The NFAT can regulate their target genes directly or indirectly and in this process, the activation or repression of transcription can be altered by interaction with different partner proteins. These two points of NFAT-mediated transcriptional regulation were assessed here in two stages. In the first one, we evaluated whether the regulation of the proto-oncogene *c-Myc* by NFAT1 occurred directly. Both *c-Myc* as NFAT regulate genes involved in cell cycle, apoptosis and angiogenesis. It has already been shown that the signaling pathways that activate NFAT induce the *c-Myc* expression and that NFAT1 binds to an element located at the minimal *c-Myc* promoter, although the importance of this element has not been assessed in the full *c-Myc* promoter context. We demonstrated that the regulation of this promoter by NFAT1 is more complex than previously conceived. In addition to this proximal site, NFAT1 binds to distal sites with different affinities. Our results suggest that some NFAT elements are negative and dominant, while others are positive and recessive. Furthermore, we demonstrated that cooperation with p300 enhances NFAT1-mediated transactivation of the *c-Myc* promoter. Finally, we show that the newly identified sites are also responsive to NFAT2, another member of NFAT family, which can both have opposite as well as redundant functions with NFAT1. We suggest that NFAT1 the contribution of NFAT to the regulation of *c-Myc* expression is direct and may depend on a balance between the binding to positive and negative NFAT-responsive elements, and cooperation with transcriptional cofactors. In the second part of this work, we focused on the implications of the recently identified interaction between NFAT1 and the protein IRF-2BP2. The IRF-2BP2 was identified in a two-hybrid assay with the TAD-C region of the NFAT1, a region which is less conserved among the NFAT proteins. We showed that IRF-2BP2 represses the expression of cytokine genes induced by NFAT1 and regulates specifically the function of NFAT1 among the NFAT family members. Our data also suggest that the IRF-2BP2 does not bind to DNA and therefore functions as a transcriptional corepressor. Therefore, the overexpression of IRF-2BP2 leads to a delayed transition from G₀/G₁ to S phase of cell cycle and also alters the expression of many cell cycle genes, such as *c-Myc*, which is also regulated by NFAT1. These data suggest that the IRF-2BP2 may have a much greater role regulating NFAT1, not being restricted to the modulation of cytokine genes. If this is confirmed, the interaction between NFAT1 and IRF-2BP2 may help to explain the phenotypic differences exerted by different NFAT family members.

Key words: Transcriptional regulation, NFAT1, *c-Myc*, IRF-2BP2, transcription factors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Formação do complexo de iniciação da transcrição.....	5
Figura 2 - Representação esquemática das proteínas da família NFAT.....	6
Figura 3 - Ativação das proteínas NFAT	8
Figura 4 - Estrutura do <i>lôcus</i> de <i>c-Myc</i> humano	14
Figura 5 - A expressão de <i>c-Myc</i> é dependente da via de Ca^{2+} /calcineurina/NFAT1	43
Figura 6 - Supostos sítios de ligação para NFAT no promotor de <i>c-Myc</i>	49
Figura 7 - Purificação e ligação do DBD da proteína NFAT1 ao sítio distal do promotor de IL-2 humano	50
Figura 8 - O domínio de ligação ao DNA (DBD) do NFAT1 se liga especificamente ao promotor de <i>c-Myc</i>	51
Figura 9 - <i>In vivo</i> , o NFAT1 se liga diretamente ao promotor de <i>c-Myc</i>	52
Figura 10 – A transativação do promotor de <i>c-Myc</i> humano na linhagem celular HEK293T é regulada por NFAT1	57
Figura 11 – Identificação de outro elemento funcional de NFAT1 no promotor de <i>c-Myc</i>	58
Figura 12 - O NFATRE 6 é um sítio positivo para a transativação mediada pelo NFAT1 no FragA-Luc	59
Figura 13 - p300 aumenta a transativação mediada pelo NFAT1 no promotor de <i>c-Myc</i>	60
Figura 14 – A regulação do promotor de <i>c-Myc</i> pelo NFAT2 ocorre preponderantemente por elementos positivos	63
Figura 15 – A proteína IRF-2BP2 reprime a transativação mediada pelo NFAT1	66
Figura 16 - A superexpressão da proteína IRF-2BP2 reprime a expressão de citocinas em linfócitos primários.....	67
Figura 17 - A IRF-2BP2 não é capaz de reprimir a transativação mediada pelas proteínas NFAT1ΔC e NFAT2.....	69
Figura 18 – A proteína IRF-2BP2 não parece se ligar diretamente ao DNA.....	72
Figura 19 - Percentual de transdução após confluência e privação de soro de células NIH3T3.....	76
Figura 20 – A superexpressão de IRF-2BP2 atrasa a progressão do ciclo celular de células NIH3T3.	77

Figura 21 – A supereexpressão de IRF-2BP2 leva à formação de menos clones, mas isso aparentemente não está relacionado com indução de morte celular	78
Figura 22 – Em células não sincronizadas, a supereexpressão de IRF-2BP2 também leva à formação de menos clones, sem indícios de indução de morte celular.....	79
Figura 23 – A superexpressão de IRF-2BP2 leva à diminuição dos níveis de mRNA de <i>c-Myc</i> e ciclina D1 e ao aumento de ciclina D2	80

LISTA DE ABREVIATURAS

AICD	Morte Celular Induzida por Ativação (<i>Activation Induced Cell Death</i>)
APC	Células Apresentadoras de Antígeno (<i>Antigen Presenting Cells</i>)
AP-1	Proteína Ativadora-1 (<i>Activation Protein-1</i>)
BR	Região Básica (<i>Basic Region</i>)
Ca ²⁺	Íon divalente de cálcio
CDK	Quinase Dependente de Ciclina (<i>Cyclin Dependent Kinases</i>)
CK-1	Caseína quinase 1 (<i>Casein Kinase 1</i>)
CKI	Inibidor de CDK (<i>CDK Inhibitor</i>)
COX-2	Ciclooxigenase-2
CRAC	Receptor de Canais Ativados por Ca ²⁺ (<i>Ca²⁺ Receptor Activated Channels</i>)
CsA	Ciclosporina A
DAG	Diacilglicerol
DBD	Domínio de Ligação ao DNA (<i>DNA Binding Domain</i>)
DNA	Ácido Desoxiribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
EAP1	(<i>Enhanced and Puberty I</i>)
E2F	Fator de Ligação ao Promotor de E2 (<i>E2 Promoter Binding Factor</i>)
EPM	Erro padrão da média
FASTKD2	Domínio Quinase-2 de Serina e Treonina Ativado por Fas (<i>Fas-Activated Serine-Threonine Kinase Domain 2</i>)
FBP	Proteína de Ligação ao Elemento Longínquo 5' (<i>Far upstream element-Binding Protein</i>)
FUSE	Elemento Longínquo a 5' (<i>Far Upstream Element</i>)
g	Grama
G1/2	Fase intermediária 1 e 2 (<i>Gap1/2</i>)
GSK-3	Quinase-3 de Glicogênio Sintase (<i>Glycogen Synthase Kinase-3</i>)
HLH-LZ	Motivo de hélice-dupla-hélice leucina-zíper (<i>Helix Loop Helix-Leucine Zipper</i>)
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (<i>Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase</i>)
ICAM-1	Molécula 1 de Adesão Intercelular (<i>Intercellular Cell Adhesion Molecule-</i>

	1)
IL	Interleucina
Inr	Elemento iniciador da transcrição
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato
IRF-2BP2	Proteína ligadora-2 do fator regulatório-2 de interferon (<i>Interferon Regulatory Factor-2 Binding Protein-2</i>)
ITAMs	Motivo de Ativação Baseado no Imunoreceptor de Tirosina (<i>Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif</i>)
JNK	Quinase de Região N-Terminal de c-Jun (<i>JUN N-Terminal Kinase</i>)
L	Litro
LFA-1	Antígeno 1 Associado com a Função de Linfócito (<i>Lymphocyte Function-Associated Antigen-1</i>)
M	Fase de Mitose (<i>Mitosis</i>)
mg	Miligrama
MAX	Fator X Associado a MYC (<i>MYC-Associated factor X</i>)
MEF-2D	Fator 2D do Enhancer de Miócito (<i>Myocyte Enhancer Factor-2D</i>)
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NRIF3	Fator 3 de Interação Nuclear (<i>Nuclear Interacting Fator 3</i>)
IFN	Interferon
ITAMs	Motivo de Ativação baseado no Imunoreceptor de Tirosina (<i>Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif</i>)
NES	Sinal de Exportação Nuclear (<i>Nuclear Export Signal</i>)
NFAT	Fator Nuclear de células T Ativadas (<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>)
NHR	Região de Homologia a NFAT (<i>NFAT-Homology Region</i>)
nM	Nanomolar
NK	Matadora Natural (<i>Natural Killer</i>)
NLS	Sinal de Localização Nuclear (<i>Nuclear Localization Signal</i>)
Pb	Pares de bases
PBS	Salina Fosfatada Tamponada (<i>Phosphate Buffer Sulfate</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEDF	Fator Derivado do Pigmento Epitelial (<i>Pigment Epithelial-Derived Factor</i>)

PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato de membrana (<i>Phosphatidylinositol Biphosphate</i>)
PKC	Proteína quinase C (<i>Protein Kinase C</i>)
PLC γ	Fosfolipase C γ (<i>Phospholipase Cγ</i>)
PMA	Forbol Miristato Acetato (<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>)
Rb	Retinoblastoma
REFs	Fibroblastos Embrionários de Rato (<i>Rat Embryonic Fibroblasts</i>)
RING domain	Novo gene realmente interessante (<i>Really Interesting New Gene</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
S	Fase de Síntese (<i>Synthesis</i>)
SP	Motivo de Serina e Prolina Repetidos (<i>Serine Proline-Repeat Motif</i>)
SRR	Região Rica em Serina (<i>Serine-Rich Region</i>)
TAD	Domínio de Transativação (<i>Transactivation Domain</i>)
TBP	Proteína de Ligação ao TATA box (<i>TATA Binding Protein</i>)
TCR	Receptor de Células T (<i>T Cell Receptor</i>)
TEAD	Domínio TEA (<i>TEA domain</i>)
TF	Fator de Transcrição, (<i>Transcription Factor</i>)
Th	Célula T auxiliary (T helper)
TNF	Fator de Necrose Tumoral (<i>Tumor Necrose Factor</i>)
U	Unidade
V	Volts
VEGF	Fator de Crescimento Celular Vascular Endotelial (<i>Vascular Endothelial Cell Growth Factor</i>)
VGLL4	<i>Vestigial-Like 4</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	OS LINFÓCITOS T E SUA ATIVAÇÃO.....	1
1.2	REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO EM EUCARIOTOS	2
1.2.1	<i>Regulação Geral da Transcrição.....</i>	2
1.2.2	<i>Os fatores de transcrição</i>	3
1.2.2.1	A família de fatores de transcrição NFAT	5
1.2.2.2	O fator de transcrição <i>c-Myc</i>	13
1.2.2.3	NFAT e <i>c-Myc</i>	19
1.2.3	<i>Coativadores e correpressores transcripcionais</i>	20
1.2.3.1	A proteína IRF-2BP2	22
1.2.3.2	NFAT1 e IRF-2BP2.....	24
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	ANIMAIS.....	26
3.2	PLASMÍDEOS	26
3.2.1	<i>Construção de plasmídeos</i>	27
3.3	CULTURA DE CÉLULAS.....	27
3.4	PURIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4.....	28
3.5	DIFERENCIAÇÃO Th1	28
3.6	EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA	28
3.7	PCR EM TEMPO REAL	29
3.8	EXTRAÇÃO NUCLEAR DE CÉLULAS HEK293T	30
3.9	WESTERN BLOT.....	30
3.10	ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA.....	31
3.11	PURIFICAÇÃO DO DBD DA PROTEÍNA NFAT1	32
3.12	ENSAIO DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA (EMSA).....	32
3.13	ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA (CHIP)	35

3.14	ENSAIOS DE TRANSATIVAÇÃO.....	37
3.15	TRANSDUÇÃO RETROVIRAL	38
3.15.1	<i>Produção de retrovírus recombinantes.....</i>	38
3.15.2	<i>Infeção das células alvo</i>	38
3.15.2.1	Linfócitos T CD4 primários.....	38
3.15.2.2	Células NIH3T3.....	39
3.16	MARCAÇÃO DE CITOCINA INTRACELULAR.....	39
3.17	ANÁLISE DE CICLO E MORTE CELULAR POR MARCAÇÃO COM IODETO DE PROPÍDIO	40
3.18	ENSAIO CLONOGÊNICO	40
4	RESULTADOS	41
4.1	A Regulação do proto-oncogene <i>c-Myc</i> pelo fator de transcrição NFAT1.....	41
4.1.1	<i>A expressão de c-Myc em resposta à estimulação por anti-CD3 é dependente da via de Ca²⁺/calcineurina/NFAT1.....</i>	41
4.1.2	<i>O fator de transcrição NFAT1 se liga ao promotor de c-Myc.....</i>	44
4.1.2.1	O promotor do gene <i>c-Myc</i> contém supostos sítios de ligação para NFAT, que são conservados em humanos e camundongos	44
4.1.2.2	O DBD da proteína NFAT1 recombinante se liga in vitro ao promotor de <i>c-Myc</i>	45
4.1.2.3	O NFAT1 se liga in vivo ao promotor de <i>c-Myc</i>	46
4.1.3	<i>Regulação da transativação do promotor de c-Myc pelo NFAT1</i>	53
4.1.3.1	Os sítios distais de ligação para o NFAT são reguladores negativos, enquanto o sítio proximal é um elemento positivo para a regulação mediada pelo NFAT1.....	53
4.1.3.2	A mutação dos elementos responsivos ao NFAT sugere que outro sítio importante para a transativação mediada pelo NFAT1 exista no promotor <i>c-Myc</i>	54
4.1.3.3	p300 aumenta a transativação do promotor de <i>c-Myc</i> mediada pelo NFAT1	55
4.2	Regulação da transativação do promotor de <i>c-Myc</i> pelo NFAT2	61
4.3	Regulação da função do NFAT1 pela proteína IRF-2BP2.....	64
4.3.1	<i>A proteína IRF-2BP2 reprime genes de citocina regulados pelo NFAT1</i>	64
4.3.1.1	A proteína IRF-2BP2 reprime a transativação de genes mediados pelo NFAT1.....	64
4.3.1.2	A proteína IRF-2BP2 diminui a expressão dos genes de citocina IL-2 e IL-465	

4.3.2	<i>A função de repressão da IRF-2BP2 é restrita à proteína NFAT1 dentro da família NFAT</i>	68
4.3.3	<i>A função repressora da IRF-2BP2 não parece ocorrer via ligação direta ao DNA</i>	70
4.4	<i>A IRF-2BP2 altera o ciclo celular das células NIH3T3</i>	73
4.4.1	<i>A IRF-2BP2 atrasa a progressão do ciclo celular das células NIH3T3</i>	73
4.4.2	<i>As células superexpressando IRF-2BP2 apresentam níveis reduzidos de mRNA de c-Myc e de ciclina D1 e níveis aumentados de cilina D2</i>	74
5	DISCUSSÃO	81
5.1	Regulação do proto-oncogene <i>c-Myc</i> pelo NFAT1.....	81
5.2	Regulação da função do NFAT1 pela proteína IRF-2BP2.....	87
6	PERSPECTIVAS	92
7	CONCLUSÕES	93
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
9	APÊNDICES	110
9.1	Artigos originais	110
9.1.1	Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors. Robbs BK, Cruz AL, Werneck MB, Mognol GP, Viola JP. Mol Cell Biol. 2008; 28(23):7168-81.	110
9.1.2	Melatonin protects CD4 ⁺ T cells from activation-induced cell death by blocking NFAT-mediated CD95 ligand upregulation. Pedrosa AM, Weinlich R, Mognol GP, Robbs BK, Viola JP, Campa A, Amarante-Mendes GP. J Immunol. 2010; 184(7):3487-94.....	110
9.1.3	Interferon regulatory factor 2 binding protein 2 is a new NFAT1 partner and represses its transcriptional activity. Carneiro FR, Ramalho-Oliveira R, Mognol GP, Viola JP. Mol Cell Biol. 2011; 31(14):2889-901.	110
9.1.4	Transcriptional regulation of the <i>c-Myc</i> promoter by NFAT1 involves negative and positive NFAT-responsive elements. Mognol GP, de Araujo-Souza PS, Robbs BK, Teixeira LK, Viola JP. Cell Cycle. 2012; 11(5):):1014-1028.....	110

9.2	Capítulo de livro.....	110
9.2.1	<i>Fatores de Transcrição e Regulação da Expressão Gênica. Mognol, GP; Viola, JP. In: Tratado de Oncologia, Capítulo 19. Editado por P.M.G. Hoff. São Paulo, Editora Atheneu, no prelo.....</i>	<i>110</i>

1 INTRODUÇÃO

1.1 OS LINFÓCITOS T E SUA ATIVAÇÃO

No indivíduo adulto, os precursores de linfócitos T são originados na medula óssea, enquanto sua diferenciação ocorre no timo, onde passam por rearranjos gênicos que levam à expressão do TCR (*T cell receptor*) (Szabo *et al.*, 1993; Nel, 2002). Ainda no timo, os linfócitos T se diferenciam em dois tipos celulares, caracterizados pela expressão dos correceptores CD4 e CD8. Os linfócitos T CD4 são denominados T auxiliares e os linfócitos T CD8 são denominados T citotóxicos (Von Boehmer *et al.*, 2003). Ao saírem do timo, os linfócitos migram para os órgãos linfóides secundários, como baço e linfonodos, onde serão ativados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs, *antigen presenting cells*) (Janeway & Bottomly, 1994).

Os linfócitos T saem do timo *naïves* e permanecem quiescentes até que ocorra sua ativação, que desencadeia a entrada em ciclo celular (Janeway & Bottomly, 1994). No momento da ativação, o antígeno apresentado pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade da célula APC é reconhecido pelos linfócitos T, através do seu TCR e dos correceptores CD4 ou CD8. Além da ligação do TCR, conhecida como primeiro sinal de ativação, um segundo sinal é necessário para desencadear a proliferação dos linfócitos T específicos ao antígeno. O segundo sinal é gerado através da interação de moléculas coestimulatórias, expressas nos linfócitos T (CD28), com seus ligantes B7.1 (CD80) ou B7.2 (CD86), expressos nas APCs. Ainda participam outras moléculas de superfície, que contribuem para a adesão entre os linfócitos e as APCs, como a ligação entre LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*) dos linfócitos com ICAM-1 (*intercellular cell adhesion molecule-1*), expressos nas APCs (Crabtree & Clipstone, 1994; Dustin & Chan, 2000).

O reconhecimento do antígeno induz o agrupamento de moléculas de TCR na superfície dos linfócitos T, na região de contato com as APCs (Cantrell, 1996). Como consequência, ocorre a aproximação das proteínas quinases que estão associadas aos domínios citoplasmáticos dos correceptores CD4 e CD8. Estas quinases fosforilam os resíduos de tirosina, encontrados nos motivos ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) das porções citoplasmáticas da molécula CD3, ativando o complexo TCR. Segue-se uma cascata de fosforilações que culmina na ativação de fosfolipase C (PLC γ). A ativação de PLC γ

leva à hidrólise de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) de membrana em inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ é responsável pela liberação de cálcio (Ca²⁺) a partir de reservatórios intracelulares e o DAG medeia a ativação da proteína quinase C (PKC) e de proteínas da família Ras-MAPK. Somadas, essas vias irão levar à ativação de diversos fatores de transcrição (TF, *transcription factor*), como NFAT, NFκB, AP-1 e *c-Myc*, que irão alterar o padrão de expressão gênica das células ativadas, levando à sua proliferação e posterior aquisição de funções efetoras (Crabtree & Clipstone, 1994; Cantrell, 1996; Lewis, 2001).

Para adquirirem suas funções, estes linfócitos precisam antes se diferenciar em um dos quatro tipos de células efetoras: Th1, Th2, Th17 e Treg (Reiner, 2007), onde cada tipo é caracterizado pela produção de padrões distintos de citocinas (Seder & Paul, 1994; Szabo *et al.*, 2003). A diferenciação depende de vários fatores, como tipo e concentração do antígeno apresentado e, principalmente, do microambiente de citocinas presente durante a ativação (Seder & Paul, 1994; Macian, 2005), que irá desencadear a ativação de fatores de transcrição específicos. Linfócitos Th1 produzem IFN-γ, IL-2, TNF-α e -β (*tumor necrose factor*) (Seder & Paul, 1994; Szabo *et al.*, 2003), enquanto os linfócitos Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Rao & Avni, 2000).

1.2 REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO EM EUCARIOTOS

1.2.1 Regulação Geral da Transcrição

Os genes que codificam proteínas em eucariotos são transcritos pelo complexo da holoenzima RNA polimerase II, que é composto por 10 a 12 subunidades, pelos fatores basais de iniciação da transcrição e por um ou mais complexos mediadores. Esse complexo é montado na região promotora dos genes durante a transcrição (Orphanides *et al.*, 1996; Lee & Young, 2000, Dvir *et al.*, 2001). O promotor basal é uma região proximal de aproximadamente 100 pb (pares de bases), onde a maquinaria enzimática de transcrição é montada. A função dessa maquinaria é posicionar o início da transcrição relativo à sequência codificante. Embora necessário para a transcrição, a ligação dos fatores basais ao promotor basal não gera, por si só, níveis significativos de mRNA, já que essas proteínas são expressas ubiquitariamente e conferem pouca especificidade regulatória. Essas proteínas são conhecidas como fatores gerais da transcrição (Lee & Young, 2000; Lemon & Tjian, 2000).

A especificidade da transcrição é conferida pela presença de diversos sítios de ligação para fatores de transcrição dentro e fora do promotor basal (Smale & Kadonaga, 2003), o que permite a produção de níveis significativos de mRNA (Lemon & Tjian, 2000). As sequências de DNA que afetam o nível de transcrição são comumente chamadas de elementos em *cis*, enquanto que as proteínas que se ligam a essas sequências e mudam o nível de transcrição são chamadas de elementos em *trans* (Sperling, 2007). Os elementos em *cis* determinam quais fatores podem se associar com o promotor de um dado gene, o que também depende de quais fatores estão presentes no núcleo na forma ativa. Os fatores de transcrição ativos diferem durante o desenvolvimento, em resposta a estímulos e condições ambientais e entre os tipos celulares (Wray *et al.*, 2003).

No promotor basal, três elementos podem ser encontrados: o TATA *box*, normalmente localizado entre 25-30 pb a 5' do sítio de início da transcrição; o elemento iniciador (Inr) e a sequência de reconhecimento do fator geral de transcrição II B (TFIIB). Um promotor pode ser formado por combinações destas sequências ou por todas elas (Lee & Young, 2000; Smale & Kadonaga, 2003).

Estudos de reconstituição da transcrição *in vitro* demonstram que o processo requer cinco fatores de transcrição basais: TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIF e um sexto fator, que potencializa a transcrição, o TFIIA (Orphanides *et al.*, 1996; Sperling, 2007). Primeiramente ocorre o reconhecimento do promotor pelo TFIID, um complexo contendo a proteína ligadora da sequência TATA, TBP (TATA *binding protein*) e pelo menos outros 14 fatores associados (Smale & Kadonaga, 2003). O fator TFIIB estabiliza essa ligação, formando o complexo de pré-iniciação. TFIIB recruta o complexo RNA polimerase II-TFIIIF, seguido de TFIIE e TFIIF. O TFIIF tem atividade helicase e separa a dupla fita de DNA no sítio de início da transcrição (Dvir *et al.*, 2001). Este processo, que pode ser modulado positiva ou negativamente por fatores de transcrição ligados a outros sítios, é um dos pontos principais da regulação transcricional (Lee & Young, 2000; Lemon & Tjian, 2000).

1.2.2 Os fatores de transcrição

Os fatores de transcrição são caracterizados por pelo menos dois domínios estruturais distintos: o domínio de ligação ao DNA (DBD, *DNA binding domain*), que reconhece e se liga às sequências específicas no promotor de genes específicos e o domínio de ativação ou repressão da transcrição, que influencia a razão de transcrição por interagir diretamente com componentes da maquinaria basal de transcrição, facilitando ou inibindo sua associação com o

promotor basal; ou pela interação com outros cofatores, fatores de transcrição e/ou proteínas envolvidas na acessibilidade ou no silenciamento da cromatina (Wray *et al.*, 2003, Ganss & Jheon, 2004).

Diversos fatores de transcrição se ligam ao DNA como homo ou heterodímeros, enquanto outros só se ligam ao DNA se não estiverem ligados a cofatores e outros ainda se ligam ao DNA sozinhos, mas sua especificidade e/ou cinética de associação mudam completamente com a presença de cofatores (Wray *et al.*, 2003, Ganss & Jheon, 2004). Os cofatores (ou corre reguladores), por definição, não possuem um DBD, mas contêm domínios que medeiam associações proteína-proteína específicas com os fatores de transcrição (Wray *et al.*, 2003; Burke & Baniahmad, 2000). Os cofatores transcricionais podem ser subdivididos em coativadores, os quais medeiam a ativação gênica e em correpressores, que medeiam o silenciamento gênico (Burke & Baniahmad, 2000). Este assunto está discutido no subitem 1.2.3.

A regulação da transcrição comumente ocorre através de um dobramento do DNA (**Figura 1**), por meio de interações proteína-proteína. Esse tipo de interação ocorre com todos os sítios de orientação que estão a mais de algumas dezenas de pares de bases do promotor basal (Wray *et al.*, 2003). Existem elementos em *cis* na região promotora dos genes, que contêm seqüências ativadoras chamadas *enhancers* e seqüências repressoras chamadas *silencers*. Nas duas seqüências, existe um grupamento de sítios de ligação para fatores de transcrição. Essas regiões do DNA se dobram e os fatores de transcrição ligados a elas podem interferir com a transcrição de várias maneiras. Os fatores de transcrição que se ligam aos *enhancers* regulam a transcrição positivamente e os que se ligam aos *silencers* regulam-na negativamente (Lee & Young, 2000).

Diferentes fatores de transcrição se ligam a diferentes matrizes no DNA. O DBD da maioria dos fatores de transcrição é um motivo curto, comumente de alfa-hélice, que se insere no sulco maior do DNA. A substituição de um único aminoácido dentro desse domínio pode alterar a especificidade de ligação e dado que cada quilobase de DNA genômico contém dezenas de supostos sítios de ligação, a identificação de supostos sítios que realmente ligam proteínas requer testes bioquímicos e experimentais (Wray *et al.*, 2003).

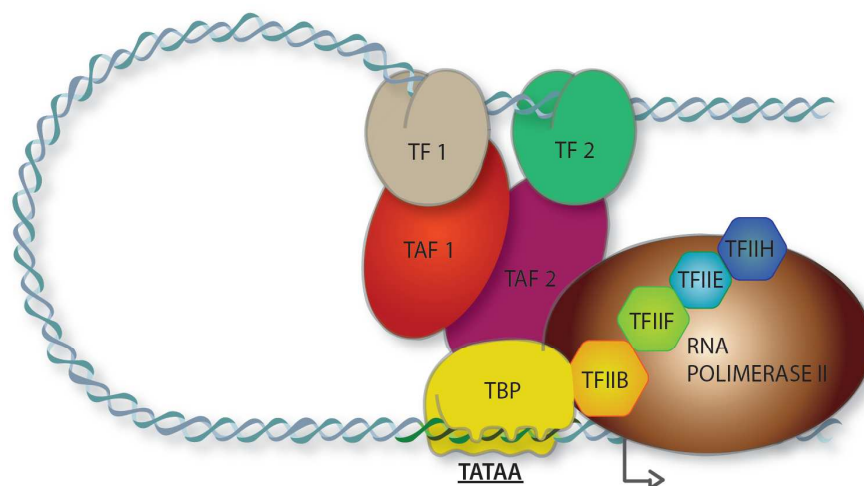


Figura 1- Formação do complexo de iniciação da transcrição: A sequência TATA é reconhecida pela proteína TBP (*TATA box binding protein*), que faz parte do complexo TFIID, representado pela TBP e pelas TAFs (*TBP associated factors*). O fator TFIIB recruta a RNA polimerase II (Polimerase), sendo a associação dos fatores TFIIF, E e H necessária para o início da transcrição. Fatores de transcrição específicos (TF) se ligam a sequências distantes no promotor, podendo interagir com os fatores de transcrição basais, através de um dobramento do DNA, ativando ou reprimindo o processo. Adaptado de Cooper, 2000.

1.2.2.1 A família de fatores de transcrição NFAT

Os fatores de transcrição da família NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) regulam a expressão de genes relacionados com inúmeras funções biológicas, como proliferação (ciclins e CDKs (*cyclin-dependent kinases*)) (Rao *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1998; Baksh *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2007), diferenciação (citocinas) (Rao *et al.*, 1997; Horsley & Pavlath, 2002; Macian, 2005), morte celular (FasL, TNF- α e Nur77) (Latinis *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 1997; Youn *et al.*, 2000; Kaminuma *et al.*, 2008) e angiogênese (Armesilla *et al.*, 1999; Iñiguez *et al.*, 2003; Yoeli-Lerner *et al.*, 2005; Jinin *et al.*, 2008).

O NFAT foi primeiramente descrito em uma linhagem de células T humanas, como um fator nuclear indutível, capaz de se ligar ao promotor de *IL-2* (Shaw *et al.*, 1988). Ao longo dos anos, diferentes membros da família foram identificados em diversos tecidos e tipos celulares, dentro e fora do sistema imune, e hoje a família NFAT é composta por cinco membros, designados pela ordem em que foram identificados: NFAT1 (também conhecido como NFATp, ou NFATc2), NFAT2 (NFATc, ou NFATc1), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATx, ou NFATc3) e NFAT5 (TonEBP, ou OREBP, ou NFATz) (Rao *et al.*, 1997; Macian *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 2003).

1.2.2.1.1 Estrutura e Ativação do NFAT

As cinco proteínas da família apresentam o DBD altamente conservado e uma região regulatória N-terminal, com alta similaridade entre os NFAT1-4, chamada NHR (*NFAT-homology region*) (Rao *et al.*, 1997; Macian *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 2003) (**Figura 2**). O DBD do NFAT é semelhante ao encontrado em fatores de transcrição da família Rel e apresenta uma sequência de oito resíduos de aminoácidos (RAHYETEG), através do qual ele se liga às regiões regulatórias dos promotores de diversos genes.

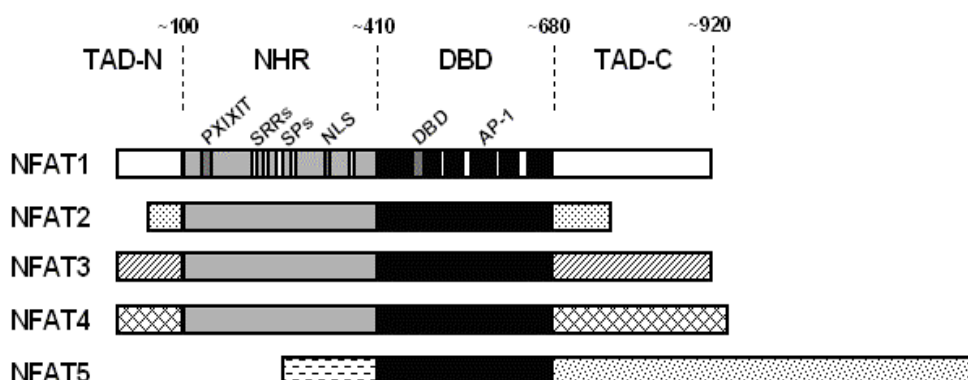


Figura 2 - Representação esquemática das proteínas da família NFAT: Essa família é composta pelos cinco membros representados, os quais apresentam o domínio de ligação ao DNA (DBD, *DNA binding domain*) altamente conservado, através do qual o NFAT se liga ao promotor dos genes que regula. A região regulatória NHR (*NFAT-homology region*) é conservada entre os membros de 1-4 e nela são encontrados: o sítio de ligação para a calcineurina (PXIXIT), a sequência de localização nuclear (NLS, *nuclear localization signal*) e regiões ricas em resíduos de serina e prolina (SRR, *serine-rich region* e SP, *serine proline-repeat motif*). Também estão representados os domínios de transativação (TAD, *transactivation domain*) N- e C-terminais, específicos de cada proteína. Posição de cada região em relação à proteína NFAT1 (Teixeira, 2006).

As proteínas NFAT apresentam uma sequência consenso de ligação ao DNA, identificada pelos nove pares de base: (A/T)GGAAA(A/N)(A/T/C)N (onde N representa qualquer nucleotídeo). A região regulatória NHR é responsável pela ativação dos membros da família. Nessa região são encontrados: o sítio de ligação para a enzima calcineurina; as sequências de localização e de exportação nuclear e regiões ricas em resíduos de serina e prolina. A dinâmica de fosforilação e defosforilação desses resíduos de aminoácidos determina o estágio de ativação da proteína NFAT, que pode ser dividida em 3 momentos: defosforilação, translocação nuclear e ligação ao DNA (Rao *et al.*, 1997). A proteína NFAT5 tem a região NHR truncada e não possui o sítio de ligação para a calcineurina. Diferente dos

outros membros, a proteína NFAT5 é regulada por variações de tonicidade celular induzidas por estresse osmótico.

As regiões N- e C-terminais das proteínas NFAT ainda apresentam domínios de transativação exclusivos (Rao *et al.*, 1997; Macian *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 2003), os quais apresentam grande divergência entre os membros da família e podem estar envolvidas na interação com diferentes parceiros transcrpcionais.

O NFAT é constitutivamente expresso no citoplasma de células não ativadas (Rao *et al.*, 1997), na sua forma inativa e fosforilada (Shaw *et al.*, 1995). Sua ativação ocorre após o estímulo de receptores acoplados à mobilização de Ca^{2+} (Rao *et al.*, 1997, Macian, 2005) (**Figura 3**). A depleção do Ca^{2+} do retículo endoplasmático liso a partir da quebra de PIP_2 em IP_3 induz um influxo prolongado de Ca^{2+} , através da abertura de canais de membrana plasmática dependentes de Ca^{2+} . O influxo sustentado deste íon leva à ativação de enzimas dependentes de calmodulina, como a calcineurina (Lewis, 2001), uma fosfatase de serina/treonina que defosforila resíduos de serina nas proteínas NFAT (Okamura *et al.*, 2000; Hogan *et al.*, 2003). A defosforilação provoca uma mudança conformacional na proteína, expondo a sequência de localização nuclear e escondendo a sequência de exportação nuclear, permitindo a translocação do NFAT para o núcleo. Uma vez no núcleo, ele se liga à região promotora dos genes que regula e promove ou impede a transativação dos mesmos sozinho ou em cooperação com parceiros transcrpcionais (Rao *et al.*, 1997; Macian *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 2003). Drogas imunossupressoras como a Ciclosporina A (CsA) e o FK506 bloqueiam diretamente a fosfatase calcineurina e, conseqüentemente, a ativação das proteínas NFAT (Shaw *et al.*, 1995; Rao *et al.*, 1997; Kiani *et al.*, 2000).

Além da regulação pela fosfatase calcineurina, existem proteínas que desempenham um papel importante na atividade do NFAT. Algumas aumentam sua capacidade de transativação, como os coativadores CBP/p300 e a quinase PIM-1 (Avots *et al.*, 1999; Rainio *et al.*, 2002), enquanto outras são responsáveis pela manutenção do NFAT no citoplasma enquanto não há ativação celular e/ou por sua exportação nuclear, a exemplo, as quinases GSK-3 (*glycogen synthase kinase-3*), JNK (*JUN N-terminal kinase*), CK-1 (*casein kinase 1*) e p38 (Beals *et al.*, 1997; Macian, 2005).

As proteínas NFAT são transativadores fracos e frequentemente estão associadas com proteínas parceiras para regularem a transcrição (Cockerill, 2008). Vários estudos identificaram proteínas que se ligam ao NFAT e alteram sua atividade transcricional. A maioria dessas proteínas interage com a região NHR, conservada entre os diferentes membros

NFAT. As proteínas da família AP-1 (*activator protein-1*) são os principais parceiros de ativação do NFAT durante a ativação dos linfócitos T, sendo composta por dímeros que interagem entre si. Os dímeros de Fos e Jun formam complexos com o NFAT e o DNA nos sítios compostos NFAT1-AP-1. (Jain *et al.*, 1992; Macian *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 2003). Além da interação com AP-1, as proteínas NFAT interagem com outras famílias de fatores de transcrição como Maf, ICER, p21^{Cip1}, GATA e EGR (Ho *et al.*, 1996; Bodor *et al.*, 2000, Bower *et al.*, 2002), o receptor nuclear PPAR- γ (Yang *et al.*, 2000), as proteínas Oct e IRF-4 (Bert *et al.*, 2000; Rengarajan *et al.*, 2002), a proteína FOXP3, (Wu *et al.*, 2006), entre outras. Algumas dessas interações levam ao aumento da atividade transcricional do NFAT, enquanto outras levam à repressão.

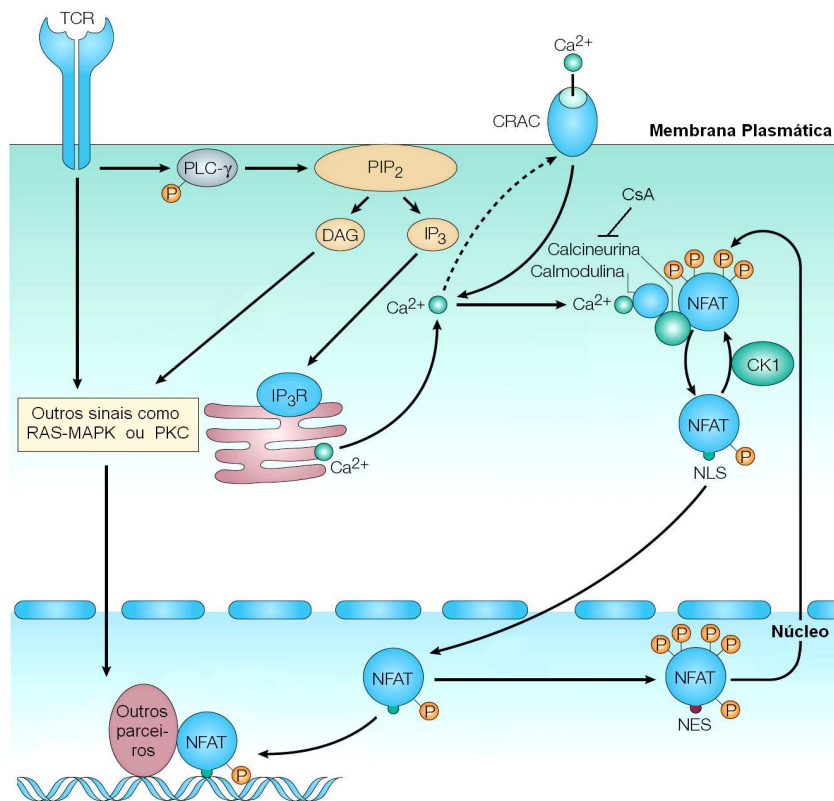


Figura 3 - Ativação das proteínas NFAT: A estimulação do TCR ativa várias vias de sinalização em linfócitos T, dentre elas, a da fosfolipase C (PLC- γ), que leva à hidrólise de fosfatidilinositol-bisfosfato (PIP₂) de membrana em inositol-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ é responsável pelo aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular e consequente ativação da calcineurina, que defosforila as proteínas NFAT1-4 presentes do citoplasma, permitindo sua translocação para o núcleo. No núcleo, o NFAT regula a expressão de diversos genes, o que pode ocorrer em colaboração com outros fatores de transcrição, ativados por outras vias. A fosforilação do NFAT no núcleo induz sua translocação para o citoplasma. TCR, “*T Cell Receptor*”; Ca²⁺, Cálcio; CRAC, “*calcium-release-activated calcium channels*”; CsA, Ciclosporina A; NLS “*nuclear localization signal*”; NES, “*nuclear exportation signal*”. Adaptado de Macian, 2005.

1.2.2.1.2 Distribuição e funções das proteínas NFAT

As proteínas NFAT são expressas em diferentes tecidos e tipos celulares. Dentro do sistema imune, o NFAT é expresso em monócitos, células NK, mastócitos, monócitos, linfócitos e células epiteliais (Rao *et al.*, 1997). Nos órgãos linfóides periféricos, o NFAT1 representa o membro majoritário da família, sendo responsável por quase 90% do conteúdo total de NFAT em células imunes não ativadas (Kiani *et al.*, 2000); o NFAT2 também é expresso nos órgãos linfóides periféricos; o NFAT3 é o único membro não encontrado em células do sistema imune (Rao *et al.*, 1997; Kiani *et al.*, 2000) e o NFAT4 está envolvido principalmente com a maturação e seleção de linfócitos T no timo, tendo sua expressão diminuída nos órgãos linfóides periféricos (Masuda *et al.*, 1995; Oukka *et al.*, 1998). Fora do sistema imune, essas proteínas são encontradas em células endoteliais, musculares (cardíacas e esqueléticas), cardiomiócitos, neurônios, condrócitos, células pancreáticas, de mama, de cólon, dentre outras (Ho *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2007; Horsley & Pavlath, 2002; Hogan *et al.*, 2003; Jauliac *et al.*, 2002; Buchholz *et al.*, 2006).

A alta similaridade da região do DBD entre os diferentes membros da família NFAT, confere especificidades comuns de ligação ao DNA, o que pode explicar a redundância observada em algumas funções reguladas pelos diferentes NFATs (Macian, 2005; Youn *et al.*, 2000; Santini *et al.*, 2001). Entretanto, o fenótipo de camundongos ou de células deficientes para uma ou mais dessas proteínas mostrou que os diferentes representantes da família também executam funções distintas. Quando comparados aos camundongos selvagens, os camundongos deficientes para NFAT1 (NFAT1^{-/-}) possuem uma resposta imune aumentada, apresentando hiperproliferação linfocitária e eosinofilia, com aumento de linfócitos do tipo Th2, acompanhado por aumento de expressão de IL-4, IL-5 e IL-13 frente a estímulo (Hodge *et al.*, 1996; Xanthoudakis *et al.*, 1996; Viola *et al.*, 1998; Caetano *et al.*, 2002). A ausência de NFAT1 também leva ao crescimento e diferenciação desordenados de células do tecido cartilaginoso (Ranger *et al.*, 2000). Por outro lado, animais deficientes para o NFAT2 são letais durante a embriogênese, por defeitos na formação da válvula cardíaca (Ranger *et al.*, 1998a), mas linfócitos NFAT2^{-/-} gerados a partir da reconstituição de blastocistos RAG^{-/-}, apresentam uma proliferação linfocitária diminuída em resposta a estímulo, com supressão da proliferação de células B e T, além de produzirem baixos níveis de IL-4, com conseqüente comprometimento do fenótipo Th2 (Ranger *et al.*, 1998b). Recentemente, nós demonstramos que as proteínas NFAT1 e NFAT2 têm funções opostas durante a regulação do ciclo celular e da apoptose de células NIH3T3. Enquanto o NFAT2 atua como um regulador positivo da

proliferação e um repressor da morte celular, o NFAT1 induz arresto de ciclo celular e aumenta a morte (apêndice 9.1.1 - Robbs *et al.*, 2008). Esses dados sugerem papéis antagônicos para os fatores de transcrição NFAT1 e NFAT2, tanto na diferenciação de linfócitos T CD4 quanto na regulação da proliferação e morte celular. Esse fenótipo pode ser explicado pela diferença de expressão entre os membros NFAT1 e NFAT2, onde cada proteína pode ocupar um dado promotor num tempo específico; pela diferença de afinidade aos diversos promotores; ou ainda pela habilidade que cada fator tem de interagir com diferentes coativadores e correpressores através dos seus domínios N- ou C-terminais, que são pouco conservados entre os diferentes membros NFAT (Macian, 2005).

1.2.2.1.3 NFAT, ciclo celular e tumorigênese

A proliferação celular é regulada pela combinação de fatores estimulatórios e inibitórios, como mitógenos, fatores de crescimento e citocinas, que fazem as células progredirem de maneira unidirecional ao longo do ciclo celular. Este ciclo é dividido em quatro fases principais, que ocorrem de forma sequencial: G₁, S, G₂ e M. Em S (*synthesis*) ocorre a condensação da cromatina e síntese de DNA e em M (*mitosis*), ocorre a divisão celular propriamente dita, originando duas células geneticamente idênticas à de origem. As fases G₁ e G₂ (*gap*) são intermediárias e preparatórias para as fases S e M. As células quiescentes, que não se encontram em ciclo, estão em G₀. A transição entre essas fases é precisamente regulada por diversas proteínas, dentre elas, as CDKs, que são constitutivamente expressas e suas ciclinas ativadoras, reguladas por transcrição, expressas em fases específicas do ciclo celular. A disponibilidade das ciclinas determina a formação dos complexos e a atividade das CDKs, assim como a progressão unidirecional ao longo do ciclo. Uma terceira classe de proteínas, chamada CKI (*CDK inhibitor*), inibe as CDKs e, conseqüentemente, os complexos ciclina/CDKs (Sherr, 2000; Vermeulen *et al.*, 2003).

A entrada no ciclo celular é dependente de estímulos mitogênicos extracelulares, que fazem a célula transitar do estágio de quiescência, G₀, para a fase G₁, durante a qual ocorre a síntese da ciclina D e a formação do complexo ciclina D-CDK4/6, que fosforila a proteína Rb (retinoblastoma), liberando o fator de transcrição E2F (*E2 promoter binding factor*) (Sherr, 2000). E2F induz a transcrição de genes envolvidos na transição de G₁/S, como o das ciclinas D, E e A, *c-Myc* e DNA polimerase (Matsumura *et al.*, 2003). No final de G₁, o complexo ciclina E-CDK2 fosforila pRB em sítios adicionais, levando à transição de G₁/S. Em S, a ciclina A se associa com CDK2 e mantém a proteína E2F livre do inibidor pRb, impedindo o

regresso à G₁. No final de G₂ e início de M, a ciclina A forma complexos com CDK1 para promover a entrada em M. A mitose é depois regulada pelo complexo ciclinaB/CDK1, que fosforila proteínas que regulam diferentes eventos da mitose, como a ruptura da membrana nuclear, a condensação dos cromossomos e a formação do fuso mitótico, permitindo a divisão celular (Smits & Medema, 2001; Vermeulen *et al.*, 2003).

As primeiras evidências de que as proteínas NFAT exerciam algum papel no controle do ciclo e da proliferação celular vieram de estudos que mostraram a transição de G₁/S mediada pela sinalização de Ca²⁺ (Tomono *et al.*, 1996) e do papel da CsA na inibição de ciclinas e CKIs (Tomono *et al.*, 1998; Santini *et al.*, 2001). Posteriormente, Caetano *et al.* (2002), demonstraram que linfócitos dos camundongos NFAT1^{-/-} apresentam um descontrole do ciclo celular frente a estímulo secundário, associado a uma expressão aumentada das ciclinas A, B, E e F, quando comparados aos linfócitos dos camundongos selvagens, sugerindo uma regulação negativa da progressão do ciclo celular pelo NFAT1, já que na sua ausência, ocorre um encurtamento desse ciclo, associado a um aumento na expressão de diversas ciclinas. No mesmo ano, foi descrito que o NFAT1 regula diretamente o promotor de CDK4, inibindo sua expressão e, mais recentemente, o mesmo resultado foi encontrado para a ciclina A2, corroborando a hipótese do NFAT1 agir reprimindo o ciclo celular (Baksh *et al.*, 2002, Carvalho *et al.*, 2007). Dando suporte para a descrição de que as diferentes proteínas NFAT podem ter funções redundantes, tanto NFAT1 quanto NFAT2 induzem a expressão do inibidor de CDK p21^{Cip1} em queratinócitos (Santini *et al.*, 2001) e do proto-oncogene *c-Myc* em células pancreáticas (Buchholz *et al.*, 2006; Koenig *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010). Por outro lado, foi demonstrado que a proteína NFAT2 regula a expressão de ciclina A de forma oposta ao NFAT1, induzindo sua expressão (Karpurapu *et al.*, 2008). Até o momento não foi demonstrado que os membros NFAT3-5 regulem diretamente genes envolvidos na progressão do ciclo celular.

As proteínas NFAT têm sido implicadas em vias importantes para o desenvolvimento da tumorigênese, como na angiogênese, definida como o processo de formação de novos vasos, importante para a nutrição do tumor. Foi mostrado que a atividade do NFAT é induzida por VEGF (*vascular endothelial cell growth factor*) (Armesilla *et al.*, 1999; Hernandez *et al.*, 2001), um mitógeno endotelial, cuja função é crítica para a angiogênese. Nesse aspecto, foi mostrado que quando ativado pela via de VEGF, o NFAT está ligado à indução de COX-2 (*cyclooxygenase-2*) (Hernandez *et al.*, 2001). Especificamente, foi mostrado que tanto NFAT1 (Yiu & Toker, 2006) quanto NFAT2 (Duque *et al.*, 2005) induzem COX-2. Os outros

membros da família não foram avaliados. As proteínas NFAT3 e NFAT4 também contribuem para a angiogênese. Elas são expressas em tecidos perivasculares e dirigem o desenvolvimento de células endoteliais e de musculatura lisa vascular (Horsley & Pavlath, 2002).

Outro componente igualmente importante para a progressão do tumor é a propensão das células migrarem e invadirem o tecido adjacente e a corrente sanguínea (Hanahan & Weinberg, 2000). Foi mostrado que o NFAT1 está envolvido na invasão de células de câncer de mama (Jauliac *et al.*, 2002; Yiu & Toker, 2006) e que NFAT1 e NFAT5 têm relação com o potencial metastático das mesmas células (Jauliac *et al.*, 2002). Além disso, o bloqueio dos membros da família NFAT impede a mobilidade e a invasão de células de câncer de mama (Yoeli-Lerner *et al.*, 2005). A indução de COX-2 pelo NFAT1 também foi ligada com a migração das células endoteliais primárias (Hernandez *et al.*, 2001) e com metástase e invasão das células de carcinoma hepatocelular infectadas com o vírus da hepatite B (Lara-Pezzi *et al.*, 2002).

A sinalização fornecida pelo microambiente em torno do tumor também é fundamental para o desenvolvimento tumoral. Nesse aspecto, Medyouf *et al.* (2007) mostraram que logo após as células leucêmicas serem removidas do seu ambiente *in vivo* e cultivadas *in vitro*, o NFAT reverteu para sua forma fosforilada inativa, indicando a diminuição da atividade da calcineurina. Interessantemente, essa inativação *in vitro* foi revertida quando as células foram reimplantadas em hospedeiros singeneicos, confirmando um requerimento para os sinais autócrinos/parácrinos no microambiente para sustentar a ativação da calcineurina (Medyouf & Ghysdael, 2008). Adicionalmente, foi sugerido que o NFAT é um ponto de convergência entre sinais inibitórios e estimulatórios na regulação da angiogênese, onde indutores da angiogênese como bFGF e VEGF ativam o NFAT1, e inibidores como PEDF (*pigment epithelial-derived factor*) reprimem sua atividade. Esses resultados mostram que a regulação do NFAT1 é fundamental para determinar a angiogênese *versus* a manutenção ou regressão dos capilares existentes (Zaichuk *et al.*, 2004). Outros trabalhos ainda sugerem que a sinalização do microambiente determina se a via de calcineurina/NFAT irá promover a angiogênese ou a apoptose (Zaichuk *et al.*, 2004; Jinnin *et al.*, 2008).

A desregulação da sinalização de NFAT/calcineurina e/ou a expressão anormal de seus componentes é descrita em tumores sólidos de origem epitelial, linfomas e leucemias linfóides (Medyouf & Ghysdael, 2008). A localização nuclear do NFAT2 foi encontrada em 70% dos casos de linfoma de Burkitt, 30% dos de linfoma de células B grandes difusas (Marafioti *et*

al., 2005) e 70% dos carcinomas pancreáticos (Buchholz *et al.*, 2006). A superexpressão de uma proteína NFAT2 constitutivamente ativa em fibroblastos 3T3L1 foi suficiente para diminuir a diferenciação terminal destas células em adipócitos e para induzir a transformação celular, o que foi associado com o aumento de expressão de *c-Myc* e das ciclinas D2 e D3 (Neal & Clipstone, 2003). Também já foi demonstrado que o estímulo de PMA e ionomicina, que simula a via de ativação do TCR, induz o aumento da expressão de *c-Myc* e que esse aumento é bloqueado pela administração de CsA (Reed *et al.*, 1985; Furue *et al.*, 1990, Golay *et al.*, 1992), sugerindo um papel para a família NFAT durante a regulação de *c-Myc*. Juntos, esses dados sugerem que mudanças nas vias de transdução de sinal são elementos chave para a patogênese do câncer. As proteínas NFAT têm suas funções fisiológicas, que podem ser aumentadas ou diminuídas por diferentes vias de sinalização. Durante o desenvolvimento tumoral e entre diferentes tipos de tumor, as proteínas NFAT podem contribuir para aspectos distintos da tumorigênese, incluindo a desregulação inicial do controle do ciclo celular, o recrutamento adequado de nutrientes e a regulação da metástase.

1.2.2.2 O fator de transcrição *c-Myc*

O isolamento e a caracterização do proto-oncogene *c-Myc* ocorreram em 1982. Ele foi descrito como o homólogo das sequências transformantes do retrovírus aviário mielocitomatose, *v-myc* (Vennstrom *et al.*, 1982). Ainda no mesmo ano, sua associação com a translocação de cadeia pesada de imunoglobulina foi demonstrada em linfomas de Burkitt (Dalla-Favera *et al.*, 1982) e hoje se sabe que a expressão desregulada desse gene está associada com diversos tipos de tumores (Marcu *et al.*, 1992; Facchini & Penn, 1998; Arvanitis & Felsher, 2006; Vita & Henriksson, 2006; Evan *et al.*, 2009). Entretanto, *c-Myc* é um gene crítico para a homeostasia normal quando expresso normalmente, exercendo papéis importantes no crescimento, progressão do ciclo celular, diferenciação e indução da apoptose (Kelly *et al.*, 1983; Marcu *et al.*, 1992; Facchini & Penn, 1998; Evan *et al.*, 2009).

1.2.2.2.1 Estrutura do gene e da proteína

O produto do gene *c-Myc* é uma fosfoproteína nuclear altamente conservada. Seu gene possui 3 éxons (Hamlyn & Rabbits, 1983; Bernard *et al.*, 1983, Kelly *et al.*, 1983), com similaridade de nucleotídeos entre humanos e camundongos em torno de 90% para os éxons 2 e 3. O éxon 1 possui uma grande região não traduzida a 5', podendo ter deleções ou inserções.

A conservação deste éxon nas duas espécies é maior do que o esperado para regiões não traduzidas, ficando entre 69 e 75% (Bernard *et al.*; 1983).

Existem vários sítios de iniciação da transcrição (**Figura 4**), sendo P1 e P2 os principais (Kelly *et al.*, 1983; Bernard *et al.*; 1983), posicionados a aproximadamente 160 pb de distância (Bernard *et al.*, 1983; Battey *et al.*, 1983). P2 é predominante, gerando de 75-90% dos transcritos, enquanto P1 gera os outros 10-25%. Um terceiro promotor, P0 (550 a 650 pb a 5' de P1) é único no gene humano e gera apenas 5% da transcrição efetiva de *c-Myc*. Há um quarto promotor, P3, próximo do 3' do primeiro íntron. P1 e P2 contêm um elemento TATA box consenso, enquanto um forte elemento iniciador (Inr) ocorre apenas no sítio de início de transcrição de P2. Ao contrário, P0 e P3 não possuem TATA box (Marcu *et al.*, 1992).

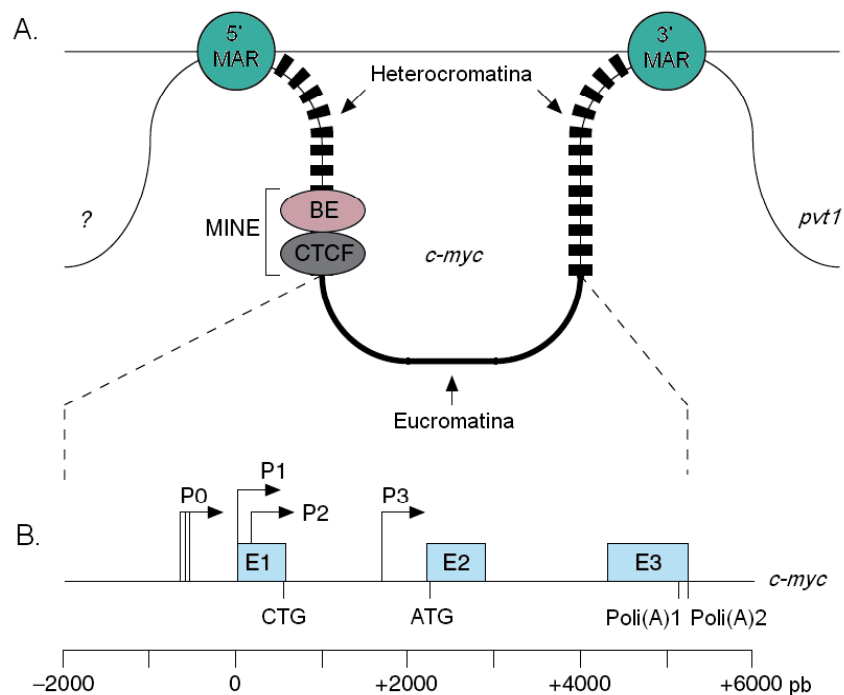


Figura 4 - Estrutura do locus de *c-Myc* humano: (A) As regiões de ligação à matriz, MARs (*matrix attachment region*), localizadas a 80 kb *upstream* e 50 kb *downstream*, definem um domínio que contém hetero e eucromatina e separa esse domínio dos genes vizinhos. A 5', a eu e a heterocromatina são separadas pelo elemento MINE (*c-Myc insulator element*), localizado a aproximadamente 2,5 kb do sítio de início de transcrição. (B) O gene *c-Myc*, contendo três éxons, os quatro promotores (P0, 1, 2 e 3), os dois principais inícios de tradução (CTG e ATG) e os dois sinais de poliadenilação (Poli(A)1 e 2). Adaptado de Wierstra & Alves (2008).

Os promotores P1 e P2 geram transcritos de 2.4 e 2.2 kb, respectivamente (Kelly *et al.*, 1983; Hamlyn & Rabbits, 1983) e codificam as duas principais espécies de proteínas: *c-Myc*-1

e *c-Myc-2*. A primeira contém 14 aminoácidos adicionais a N-terminal e sua transcrição é iniciada no códon CUG próximo do 3' final do primeiro éxon. O restante desse éxon é uma grande sequência não codificante. *c-Myc-2* é menor e começa no AUG no início do segundo éxon (Han *et al.*, 1988; Facchini & Penn, 1998). Esses dois códons de iniciação (CUG e AUG) estão em *frame* (Han *et al.*, 1988). Uma terceira isoforma também foi descrita, iniciando de um códon AUG a 100 aminoácidos *downstream* no éxon 2, codificando uma proteína menor chamada Myc-S, que inibe a transativação das proteínas inteiras e parece ter uma função inibitória dominante-negativa. Um balanço entre as três proteínas, que pode flutuar dependendo do ambiente celular, deve prover um mecanismo sensível para a modulação da função de *c-Myc* durante os diferentes estágios do crescimento, diferenciação e apoptose (Spotts *et al.*, 1997).

A proteína *c-Myc* é organizada em domínios característicos de ativadores transcricionais: um N-terminal globular com seu domínio de ativação; uma região básica C-terminal de α -hélice, envolvida no reconhecimento e ligação às sequências de DNA específicas e um motivo para dimerização, de hélice-dupla-hélice leucina-zíper (HLH-LZ). O motivo de HLH-LZ é responsável pela heterodimerização específica entre *c-Myc* e seu parceiro de ligação, MAX (*MYC-associated factor X*), outra proteína BR-HLH-LZ. Essa interação resulta em heterodímeros, que reconhecem e se ligam ao elemento E-box CAC(A/G)TG e ativam a transcrição (Facchini *et al.*, 1997; Amati *et al.*, 1998). Especula-se que tal interação seja necessária para o correto dobramento de *c-Myc* (Adhikary & Eilers, 2005), já que *c-Myc* sozinho não se liga ao DNA (Eisenman, 2001) e essa interação é requerida para todas as funções conhecidas de *c-Myc* (Facchini *et al.*, 1997).

MAX está presente em excesso quando comparado à *c-Myc* e pode formar homodímeros ou heterodímeros com várias proteínas, como MAD, MXI e MNT. *In vivo*, os complexos *c-Myc*-MAX são predominantes em células em proliferação, enquanto MAD-MAX ou MNT-MAX são predominantes em células em repouso ou diferenciadas. Quando ligados às sequências E-box, *c-Myc*-MAX ativam e MAD-MAX ou MNT-MAX reprimem a transcrição (Adhikary & Eilers, 2005). Essa repressão é mediada pela interação com duas proteínas corressoras, Sin3A e Sin3B (Torchia *et al.*, 1998; Burke & Baniahmad, 2000). *c-Myc*-MAX também podem se ligar à sequências que não E-box, por se associarem com outras proteínas, como TRAP, YY1, TFII-I, AP-2 e MIZ-1 (Facchini *et al.*, 1997; Eisenman, 2000; Adhikary & Eilers, 2005).

1.2.2.2.2 Regulação da expressão de *c-Myc*

Normalmente, a expressão de *c-Myc* está correlacionada com o potencial proliferativo da célula. Em células quiescentes, sua expressão é praticamente indetectável. Sob estimulação de soro ou mitogênica, há uma rápida e transiente expressão de mRNA e proteína de *c-Myc*, durante a entrada na fase G₁ do ciclo celular, seguido por um gradual declínio a um nível baixo, mas detectável, nas células em proliferação (Kelly *et al.*, 1983; Reed *et al.*, 1985; Dean *et al.*, 1986; Levine *et al.*, 1986; Golay *et al.*, 1992, Penn *et al.*, 1990). Sua transcrição ocorre na ausência de síntese proteica *de novo*, indicando ser um gene imediato e diretamente *downstream* da cascata de sinalização mitogênica (Kelly *et al.*, 1983; Rabbitts *et al.*, 1985; Marcu *et al.*, 1992). Quando ocorre retirada de fatores de crescimento ou em casos de diferenciação terminal, o mRNA e a proteína de *c-Myc* diminuem a níveis praticamente indetectáveis (Rabbitts *et al.*, 1985, Dean *et al.*, 1986). A regulação de sua expressão é complexa e pouco compreendida (Wierstra & Alves, 2008), envolvendo vários mecanismos, incluindo mudanças na iniciação e elongação da transcrição, estabilidade do RNA, reciclagem e tradução da proteína (Bentley & Groudine, 1986; Levine *et al.*, 1986).

Em relação à transcrição, elementos em *cis* positivos e negativos têm sido identificados no promotor de *c-Myc* (Kumar & Leffak, 1989). Interessantemente, muitos dos fatores de transcrição que se ligam a esses elementos são oncoproteínas ou supressores de tumor, como p53, Ets (Penn *et al.*, 1990, Facchini & Penn, 1998) e WNT (Han *et al.*, 2004). Esses fatores de transcrição podem atuar simultânea ou sequencialmente durante a montagem ou progressão do complexo de pré-iniciação. Sabe-se que em células não diferenciadas, o complexo da RNA polimerase II já se encontra ligado ao promotor de *c-Myc* e é exatamente essa característica que faz com que o gene tenha sua transcrição tão prontamente regulada em resposta a diversos estímulos. O aumento quase instantâneo do mRNA de *c-Myc* que ocorre quando as células são ativadas, ocorre por um simples aumento da competência da elongação da RNA polimerase II, assim como sua rápida redução por retirada de fatores de crescimento ocorre por bloqueio dessa elongação, sem afetar a iniciação da transcrição (Wierstra & Alves, 2008).

O mecanismo de auto-regulação negativa (Penn *et al.*, 1990; Facchini *et al.*, 1997) também é fundamental para o controle da transcrição de *c-Myc*, funcionando como uma alça regulatória negativa. A proteína *c-Myc* inibe seu próprio promotor, de maneira proporcional à concentração de proteína *c-Myc* (Penn *et al.*, 1990), que parece interagir com a maquinaria basal de transcrição (Facchini & Penn, 1998).

O mRNA e a proteína de *c-Myc* são moléculas de meia-vida de 20-30 minutos (Rabbitts *et al.*, 1985; Levine *et al.*, 1986; Marcu *et al.*, 1992), sendo que a proteína é fosforilada em vários resíduos de serina e treonina a N- e a C-terminal. As fosforilações mais importantes ocorrem nos resíduos Thr58 e Ser62, onde a fosforilação da Ser62 ocorre primeiro e estabiliza a proteína, enquanto a fosforilação da Thr58 pela GSK3 sinaliza para poliubiquitinação e subsequente degradação de *c-Myc* (Lusher & Larsson, 2007).

1.2.2.2.3 Atividades biológicas de *c-Myc*

A proteína *c-Myc* é altamente conservada em vertebrados, mas não existe homólogo em levedura ou nematodo (Facchini *et al.*, 1998). Essa conservação implica em papéis essenciais para esse gene no metabolismo celular normal (Kelly *et al.*, 1983). Nesse aspecto, *c-Myc* regula a transcrição de genes dependentes de RNA polimerase I, II e III, genes de RNA ribossomal (Coller *et al.*, 2000; Adhikary & Eilers, 2005) e genes envolvidos no metabolismo de nucleotídeos (Eisenman, 2001). Também se acredita que ele aumente a metilação do *cap* de diversos mRNAs, levando ao aumento da síntese proteica (Lusher & Larsson, 2007) e esteja envolvido na acetilação de histona H4 (Wu *et al.*, 2007). *c-Myc* regula a razão de crescimento, definida como um aumento na massa e tamanho celular, requerida para a progressão do ciclo celular (Eisenman, 2001) e também a apoptose (Facchini & Penn, 1998, Pelengaris *et al.*, 2002; Nieminen, *et al.*, 2007; Evan *et al.*, 2009).

1.2.2.2.4 *c-Myc*, ciclo celular e tumorigênese

A função de *c-Myc* varia muito com as condições experimentais e tipos celulares. Além disso, os mecanismos de apoptose, progressão do ciclo celular e tumorigênese são extremamente relacionados. A indução da expressão de *c-Myc* estimula células quiescentes não transformadas a atravessarem a fase G₁ e entrarem em S (Eilers *et al.*, 1991; Facchini & Penn, 1998). Sua simples superexpressão resulta na formação de linfomas, osteosarcomas e carcinomas hepatocelulares (Arvanitis & Felsher, 2006; Wu *et al.*, 2007). *In vivo*, a superexpressão de *c-Myc* em células hematopoiéticas leva ao desenvolvimento de tumores T (Felsher & Bishop, 1999; Smith *et al.*, 2005), além de aumentar a quantidade de monócitos e células eritróides na medula óssea; e de células B e megacariócitos no baço (Smith *et al.*, 2005). Em alguns modelos, entretanto, *c-Myc* sozinho não é capaz de induzir a transformação, como em NIH-3T3 ou REFs (*rat embryonic fibroblasts*), mas é capaz de se associar com RAS

alterado (Kelly *et al.*, 1983) ou com v-ABL (Facchini & Penn, 1998), para então transformá-las.

Células normais sofrem parada em G₀/G₁ quando depletadas de *c-Myc* (Wang *et al.*, 2007), acompanhadas de inibição da proliferação (Adhikary & Eilers, 2005; Wang *et al.*, 2007) e do crescimento celular; diferenciação e aumento de adesão (Adhikary & Eilers, 2005). Em tumores, a inativação de *c-Myc* pode levar a vários fenótipos, desde a regressão dos mesmos, associada com parada de proliferação, diferenciação e apoptose (Tumores T, mama) (Felsher & Bishop, 1999; Pelengaris *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2007), passando por indução de senescência, apoptose, redução global de RNA, proteína e tamanho celular, até inibição da proliferação sem indução de apoptose (Wu *et al.*, 2007) e reexpressão de marcadores de diferenciação (Pelengaris *et al.*, 2002).

A inibição de *c-Myc* em várias linhagens tumorais resulta em parada de ciclo celular em diferentes fases (Wang *et al.*, 2007). Como *c-Myc* está envolvido em múltiplos processos celulares, essa inibição deve resultar da ativação de *checkpoints* de várias fases do ciclo (Gottifredi, 2005). A diferença entre as linhagens deve depender de outros fatores, cujos níveis de expressão e/ou *status* mutacional difiram entre células normais e tumorais e entre diferentes tumores, determinando o tipo de bloqueio (Wang *et al.*, 2007).

c-Myc dirige a progressão do ciclo regulando positivamente E2F (Matsumura *et al.*, 2003), ciclinas D (Amati *et al.*, 1998; Collier *et al.*, 2000; Eisenman, 2001), E e A (Facchini & Penn, 1998; Eisenman, 2001), CDK4 (Amati *et al.*, 1998; Hermeking *et al.*, 2000) e Cdc25, uma fosfatase que ativa CDKs, permitindo a formação de complexos com ciclinas, para fosforilar reguladores do ciclo celular, como pRb (Galaktionov *et al.*, 1996; Eisenman, 2001). Além disso, reprime ou sequestra CKIs, como p15^{INK4}, p27^{Kip1} e p21^{Cip1}, cuja expressão leva ao bloqueio do ciclo celular (Amati *et al.*, 1998; Collier *et al.*, 2000) e ativa enzimas da biossíntese e produção metabólica de poliaminas, pirimidinas e lactato, essenciais para o crescimento e divisão celular (Facchini & Penn, 1998; Collier *et al.*, 2000).

Existem mecanismos que limitam a transformação por *c-Myc* e, teoricamente, precisam ser inativadas para a formação do tumor ocorrer (Facchini & Penn, 1998; Evan *et al.*, 2009), como sua habilidade de induzir a apoptose (Facchini & Penn, 1998, Pelengaris *et al.*, 2002; Nieminem *et al.*, 2007; Evan *et al.*, 2009), especialmente em células depletadas de fatores de sobrevivência e em estresse; e seu mecanismo de auto-regulação negativa (Facchini *et al.*, 1997).

A desregulação de *c-Myc*, definida como um aumento inapropriado e não fisiológico em sua atividade, é encontrada em torno de 30% de todos os casos de câncer humano (Vita & Herikson, 2006), principalmente em tumores de mama, cólon, pâncreas, carcinomas cervicais, de pulmão, osteosarcomas, glioblastomas e leucemias mielóides (Marcu *et al.*, 1992; Facchini & Penn, 1998; Smith *et al.*, 2005; Arvanitis & Felsher, 2006; Buchholz *et al.*, 2006; Vita & Henriksson, 2006). Tal desregulação pode ocorrer através de alterações epigenéticas, amplificações, translocações cromossômicas, mutações em seu promotor ou mutações em sua própria proteína (Marcu *et al.*, 1992; Facchini & Penn, 1998; Arvanitis & Felsher, 2006). Esses mecanismos podem resultar no rompimento da ligação de um regulador negativo e no aumento da atividade específica do polipeptídeo (Facchini & Penn, 1998). *c-Myc* contribui para a tumorigênese através da promoção da proliferação descontrolada (Eisenman, 2001) e também por exercer efeitos na adesão celular, metabolismo, angiogênese (Knies-Bamforth *et al.*, 2004) e instabilidade genômica (Marcu *et al.*, 1992; Facchini & Penn, 1998). Tumores com expressão desregulada de *c-Myc* são clinicamente mais agressivos e com pior prognóstico (Arvanitis & Felsher, 2006) sendo de suma importância caracterizar os reguladores envolvidos nesse processo.

1.2.2.3 NFAT e *c-Myc*

Até aqui, já foram abordadas diferentes situações onde o NFAT regula, pelo menos indiretamente, a expressão de *c-Myc*. Ao longo do desenvolvimento desse trabalho, vários artigos demonstraram a ligação tanto de NFAT1 quanto de NFAT2 a um elemento NFAT localizado no promotor mínimo de *c-Myc*, entre os dois principais inícios de transcrição (P1 and P2) (Buchholz *et al.*, 2006; Koenig *et al.*, 2010; Pham *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010). Contudo, com exceção do trabalho de Buchholz *et al.* (2006), que investigou somente a função do NFAT2, nenhum dos outros trabalhos avaliou a regulação do promotor completo de *c-Myc* pelos NFATs. Invés disso, apenas a transativação de um elemento de ~ 20 pb foi analisada. Assim, não é possível concluir sobre a importância desse sítio proximal para a transativação mediada pelo NFAT1 no contexto do promotor completo.

A regulação do promotor de *c-Myc* é complexa e ainda pouco compreendida, envolvendo redundância, *feedbacks* e sendo altamente dependente do contexto e do tipo celular (Wiestra & Alves, 2008). Centenas de sinais, fatores de transcrição e componentes da cromatina regulam os níveis celulares do mRNA de *c-Myc* (Levens, 2008; Levens, 2010). Além disso, a própria organização e dobramento do promotor são importantes para a sua

regulação (Levens, 2010). Da mesma forma, regiões regulatórias distais têm efeitos importantes em sua expressão. Como exemplo, foi mostrado que o dominante negativo da proteína FBP (*Far upstream element-binding protein*), que se liga o elemento FUSE (*far upstream element*) localizado à - 1,5 kb em relação à P1, leva à diminuição da expressão de *c-Myc* endógeno e à parada da proliferação (He *et al.*, 2000).

A presença de elementos regulatórios distais é uma característica geral dos genes alvo de NFAT (Hogan *et al.*, 2003; Avni *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2004). No entanto, além do sítio NFAT localizado no promotor mínimo de *c-Myc*, não existem estudos avaliando a ligação e a função do NFAT1 a outras regiões do promotor, nos 2,5 kb *upstream* do seu início de transcrição, onde elementos essenciais para a regulação de *c-Myc* estão localizados. NFAT e *c-Myc* controlam os mesmos processos críticos para a homeostasia celular e muitas vezes estão desregulados nos mesmos tipos de câncer. Apesar de serem conhecidos diversos mecanismos genéticos que levam à desregulação de *c-Myc*, muitas vezes a causa dela está na ativação aberrante de vias de sinalização e de fatores de transcrição que regulam o promotor de *c-Myc* (Vita & Herikson, 2006; Wierstra & Alves, 2008; Evan *et al.*, 2009). O NFAT é um forte candidato nesse processo.

1.2.3 Coativadores e correpressores transcrpcionais

A presença de domínios de interação proteína-proteína encontrados nos TFs dita em grande parte qual será seu efeito na transcrição, uma vez que o fenótipo induzido por um TF varia de acordo com a proteína parceira com a qual o TF está formando esse dímero (Wray *et al.*, 2003). Como dito anteriormente, através dos domínios de ativação ou repressão da transcrição, os TFs interagem com outros fatores de transcrição, cofatores, e/ou proteínas envolvidas na acessibilidade ou no silenciamento da cromatina (Wray *et al.*, 2003, Ganss & Jheon, 2004).

Em relação aos cofatores (ou corre reguladores) transcrpcionais, eles exercem suas funções na regulação da transcrição através de diferentes mecanismos de ação:

i. Os cofatores transcrpcionais recrutam ou carregam a atividade de histonas acetiltransferases (HATs, *histone acetyltransferases*) ou de histonas deacetilases (HDACs, *histone deacetylases*), agindo como coativadores ou correpressores, respectivamente (Burke & Baniahmad, 2000; Naar *et al.*, 2001; Goodson *et al.*, 2005).

O empacotamento do DNA na cromatina tem conseqüências importantes para a regulação gênica (Ito *et al.*, 2000). A transição da cromatina para o estado ativo requer a ação

de ativadores transcricionais de ligação ao DNA, complexos remodeladores de cromatina e HATs (Blobel, 2000; Ito *et al.*, 2000; Iyer *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007), os quais levam à perda ou ao movimento dos nucleossomos e ao aumento de acetilação das histonas (Clapier *et al.*, 2009). Todas essas modificações tornam os elementos nucleossomais de DNA mais acessíveis para os fatores de transcrição (Blobel, 2000; Li *et al.*, 2007). Por outro lado, a inativação e o silenciamento da cromatina envolvem a ação de DNA metiltransferases e HDACs, que tornam a estrutura da cromatina mais compacta e inacessível. As modificações da cromatina e seus mecanismos de ação durante a ativação e repressão da transcrição estão abordadas no apêndice 9.2.1.

As fosfoproteínas nucleares CBP e p300 são exemplos de coativadores que acetilam todas as histonas *in vitro* (Iyer *et al.*, 2004). Além das histonas, elas também modificam diversos fatores de transcrição, como E2F, p53 e GATA1 (Acharya *et al.*, 2005; Blobel, 2000; Chan & La Thangue., 2001). Essas modificações aumentam a atividade de ligação ao DNA desses TFs (Acharya *et al.*, 2005; Gallinari *et al.*, 2007; Roperio *et al.*, 2007), possivelmente por criar uma superfície que facilita o reconhecimento proteína-DNA (Chan & La Thangue, 2001; Iyer *et al.*, 2004).

ii. Os cofatores também podem funcionar como arcabouços proteicos para modular a transcrição através da montagem de complexos transcricionais (Blobel, 2000).

As fosfoproteínas nucleares CBP e p300 são exemplos de coativadores que têm essa função. As regiões N- e C-terminais de CBP e p300 podem ativar a transcrição, enquanto seu domínio de atividade HAT intrínseco reside na região central. Essa organização modular permite que elas se liguem a outros cofatores transcricionais, aumentando a concentração desses cofatores no ambiente transcricional e facilitando as interações proteína-proteína e DNA-proteína. Os diferentes coativadores usam a cooperatividade e o sinergismo transcricional, permitindo que a combinação deles com poucos ativadores de sinal e tecido específico crie um grande número de complexos regulatórios (Blobel, 2000; Chan & La Thangue, 2001; Iyer *et al.*, 2004).

Os correpressores atuam em analogia com os coativadores, mas com efeitos opostos. O complexo SIN3 envolve interações específicas dos correpressores SIN3A e SIN3B com silenciadores associados à HDACs. SIN3 também está envolvido no silenciamento transcricional mediado pela metilação de DNA. Diversos fatores de transcrição interagem com as proteínas SIN3, como p53 e pRb (Burke & Baniahmad, 2000).

iii. Os coativadores podem recrutar componentes da maquinaria geral de transcrição para o promotor alvo, enquanto os correpressores fazem contatos inibitórios com essa maquinaria e interferem com a montagem do complexo de pré-iniciação (Burke & Baniahmad, 2000; Goodson *et al.*, 2005).

p300/CBP conectam diversos TFs com a maquinaria basal de transcrição através da interação com os componentes TBP, TFIIB, TFIIE e TFIIIF (Chan & La Thangue, 2001; Iyer *et al.*, 2004). Por outro lado, os correpressores SIN3A e SIN3B interagem com TFIIB e TAFs e rompem a interação entre essas duas proteínas, que é necessária para a ativação transcricional (Burke & Baniahmad, 2000).

A associação dos correpressores com os TFs pode resultar no mascaramento do domínio de ativação da transcrição e no desligamento dos coativadores. Nesses casos, a ativação dos TFs é reduzida, podendo levar ao silenciamento gênico. Um exemplo é a modulação da atividade de E2F pela pRb. Na ausência de pRb, E2F age como um ativador transcricional. pRb além de bloquear o domínio de ativação de E2F, também reprime ativamente a transcrição, por recrutar HDAC1 (Burke & Baniahmad, 2000).

Por último, um dado TF pode trocar um complexo coativador por um correpressor e assim converter sua função de um ativador para um repressor da expressão gênica (Burke & Baniahmad, 2000; Goodson *et al.*, 2005).

1.2.3.1 A proteína IRF-2BP2

A família IRF-2BP (*interferon regulatory factor-2 binding protein*) é constituída pelas proteínas nucleares IRF-2BP1 e IRF-2BP2. Essas proteínas foram identificadas em 2003 como correpressoras transcripcionais do fator de transcrição IRF-2 (*interferon regulatory factor-2*), ao qual elas se ligam (Childs & Goodbourn, 2003). A IRF-2 está envolvida na repressão de genes de interferon (IFN) do tipo I, importantes na resposta antiviral, e de vários genes induzidos pelo IFN (Harada *et al.*, 1993). Por outro lado, a IRF-2 também está envolvida na indução de alguns genes, como na ativação transcricional regulada pelo ciclo celular do gene de histona H4 (Vaughan *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2007), ciclina D1 (Wang *et al.*, 2007), ciclina B1, p27^{Kip1} e FasL (Xie *et al.*, 2002).

As proteínas IRF-2BP1/2 contêm dois domínios altamente conservados: um *zinc finger* tipo C4 na porção N-terminal e um RING (*really interesting new gene*) tipo C3HC4 na C-terminal. É através do domínio RING que as IRF-2BP interagem com a IRF-2. A proteína IRF-2BP2 possui duas isoformas: A (584 aas) e B (571 aas), sendo que a isoforma B não

possui 16 aminoácidos na região central da proteína, presentes na isoforma A (Childs & Goodbourn, 2003).

Posteriormente, foi mostrado que IRF-2BP2A é induzida pelo supressor de tumor p53 e que sob estresse genotóxico, a superexpressão de IRF-2BP2 reprime a transativação mediada por p53 de p21^{Cip1} e do gene pró-apoptótico Bax, além de diminuir a percentagem de morte em células de osteosarcoma (Koeppel *et al.*, 2009). Ainda em relação à morte, a IRF-2BP2A foi pescada num ensaio de duplo-híbrido, interagindo com NRIF3 (*nuclear interacting factor 3*), que é um fator pró-apoptótico para células de câncer de mama. Nesse estudo, foi mostrado que a IRF-2BP2A impede a morte celular mediada por NRIF3, aparentemente via ação de SirT1, uma HDAC de classe III (Tinnikov *et al.*, 2009). Mais tarde, o mesmo grupo mostrou que a IRF2-BP2A executa essa função através da repressão do gene pró-apoptótico FASTKD2 (*Fas-activated serine-threonine kinase domain 2*). Interessantemente, mostraram que a IRF-2BP2A é parte de um complexo, que contém, além de IRF-2BP2A, as proteínas IRF-2BP1 e EAP1 (*enhanced and puberty 1*). Esse complexo é estabilizado pelas interações dos *zinc fingers* das três proteínas e é fundamental para a repressão da transcrição mediada pela IRF-2BP2A (Yeung *et al.*, 2011).

Curiosamente, a IRF-2BP2 foi descrita como parte de outro complexo de ligação ao DNA, desta vez ativando a expressão de VEGFA (*vascular endothelial growth factor A*), uma citocina angiogênica importante para a revascularização de músculo isquêmico (Teng *et al.*, 2010). O complexo continha IRF-2BP2, VGLL4 (*vestigial-like 4*) e TEAD (*TEA domain*), sendo o último um fator de transcrição. Esse é o único artigo da literatura que relata a IRF-2BP2 como um coativador, invés de um correpressor transcricional. Este trabalho também mostrou que a IRF-2BP2 é uma proteína nuclear, mas que os níveis proteicos de IRF-2BP2B aumentam após isquemia, quando sua localização se torna parcialmente citoplasmática, sugerindo a presença de um mecanismo que module a translocação nuclear da IRF-2BP2.

Em 2011, o sinal de localização nuclear da IRF-2BP2 foi identificado paralelamente pelo nosso grupo (Carneiro *et al.*, 2011) e por Teng *et al.* (2011). Esse sinal está localizado na região central da proteína, RKRK (R=arginina, K=lisina) (resíduos 355-358 em relação à IRF-2BP2A e 339-342 em relação à IRF-2BP2B). Teng *et al.* (2011) também mostraram que existe uma serina adjacente ao NLS que precisa ser fosforilada para a IRF-2BP2 se localizar no núcleo da célula (Teng *et al.*, 2011). Entretanto, o mecanismo que promove essa fosforilação ainda não foi identificado.

1.2.3.2 NFAT1 e IRF-2BP2

Os domínios de transativação (TAD) N- e C-terminal das proteínas NFAT são as regiões menos conservadas entre as diferentes proteínas da família. Especula-se que os TADs estejam envolvidos na interação com parceiros proteicos específicos e que isso poderia ajudar a explicar as diferenças de fenótipo induzidas pelos diferentes NFATs, que se ligam à mesma sequência de DNA no promotor dos genes que regulam.

Até hoje, as interações identificadas com essas regiões foram com as proteínas CBP/p300 (interação com os NFATs 1 e 2) (Garcia-Rodriguez & Rao; 1998; Avots & Serfling, 1999); com o receptor de estrógeno ER α e ER β (interação com NFAT3) (Zhang & Ye, 2005) e com MEF-2D (*myocyte enhancer factor-2D*, interação com NFAT1) (Blaeser *et al*, 2000; Youn *et al.*, 2000). MEF-2D interage com o TAD-C do NFAT1 (Youn *et al.*, 2000), mas não é capaz de se ligar ao NFAT2 ou ao NFAT3 (Blaeser *et al*, 2000). Assim, MEF-2D é a única proteína identificada que parece interagir especificamente com o NFAT1 via TAD.

Para tentar identificar outros parceiros de interação específicos para o NFAT1, um ensaio de duplo híbrido de leveduras foi realizado em nosso laboratório, utilizando o TAD-C do NFAT1 como isca. 50% dos clones sequenciados correspondiam à isoforma B da proteína IRF-2BP2 (apêndice 9.1.3 - Carneiro *et al.*, 2011). Foi mostrado que a interação IRF-2BP2-NFAT1 ocorre através do domínio RING da IRF-2BP2 e que a IRF-2BP2 interage apenas com a região C-terminal do NFAT1 e não com as regiões conservadas deste fator de transcrição, sugerindo que a interação é realmente específica para o NFAT1 dentro da família NFAT.

Diversos estudos mostraram que as proteínas que se ligam ao NFAT alteram sua atividade transcricional. Uma vez que a IRF-2BP2 já foi descrita tanto como um corepressor quanto como um coativador transcricional, é de grande interesse entender como ela influencia a transcrição mediada pelo NFAT1 e em quais mecanismos fisiológicos a IRF-2BP2 está envolvida.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Os fatores de transcrição da família NFAT regulam seus genes alvo diretamente, via ligação ao DNA ou indiretamente, regulando um primeiro gene que por sua vez se ligará às sequências promotoras do gene em questão, ou ainda funcionando como um coativador ou correpressor para outro fator de transcrição. Neste processo, a ativação ou a repressão da transcrição mediada pelo NFAT pode ser alterada pela interação com diferentes parceiros proteicos. Neste trabalho, iremos investigar se o NFAT1 regula diretamente a expressão do proto-oncogene *c-Myc* e se a função do NFAT1 é alterada pela proteína IRF-2BP2.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o envolvimento do NFAT1 na regulação da expressão de *c-Myc* em linfócitos T CD4;
 - Identificar possíveis elementos de ligação para os fatores de transcrição NFAT no promotor de *c-Myc*;
 - Caracterizar a importância desses elementos na regulação transcricional do gene *c-Myc*.
-
- Estudar o papel da IRF-2BP2 na transcrição de genes diretamente regulados pelo NFAT1;
 - Investigar se este papel é específico para a proteína NFAT1 dentro da família NFAT;
 - Investigar se a função da IRF-2BP2 é via ligação ao DNA;
 - Avaliar a função da superexpressão de IRF-2BP2 na progressão do ciclo e morte celular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos entre 8 e 12 semanas de idade, obtidos do biotério da Coordenação de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (INCA) do Rio de Janeiro. As linhagens utilizadas foram: NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} (Xanthoudakis *et al.*, 1996) e C57Bl/64, utilizados conforme indicado em cada experimento. Os animais foram mantidos conforme as normas estabelecidas pelo “*Guide for the care and use of laboratory animals*” (NIH, *National Institute of Health*).

3.2 PLASMÍDEOS

Os plasmídeos contendo as diferentes regiões do promotor de *c-Myc* humano fusionados ao gene repórter de luciferase (pBV-luc, He *et al.*, 1998), foram cedidos pelo Dr. Bert Vogelstein (Del-1 e Del-2) (He *et al.*, 1998), ou adquiridos da Addgene (www.addgene.org) (Del-6) (Chen *et al.*, 2001) e renomeadas em relação ao início de transcrição de P2 como 2446pb-Luc, -1237pb-Luc e -109pb-Luc, respectivamente. Todas essas construções se estendem até +334 pb do promotor de *c-Myc*. A construção denominada de Fragmento A (FragA-Luc) foi adquirida da Addgene (He *et al.*, 1998) e é a única construção que termina antes do início de transcrição de *c-Myc* (- 2446 bp até - 1237 pb). Os plasmídeos pcDNA3-NFAT2 (Sherman, *et al.*, 1999), pCMVb-p300-HA, e os vetores que contêm as construções repórter de luciferase κ 3-Luc (elemento κ 3 do promotor de TNF- α) (Tsai *et al.*, 1996) e os promotores proximais de IL-2 de IL-4 (Szabo *et al.*, 1993) também foram adquiridos da Addgene. O plasmídeo responsivo à NFAT (3xNFAT), que contém três cópias do sítio distal de ligação para NFAT-AP-1 do promotor de IL-2 foi cedido pela Dra. Anjana Rao (Luo *et al.*, 1996), assim como o vetor de empacotamento pCL-Eco. Os plasmídeos pRL-TK, pRL-CMV e pGL4.30 foram adquiridos da Promega, os plasmídeos pLIREs-EGFP e pLIREs-EGFP-CA-NFAT1 foram construídos em nosso laboratório (Robbs *et al.*, 2008), assim como os plasmídeos pcDNA5-NFAT1 (Carvalho *et al.*, 2007), pcDNA4-NFAT4 e pcDNA4-IRF-2BP2 (Carneiro *et al.*, 2011). Todos os plasmídeos foram transformados; amplificados em bactérias XL1-Blue (Stratagene[®]) e purificados através do kit “Plasmid Maxi Kit” segundo recomendações do fabricante (Qiagen[®]).

3.2.1 Construção de plasmídeos

Os plasmídeos contendo as construções do promotor de *c-Myc* com os sítios de NFAT mutados foram gerados das construções -2446bp-Luc ou -109bp-Luc, como indicado nas figuras, usando o Sistema de Mutagênese Stio Dirigida Gene TaylorTM, conforme recomendações do fabricante (Invitrogen). Os primers diretos utilizados para a mutagênese foram: MutNFATRE 2: 5'TGTCCTTCCCCGCTACT**CA**CTTGACCTCG3'; MutNFATRE 5: 5'TGAGTCAGTGA**ACTCA**TATAATGCCTGG3' e MutNFATRE 7: 5'CTCAGAGGCTTGGCG**ACTCA**AAGAACGGAG3'. Nesses primers, o sítio canônico de ligação para NFAT está em negrito (GGAAA substituído por **ACTCA**). Para gerar o FragA-Mut2,5-Luc, o fragmento gerado da clivagem de -2446bp-Mut2,5-Luc com *SpeI-SacII* foi clonado nos mesmos sítios de restrição do vetor FragA-Luc. Os vetores FragAΔ41-171-Luc, FragAΔ171-891-Luc e FragAΔ891-1219-Luc foram gerados pela deleção das regiões indicadas do plasmídeo FragA-Luc com as enzimas de restrição *AgeI-PstI*, *PstI-SpeI* e *SpeI-SacII*, respectivamente.

Para gerar o vetor pcDNA5-NFAT1ΔC, o cDNA do NFAT1 (aminoácidos 1-698) foi amplificado por PCR (*primer* direto: 5' CTGA **GTCGAC** GCT TCC ACC ATG ATC TTT TAC; *primer* reverso: 5' GTAC **GTCGAC** TTA GCT GCA GAT CAA AGA TGG) e inserido nos sítios de restrição de *HindIII* e *XhoI* do vetor pcDNA5. Para gerar o vetor pcDNA5-NFAT3, o cDNA do NFAT3 foi obtido do vetor pBlueScript-NFAT3 (Graef *et al.*, 1999) com as enzimas de restrição *BamHI* e *NotI* e clonado nos mesmos sítios de restrição do pcDNA5. O vetor pLIREs-EGFP-IRF-2BP2 foi obtido pela digestão do pcDNA4-IRF-2BP2 com as enzimas de restrição *PmeI* e *BamHI*. O fragmento resultante continha o cDNA da IRF-2BP2, que foi inserido nos sítios de restrição de *BglIII* (previamente preenchido com Klenow para se tornar abrupto) e *Sall* do pLIREs-EGFP.

3.3 CULTURA DE CÉLULAS

As culturas primárias de linfócitos murinos e as linhagens celulares HEK293T, de células de rim embrionário humano (cedidas pelo Dr. Bryan Strauss, InCor - São Paulo), NIH3T3 (cedidas pela Dra. Mary Sogayar, USP – São Paulo), de fibroblasto embrionário murino, EcoPack2 ecotrófica (BD-Biosciences) e Phoenix (cedidas pela Dra. Anjana Rao) foram mantidas em meio DMEM (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), NaHCO₃ (40 mM), NaH₂PO₄ (1.0 mM), Piruvato de Sódio (1.0 mM), solução de

vitaminas MEM 1x, solução de aminoácidos MEM essenciais e não-essenciais 1 x, L-glutamina (2.0 mM), β -mercaptoetanol (55 μ M), HEPES (10 mM), penicilina (100.000 U/L) e estreptomicina (100 mg/L) (todos Invitrogen). As células Jurkat, de leucemia de células T humana, foram mantidas em meio RPMI 1640 (Gibco), suplementado com 10% SFB, L-glutamina, β -mercaptoetanol, penicilina e estreptomicina nas mesmas concentrações. As células foram cultivadas em placas ou garrafas de cultura e mantidas a 37°C e 5% de CO₂ em estufa, durante os tempos indicados.

3.4 PURIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4

Linfonodos totais (inguinais, braquiais, axilares e cervicais superficiais) foram isolados dos animais *naïves* e dissociados em uma suspensão celular. A população de linfócitos T CD4 foi purificada através do kit de purificação por seleção negativa de CD4 da Dynal[®], conforme as instruções do fabricante. Posteriormente, as células foram marcadas com os anticorpos anti-B220-FITC (RA3-6B2) e anti-CD3-PE (2C11); anti-CD4-PE (GK1.5) e anti-CD8-FITC (53.6-7) (BD Pharmingen) por 15 minutos no escuro e analisadas por citometria de fluxo (FACScan, Becton Dickinson) para avaliar o grau de pureza das mesmas. Em todos os experimentos, a frequência de linfócitos T CD4 após a purificação ficou acima de 90 %.

3.5 DIFERENCIAÇÃO TH1

Após a purificação das células CD4, como descrito no subitem 3.4, os linfócitos foram diferenciados para o fenótipo Th1 como descrito previamente (Carvalho *et al.*, 2007). Brevemente, 2 x 10⁶ células/poço iniciais foram mantidas por 7 dias com estímulo *in vitro* de anti-CD3 (1 μ g/mL - 2C11) e anti-CD28 (1 μ g/mL, 37.51, BD Biosciences) em placas de 6 poços, pré-tratadas com anti-IgG (0.3 mg/mL, MD Biomedicals) por 1 hora a 37°C e mantidas com anti-IL-4 (10 μ g/mL, PeproTech), IL-12 (20 U/mL, PeproTech). Passado os sete dias, as células foram lavadas, mantidas sem estímulo por duas horas e depois mantidas sem estímulo ou re-estimuladas por quatro horas com PMA (10 nM, Calbiochem) e ionomicina (1 μ M, Calbiochem).

3.6 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA

Os linfócitos T CD4 (10⁶ céls/mL) recém-purificados foram estimulados *in vitro* com anti-CD3 (1 μ g/mL), na ausência ou na presença de ciclosporina A (1 μ M, LC Laboratories[®]),

em placas de cultura de 24 poços, pré-tratadas com anti-IgG (0,3 mg/mL) por 1 hora a 37°C. Quando houve adição de ciclosporina A, ela foi fornecida 15 minutos antes do estímulo de anti-CD3. Para os experimentos com a linhagem celular NIH3T3, as células foram transduzidas e mantidas em confluência em meio sem soro como descrito no subitem 3.15.2.2. Após esse período, as células foram plaqueadas em placas de 10 cm em meio DMEM com 10% de SFB. Nos tempos indicados em cada experimento, o RNA total foi extraído com o reagente TRIzol® (Invitrogen), conforme indicações do fabricante (4 poços/ponto para os linfócitos e 5 x 10⁶ células para as NIH3T3). A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada com a Transcriptase Reversa SuperScript™ III (Invitrogen), como recomendado pelo fabricante. A reação de PCR subsequente foi realizada a 50°C por uma hora, seguida de 70°C por 15 minutos.

3.7 PCR EM TEMPO REAL

A expressão do mRNA dos genes de *c-Myc*, *ciclina D1*, *E2* e *A2* foi determinada através do método de quantificação relativa em relação a um controle endógeno (gene constitutivo). Para as estimativas da expressão diferencial, a metodologia de PCR em Tempo Real foi utilizada. As sondas utilizadas foram adquiridas da Applied Biosystems (Mm00487804_m1, para a detecção do mRNA de *c-Myc*, Mm00432359_m1 para *ciclina D1*, Mm00438071_M1 para *ciclina D2*, Mm00438077_m1 para *ciclina E2* e Mm00438064_m1 para *ciclina A2*), sendo o gene constitutivo Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT), usado como normalizador (Mm00446968_m1).

As reações foram realizadas em duplicata, num volume final de 10 µl, sendo: 1 µl de cDNA (aproximadamente 3 ng), 3,5 µl de água Milli-Q estéril, 5 µl do tampão Universal PCR Mastermix TaqMan® (Applied Biosystems) e 0,5 µl da respectiva sonda TaqMan® (contendo o par de *primer* para a amplificação do cDNA e um oligonucleotídeo que parecia internamente à região amplificada, marcado com o fluorocromo FAM na extremidade 5' e com o TAMRA na extremidade 3'). As condições utilizadas para a PCR foram: 95° C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 5 segundos, 60°C por 35 segundos e leitura da placa (termociclador MJ Research PTC-200/BIORAD® ou 7500 Real Time PCR System/Applied Biosystems).

Para a quantificação da expressão relativa, o algoritmo ΔC_T foi utilizado:

$$\Delta C_T = C_T^{gene\ alvo\ no\ tempo\ X} - C_T^{gene\ constitutivo\ no\ tempo\ X}$$

Onde:

C_T = Ciclo de amplificação no qual a amostra ultrapassa um determinado limiar (*threshold*), onde todas as amostras estão em fase de crescimento exponencial.

A relação que expressa quantas vezes o mRNA do gene alvo é mais ou menos expresso em função do tempo é dada pela função exponencial $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T^{\text{notempo de indução}} - \Delta C_T^{\text{notempo de referência}}$$

Em todos os resultados, o tempo de referência foi sempre o de 0 h.

3.8 EXTRAÇÃO NUCLEAR DE CÉLULAS HEK293T

$1,5 \times 10^6$ células foram plaqueadas em placas de Petri tratadas de 10 cm de diâmetro. 24 h depois, essas células foram transfectadas com 15 μ g dos vetores pLIREs-EGFP ou pLIREs-EGFP-IRF-2BP2 por precipitação por fosfato de cálcio, conforme descrito no subitem 3.15.1. 24 h após a transfecção, as placas foram lavadas duas vezes com PBS 1X. Passadas mais 24 h, as células foram soltas por tripsinização, lavadas com PBS 1X mais 0,1% de BSA (*bovine serum albumin*) e ressuspensas em 900 μ L de tampão hipotônico RSB 1X gelado (Tris 10 mM, pH 7,4; NaCl 10 mM; $MgCl_2$ 3 mM e NaN_3 0,002%) com os inibidores de protease DTT (0,5 mM), leupeptina (20 μ M), aprotinina (10 μ g/mL), PMSF (1 mM) e com 0,1 mM de EGTA. Após a ressuspensão neste tampão, 10 μ L de NP-40 a 5% foram adicionados para ocorrer a lise da membrana plasmática. Após centrifugação, os núcleos celulares foram ressuspensos em 300 μ L do tampão C (HEPES 20 mM, pH 7,4; NaCl 0,42 M; $MgCl_2$ 1,5 mM, EDTA 0,2 mM; 25% de glicerol e 0,01% de NaN_3), acrescido dos mesmos inibidores de protease. Após incubação no gelo por 30 min e centrifugação por 10 min à velocidade máxima, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e o mesmo volume de tampão D (HEPES 20 mM, pH 7,4; KCl 50 mM; EDTA 0,2 mM; 20% de glicerol e 0,01% de NaN_3) com inibidores de protease. As amostras foram armazenadas a -80°C e posteriormente dosadas pelo método de Lowry adaptado (DC *protein assay*, BIORAD).

3.9 WESTERN BLOT

Os linfócitos T CD4 foram purificados conforme descrito no item 3.4. Em seguida, foram estimulados *in vitro* com anti-CD3 (1 μ g/mL) em placas de 24 poços pré-tratadas com anti-IgG (0,3 mg/mL) por 1 hora a 37°C . Nos tempos indicados, as células foram

centrifugadas (3 poços) e ressuspensas em 20 µL de tampão de ressuspensão (40 mM Tris pH 7,4; 10 mM EDTA pH 8,0; 60 mM Pirofosfato de Sódio). Em seguida, 20 µL de SDS 10% e 10 µL do tampão de carregamento (100 mM Tris-HCl pH 6,8; 200 mM ditiotreitol; SDS 4%; azul de bromofenol 0.2% e glicerol 0.2%) foram adicionados e as amostras foram aquecidas a 100°C por 15 minutos e estocadas a -80°C. Para a extração proteica de células NIH3T3 transduzidas com retrovírus (subitem 3.15.2.2), as células foram cultivadas em placas de 10 cm de diâmetro e, nos tempos indicados, essas células foram soltas por tripsinização (5×10^5 células por ponto) e ressuspensas em tampão de ressuspensão com 10% de SDS como indicado acima. Para a análise de células HEK293T transfectadas (subitem 3.8), foram utilizadas 100 µg de proteína nuclear.

Os extratos protéicos totais (para linfócitos T CD4 e células NIH3T3) ou nucleares (para células HEK293T) foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 8% (30% bis-acrilamida (1:29) e tampão de separação 4x pH 8,8) a 25 mA por aproximadamente 4 horas. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioAgency) a 15 volts por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com TBS 1x (10 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl) e 5% de leite desnatado em pó por 1 hora sob agitação à temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas *overnight* ou com o anticorpo primário anti-*c-Myc* (N262, Santa Cruz, 1:350), ou com anti-IRF-2BP2 (sc-13675, Santa Cruz, 1:1000) ou por duas horas com o anticorpo primário policlonal anti-actina (A3853, Sigma, 1:2000) ou anti-67.1 (anti-NFAT1, cedido pela Dra. Anjana Rao), em TBST (TBS 1x; Tween-20 0,05%). Após incubação, a membrana foi lavada 3 vezes com TBST por 10 minutos e incubada com anticorpo secundário na diluição de 1:15000 - anti-IgG de coelho ou 1:5000 anti-IgG de camundongo, ambos conjugado à peroxidase (HRP) (adquiridos juntamente com o kit ECL western blotting analysis system – GE Healthcare), por 1 hora. As membranas foram lavadas 5 vezes com TBST por 10 minutos e a revelação foi realizada com o kit ECLTM western blotting analysis system conforme especificações do fabricante (GE Healthcare). A membrana foi exposta a um filme de raio-X (GE Healthcare) e revelada por autoradiografia (Kodak X-OMAT 2000 Processor).

3.10 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

As sequências genômicas dos promotores do gene *c-Myc* de *Homo sapiens* e de *Mus musculus* (todo o primeiro éxon e - 3.000 pb à 5 dele) foram obtidas através do banco de

dados do ENSEMBL (European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute and the Sanger Institute) (<http://www.ensembl.org>, em 15 de novembro de 2005). As sequências em formato fasta foram alinhadas pelo software zPicture (<http://zpicture.dcode.org>, em 17 de novembro de 2005) e o resultado foi exportado diretamente através do link “rVista: 2.0 portal”, para o site rVista (<http://www.rvista.dcode.org>), para análise quanto à localização de supostos sítios de ligação para o fator de transcrição NFAT nesses promotores. A mesma busca por supostos sítios de ligação foi realizada, agora com as sequências individuais, também em formato fasta, através do software MatInspector versão 6.0, através do site do Genomatix (<http://www.genomatix.de/products/MatInspector>, em 18 de Janeiro de 2006). Para fazer uso do software, deve-se criar um login no site, clicando em “*access*” e “*evaluation account*”.

3.11 PURIFICAÇÃO DO DBD DA PROTEÍNA NFAT1

O domínio de ligação ao DNA (DBD, aminoácidos 1-297) da proteína NFAT1 recombinante foi previamente clonado no sistema da QIAexpressionistTM (Qiagen), em bactérias M15 (Qiagen) e cedido pelo laboratório da Dra. Anjana Rao (Harvard University). Estas bactérias foram expandidas e o DBD purificado sob condições nativas, com auxílio de colunas “Ni-NTA spin columns” (QIAGEN, nº catálogo 31014), conforme recomendações do fabricante. As proteínas foram eluídas no tampão de eluição (50 mM Tris-Cl pH 8,0; 100 mM NaCl e 300 mM de Imidazol) em 3 centrifugações: a primeira de 180 µL e as duas últimas de 90 µL. As proteínas foram dosadas pelo método de Lowry adaptado e submetidas à eletroforese em gel de acrilamida desnaturante 12% (Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1); Bio-Rad) por 4 h a 25 mA. O gel foi corado por 2 h com Solução de Coomassie Blue (0,05% Coomassie Blue, 45% Metanol e 10% Ácido Acético Glacial) e descorado por 3 h com Solução Descorante (40% Metanol (CH₃OH) Ácido Acético Glacial (CH₃COOH)). As 3 alíquotas originais foram unidas e congeladas a -80°C em alíquotas menores de 20 µL cada.

3.12 ENSAIO DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA (EMSA)

Diferentes oligonucleotídeos (IDT, Integrated DNA Technologies) foram utilizados durante a execução desse trabalho. A sequência de cada uma dessas sondas está demonstrada a seguir, onde:

Sete sondas foram desenhadas a partir da sequência promotora do gene *c-Myc* de *Mus musculus* obtida do Ensembl:

NFATRE 1:	Senso	5' TGA ACC ATT TTT TTC TCT AGT AAT T 3'
	Anti-senso	5' AAT TAC TAG AGA AAA AAA TGG TTC A 3'
NFATRE 2:	Senso	5' CCC AGA ACC TGG AAA CCC TGC AGC C 3'
	Anti-senso	5' GGC TGC AGG GTT TCC AGG TTC TGG G 3'
NFATRE 3:	Senso	5' GAG GGG GCG GGG AAA GAG TCT CTG C 3'
	Anti-senso	5' GCA GAG ACT CTT TCC CCG CCC CCT C 3'
NFATRE 4:	Senso	5' ATC CTA AAT TGC AAA CTC AGT GGC T 3'
	Anti-senso	5' AGC CAC TGA GTT TGC AAT TTA GGA T 3'
NFATRE 5:	Senso	5' AAA GGA AAC TGG GAA ATT AAT GTA T 3'
	Anti-senso	5' ATA CAT TAA TTT CCC AGT TTC CTT T 3'
NFATRE 6:	Senso	5' TAA TAA AAG GGG AAA GCT TGG GTT T 3'
	Anti-senso	5' AAA CCC AAG CTT TCC CCT TTT ATT A 3'
NFATRE 7:	Senso	5' ACG CTT GGC GGG AAA AAG AAG GGA G 3'
	Anti-senso	5' ATC CCT TCT TTT TCC CGC CAA GCG T 3'

Três dessas sondas foram mutadas no núcleo canônico de ligação para o NFAT (**GGAAA→ACTCA**):

NFATRE 1 mut:	Senso	5' CCC AGA ACC TAC TCA CCC TGC AGC C 3'
	Anti-senso	5' GGC TGC AGG GTG AGT AGG TTC TGG G 3'
NFATRE 2 mut:	Senso	5' AAA GGA AAC TGA CTC ATT AAT GTA T 3'
	Anti-senso	5' ATA CAT TAA TGA GTC AGT TTC CTT T 3'
NFATRE 7 mut:	Senso	5' ACG CTT GGC GAC TCA AAG AAG GGA G 3'
	Anti-senso	5' CTC CCT TCT TTG AGT CGC CAA GCG T 3'

A sequência consenso de ligação para o NFAT no promotor de IL-2 (Jain *et al.*, 1992) foi utilizada como controle positivo para a ligação de NFAT e como teste para averiguar a ligação da proteína IRF-2BP2 ao DNA:

Sonda consenso de NFAT no promotor de IL-2 murino:

Senso	5' GCC CAA AGA GGA AAA TTT GTT TCA TAC AG 3'
Anti-senso	5' CTG TAT GAA ACA AAT TTT CCT CTT TGG GC 3'

Ainda para verificar a ligação da proteína IRF-2BP2 ao DNA, outras duas sondas foram desenhadas a partir da sonda selvagem de IL-2:

Extensão 5' da sonda consenso de IL-2:

Senso 5' AGT TAC TTT TGT GTC TCC ACC CCA AAG **AGG AAA** 3'

Anti-senso 5' **TTT CCT** CTT TGG GGT GGA GAC ACA AAA GTA ACT 3'

Extensão 3' da sonda consenso de IL-2:

Senso 5' AAA ATT TGT TTC ATA CAG AAG GCG TTC ATT GTA 3'

Anti-senso 5' TAC AAT GAA CGC CTT CTG TAT GAA ACA AAT TTT 3'

Os oligonucleotídeos liofilizados foram reconstituídos em água Milli-Q autoclavada (10 µg/µL). Posteriormente, 2,5 µg de cada oligonucleotídeo (senso com seu respectivo anti-senso) foram ressuspensos em 50 µL de tampão de hibridação (Tris 10 mM pH 7.5 e NaCl 50 mM), desnaturados por 10 min a 95°C e resfriados lentamente por 12 h à temperatura ambiente. Para a marcação radioativa, 50 ng de cada par de oligonucleotídeo anelado foram incubados com a enzima T4 polinucleotídeo quinase (10 U; New England Biolabs) na presença de 50 µCi do [$\gamma^{32}\text{P}$] dATP (Amersham Biosciences) em um volume final de 20 µL, por 1 h, a 37°C. Após a marcação, a reação foi inativada por 10 min a 65°C e as sondas foram purificadas em colunas MicroSpin™ G-25, conforme especificações do fabricante (GE Healthcare).

A reação de EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) foi realizada com quantidades crescentes do DBD da proteína NFAT1 recombinante (Para a sonda de IL-2: 10 nM, 100nM e 1 µM, respectivamente e para os oligos de *c-Myc*: 100nM, 500 nM e 1 µM, respectivamente) ou, na segunda etapa do projeto, com 8 µg do extrato proteico de células HEK293T transfectadas com pLIREs, pLIREs-CA-NFAT1 ou pLIREs-IRF-2BP2. As proteínas recombinantes ou os extratos proteicos foram incubados com as sondas radioativas indicadas (20.000 CPMs), por 20 min à temperatura ambiente, na presença do tampão de reação de EMSA (HEPES 10 mM pH 7.0; NaCl 125 mM; Glicerol 10%; DTT 0.25 mM e BSA 0.8 mg/mL) e 0.2 µg/reação de poli(dI:dC) (Amersham Biosciences), em um volume final de 20 µL. Os complexos DNA-proteína foram analisados por eletroforese em gel de poli(acrilamida não-desnaturante 4% (Acrilamida/Bis-acrilamida (19:1); Bio-Rad) em tampão TBE 1x (Tris 90 mM; Ácido Bórico 90 mM; EDTA 2.0 mM pH 8.0). Primeiramente, o gel foi submetido a 100 V por 1 h (pré-corrida). Em seguida, as amostras foram aplicadas e a eletroforese foi

realizada a 200 V por mais 1 h. O gel foi transferido para papel de filtro (Whatman) e seco a vácuo por 2 horas a 75°C (Heto Dry GD-1, Heto Lab Equipment). Na primeira etapa do projeto, o papel de filtro foi posteriormente exposto a um filme de raio-X (Kodak BioMax MS) por 4 h e revelado por autoradiografia (Kodak X-OMAT 2000 Processor). Na segunda etapa do projeto, quando os extratos proteicos de HEK293T foram utilizados, o papel de filtro foi exposto ao “*storage phosphor screen*” (GE Healthcare) overnight e revelado por scanner (Storm 865 – GE Healthcare).

3.13 ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA (CHIP)

Após a diferenciação para o fenótipo Th1 (subitem 3.5), os linfócitos foram cultivados por mais por 4 h sem estímulo, ou foram estimulados *in vitro* com o éster de forbol PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*, 10 nM) e com o ionóforo de cálcio ionomicina (1.0 µM) (ambos da Calbiochem^(R)), conforme indicado. Após o estímulo, as células foram fixadas por 20 min à temperatura ambiente (HEPES 5.0 mM pH 7,5; NaCl 10 mM; EDTA 0.1 mM; EGTA 0.05 mM; paraformaldeído 1,1%). A reação foi neutralizada com a adição de glicina (125 mM) por 5 minutos a 4°C. As células foram lavadas 2 x com PBS 1x a 4°C. Em seguida, foram incubadas com as soluções I (HEPES 10 mM pH 7,5; EDTA 10 mM; EGTA 0,5 mM; Triton X-100 0,75%) e II (HEPES 10 mM pH 7,5; NaCl 200 mM; EDTA 1.0 mM; EGTA 0,5 mM), respectivamente, por 10 min a 4°C com agitação. O extrato nuclear foi ressuspensionado e lisado em 1 mL do tampão de lise (Tris 25 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; Triton X-100 1%; SDS 0,1%; Desoxicolato 0,5%; Leupeptina 50 µM; Aprotinina 50 µM; PMSF 1 mM). A cromatina foi sonicada entre 10-15 vezes, por 20 segundos a 4°C, com intervalos de 1 min entre cada pulso de sonicação (550 Sonic Dismembrator, Fisher Scientific). Após a sonicação, o tamanho dos fragmentos de cromatina (~ 300-500 pb) foi verificado em gel de agarose 2%. A cromatina foi separada do precipitado celular por centrifugação (2 x por 5 min à velocidade máxima e 4°C) e o sobrenadante foi recuperado depois de cada etapa de centrifugação. Uma alíquota de cada amostra foi retirada, estocada a 4°C e referida como controle positivo do experimento (INPUT). A cromatina foi incubada com contas de sefarose por 2 h a 4°C sob agitação, segundo especificações do fabricante (Protein A SepharoseTM CL-4B, Amersham Biosciences). Em seguida, as contas de sefarose foram centrifugadas 2 x a 1.100 g por 5 min à temperatura ambiente e o sobrenadante (cromatina fragmentada) foi recuperado depois de cada etapa de centrifugação. A cromatina foi incubada na ausência ou na presença dos

anticorpos de interesse por 16 h a 4°C sob agitação. Os seguintes anticorpos foram utilizados: anti-NFAT1 (15 µg de anti-67.1 e 50 µg de anti-T2B1) e anti-histona H4 acetilada (5.0 µg de anti-H4ac, Upstate Biotechnology). No dia seguinte, a cromatina foi imunoprecipitada, na presença de contas de sefarose por 3 h a 4°C sob agitação. O imunoprecipitado foi centrifugado a 3.000 g por 5 min à temperatura ambiente e lavado exaustivamente com diversos tampões conforme descrito (Ansel *et al.*, 2004). O imunoprecipitado foi tratado com RNase A (50 µg/mL; Sigma-Aldrich) por 30 min a 37°C, seguido de tratamento com proteinase K (0,2 mg/mL; Roche), por 4 h a 50°C. A cromatina foi separada das contas de sefarose em incubação por 16 h a 65°C. No dia seguinte, a cromatina foi purificada por extração com fenol-clorofórmio e precipitada com etanol conforme descrito (Sambrook *et al.*, 1989). Finalmente, a cromatina foi ressuspensa em TE 1x (Tris 10 mM pH 8,0; EDTA 0,1 mM) e estocada a - 20°C.

Os *primers* (IDT, Integrated DNA Technologies) foram desenhados de forma que amplificassem, no promotor de *c-Myc* murino, as regiões que contêm os supostos sítios de ligação para NFAT identificados no presente trabalho, no ensaio de EMSA. Estes *primers* foram designados de acordo com a posição de tais sítios no promotor. São eles:

Primer 1:	Senso	5' CCC CAT CCA CAA CTA GGG CTC TG 3'
	Anti-senso	5' AAC GAG GGC GGA GGT CGG ATG G 3'
Primer 2:	Senso	5' AGG AGT GAA TTG CCA ACC CAG A 3'
	Anti-senso	5' GGA TTG TAC AGA ATG CAC AGC GT 3'
Primer 3:	Senso	5' AGC TGC CGG GTC CGA CTC GCC TCA 3'
	Anti-senso	5' ACA CGG CTC TTC CAA CCG TCC GCT CA 3'

Também foram utilizados *primers* que amplificassem as regiões de ligação ao NFAT previamente descritas, nos promotores de IFN-γ (Avni *et al.*, 2002) e de IL-4 murinos:

IFN-γ:	Senso	5' GCT CTG TGG ATG AGA AAT 3'
	Anti-senso	5' AAG ATG GTG ACA GAT AGG 3'
IL-4:	Senso	5' AAG AAT AGT CTG AAA GGC C 3'
	Anti-senso	5' TCA AGA GAT GCT AAC AAT GC 3'

As condições utilizadas na PCR foram as seguintes: 95°C por 3 min; 28 (-2125 pb e -1356 pb) ou 26 (+98 pb, IFN-γ, IL-4) ciclos de 95°C por 30 segundos, 48°C (IL-4 e IFN-γ), 55°C (-1356 pb), 61°C (-2125 pb) ou 62°C (+98 pb) por 45 segundos, 72°C por 1 min; e extensão final de 72°C por 8 min. Os produtos de PCR foram submetidos a uma eletroforese

em gel de agarose 1,5% e visualizados com Brometo de Etídeo (0.5 µg/mL), em transiluminador ultravioleta (Eagle EyeTM II, Stratagene[®]).

3.14 ENSAIOS DE TRANSATIVAÇÃO

Para a transfecção de células HEK293T, $1,5 \times 10^5$ células foram plaqueadas placas de 6 poços com 2 mL de meio DMEM 10%. 24 h depois, as células foram cotransfectadas pelo método de transfecção por fosfato de cálcio com 0,3 µg do plasmídeo de luciferase, 3 µg de pLIREs/CA-NFAT1 e 0,03 µg de pRL-TK. Nos ensaios com p300, as concentrações de DNA foram: 5 µg de p300, 0,1 µg do plasmídeo de luciferase, 1 µg de pLIREs e 0,01 µg de pRL-TK. Para a transfecção, o DNA foi misturado com CaCl₂ (2,5 mM) e água deionizada para completar o volume de 150 µL. Em outro poço, 150 µL do tampão salino HBS 2x (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 12 mM dextrose, 50 mM HEPES pH 7,1) foi borbulhada com pipeta de 5 mL enquanto a mistura de DNA, água e CaCl₂ era adicionada sobre o HBS 2x. Essa mistura foi incubada no fluxo laminar por 30 min e, após esse período, 200 µL dessa mistura foram gentilmente dispensadas nos poços contendo as células. Após 24 h de transfecção, as células foram lavadas duas vezes com 1 mL de PBS 1x e depois 2mL do meio de cultura DMEM sem soro foram adicionados em cada poço. Passadas mais 24 h, as células foram lisadas com 100 µL do tampão de lise “passive lysis buffer” (Luciferase Assay System, Promega), por 15 minutos. 15 µL deste extrato foram utilizados para leitura de luciferase (luminômetro VeritasTM Microplate Luminometer, Turner Biosystems). A leitura de luciferase foi normalizada pela de renilla.

Para a transfecção de células Jurkat, 3×10^6 cels foram eletroporadas (950 µF e 250 mV) em cubetas de 0.4 cm (Gene Pulser[®] Cuvette, Bio-Rad) em um volume final de 600 µL de meio RPMI sem soro fetal bovino, com 8 µg de cada um dos vetores vazios, 8 µg de pcDNA5-NFAT1, pcDNA5-NFAT1ΔC, pcDNA3-NFAT2, e 0,5 à 8 µg de pcDNA4-IRF-2BP2, como indicado nas legendas das figuras; 1 µg dos plasmídeos repórter de firefly luciferase: 3xNFAT-Luc, pGL4.30, 6xNFκB-Luc, κ3-Luc (TNF-α), ou promotor proximal de IL-2 ou de IL-4, conforme indicado e 0,1 µg do plasmídeo de renilla (pRL-TK, Promega). Após a eletroporação, as células foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e depois avolumadas para 3 mL com RPMI suplementado com 10% soro fetal bovino e plaqueadas em placas de 6 poços. Passadas 24 horas, as células foram estimuladas com PMA (10 nM) e ionomicina (1 µM) por 6 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas,

lavadas com PBS 1x e lisadas com 50 µL do tampão de lise “passive lysis buffer” (Promega), por 15 minutos (Luciferase Assay System; Promega). 20 µL deste extrato foram utilizados para leitura de luciferase, como descrito acima para células HEK293T transfectadas.

3.15 TRANSDUÇÃO RETROVIRAL

3.15.1 Produção de retrovírus recombinantes

Para gerar os retrovírus, as linhagens celulares empacotadoras EcoPack (utilizadas para a infecção das células NIH3T3) ou Phoenix (para a infecção de linfócitos CD4 primários) foram transfectadas por precipitação por fosfato de cálcio conforme descrito a seguir: No primeiro dia, as células empacotadoras foram cultivadas em placas de Petri tratadas de 10 cm de diâmetro no total de 4×10^6 células/placa em 10mL de meio de cultura. No dia seguinte, estas células foram transfectadas com fosfato de cálcio conforme descrito no subitem 3.14, mas perfazendo um volume total de 500 µL por placa de 10 cm e 20 µg dos vetores pLIREs-EGFP ou pLIREs-EGFP-IRF-2BP2. Para a transfecção das células Phoenix, ainda foram utilizados 7,5 µg do plasmídeo pCL-Eco. No terceiro dia, as células empacotadoras transfectadas foram lavadas duas vezes com PBS e adicionadas de 5,5 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino definido (Hyclone). No dia seguinte, o sobrenadante das mesmas células, que continham os retrovírus recombinantes, foram recolhidos, centrifugados por 5 minutos a 500 rcf e utilizados para a infecção das células alvo.

3.15.2 Infecção das células alvo

3.15.2.1 Linfócitos T CD4 primários

Os linfócitos T CD4 foram purificados conforme descrito no subitem 3.4. Em seguida, 1×10^6 células/poço da placa de 12 poços foram estimuladas por 48 h com anti-CD3 (1 µg/mL) e anti-CD28 (1 µg/mL) aderidos à placa. Passadas as 48 h, no dia da transdução retroviral, o sobrenadante contendo os retrovírus produzidos nas células Phoenix (subitem 3.15.1) foi concentrado por centrifugação utilizando colunas Amicon Ultracel 50 K (Millipore) (3 passos de centrifugação a 4.000 rpm, cuidando para a coluna não secar). Para cada poço de linfócitos a ser transduzido, utilizou-se o sobrenadante de 2 placas de Phoenix contendo os retrovírus.

O sobrenadante concentrado contendo os retrovírus foi avolumado para 1 mL com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino definido (Hyclone). O meio de cultura dos linfócitos foi recolhido e mantido em estufa à 37°C. Em seu lugar, adicionou-se 1mL do meio contendo o concentrado de retrovírus suplementado com 8 µg/mL de polibreno (Fluka Chemie). As placas contendo os linfócitos foram centrifugadas a 930 g por 90 min à temperatura ambiente. No final da centrifugação, adicionou-se o meio de cultura recolhido antes da centrifugação e mais 3 mL de DMEM 10% SFB novo. As células foram incubadas em estufa à 37°C e 5% de CO₂.

3.15.2.2 Células NIH3T3

2,5 x 10⁴ células NIH3T3 foram cultivadas em placas de 6 poços por 24 h, quando foram incubadas com o sobrenadante das células EcoPack2 contendo os retrovírus, junto com meio DMEM novo suplementado com 10% de soro fetal bovino definido (Hyclone) (1:1), suplementados com 8µg/mL de polibreno (Fluka Chemie). As placas contendo as células NIH3T3 foram centrifugadas duas vezes a 380 rcf por 45 minutos, com intervalo de 30 minutos entre as centrifugações. Depois de 24 horas, as células foram soltas por tripsinização e plaqueadas em confluência (125.000 células por poço da placa de 6 poços). Dois dias depois, o sobrenadante dessas células foi recolhido, as placas foram lavadas duas vezes com PBS 1x e adicionou-se 2 mL de meio de cultura DMEM sem soro. Passadas mais 24 h, as células foram soltas por tripsinização e o percentual de transdução foi verificado por citometria de fluxo, pela análise da expressão de EGFP, sendo este momento considerado o ponto zero dos experimentos subsequentes.

3.16 MARCAÇÃO DE CITOCINA INTRACELULAR

Após 18 h da transdução retroviral dos linfócitos T CD4, conforme descrito no subitem 3.15.2.1, 1,5 x 10⁶ células foram estimulados por 6 h com PMA (10 nM) e ionomicina (1 µM) à 37°C e 5% de CO₂. Passadas 4 h, 10 µg/mL de BD Golgi Stop (BD Pharmingen) foram adicionados à cultura. Depois do período de estimulação, as células foram recolhidas, fixadas em PBS 1x com 2% de formaldeído, permeabilizadas com 0,5% de saponina em tampão Dynal (2mM EDTA e 0,5% BSA em PBS 1x) e marcadas com anti-IL-2-ficoeritrina (1:200) e anti-IL-4-aloficocianina (1:50) (eBioscience). A marcação das citocinas foi avaliada por citometria de fluxo.

3.17 ANÁLISE DE CICLO E MORTE CELULAR POR MARCAÇÃO COM IODETO DE PROPÍDIO

Para análise de morte celular, 1×10^5 células NIH3T3 transduzidas (subitem 3.15.2.2) foram cultivadas em placas de 12 poços, em confluência. Para análise de ciclo celular, $1,5 \times 10^4$ células transduzidas foram cultivadas em placas de 6 poços. Depois de 24 h, as células foram tripsinizadas (1 poço para análise de morte celular e 5 poços para análise de ciclo celular), lavadas com PBS 1X e ressuspendidas em tampão PI (Tris HCl 3,4 mM, pH 7,6; NaCl 10 mM; NP40 0,1% (v/v); RNase 700 U/L; PI 0,075 mM). A análise do conteúdo de DNA foi determinada citometria de fluxo e as fases do ciclo celular e percentual de células com marcação Sub-G0 foram determinados utilizando o programa CELLQuest (BD Biosciences).

3.18 ENSAIO CLONOGÊNICO

200 células NIH3T3 transduzidas (subitem 3.15.2.2) foram cultivadas em placas de 6 poços por duas semanas com meio DMEM 10% SFB, tendo o meio de cultura trocado por meio novo após 7 dias. No final das duas semanas, as placas foram lavadas com PBS 1X e fixadas com etanol 100%. Após 10 min de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se 500 μ L de solução de cristal violeta (Etanol 20%, Cristal Violeta 0,05%). Após 10 min de incubação, a placa foi lavada 3 x com água destilada. Após secagem dos poços, a placa foi escaneada.

4 RESULTADOS

4.1 A REGULAÇÃO DO PROTO-ONCOGENE *C-MYC* PELO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFAT1

4.1.1 A expressão de *c-Myc* em resposta à estimulação por anti-CD3 é dependente da via de Ca^{2+} /calcineurina/NFAT1

Como um típico gene de resposta imediata (também chamado de *early gene*), a expressão de *c-Myc* é prontamente induzida por mitógenos durante a entrada das células no ciclo celular, na transição das fases G_0/G_1 (Kelly *et al.*, 1983; Reed *et al.*, 1985; Levine *et al.*, 1986; Golay *et al.*, 1992). A ativação de linfócitos T com anti-CD3 simula a via de sinalização disparada pelo TCR e, por esse motivo, é amplamente utilizada em ensaios *in vitro*. Essa estimulação ativa as três principais vias de sinalização em células T: a de Ca^{2+} , responsável, dentre outras funções, pela ativação dos fatores de transcrição da família NFAT, a de PKC e a de proteínas da família Ras-MAPK (Crabtree & Clipstone, 1994; Cantrell, 1996; Lewis, 2001). Para avaliar a expressão de *c-Myc* pela estimulação com anti-CD3, linfócitos T CD4 de camundongos C57BL/6 *naives* foram purificados e estimulados por diversos períodos de tempo, tendo seu mRNA analisado por PCR em tempo real. Como observado na **Figura 5**, a expressão do mRNA de *c-Myc* aumentou entre 10-15 vezes após a estimulação com anti-CD3, atingindo um pico em 6 h e diminuindo para menos da metade em 24 e 48 h, mas ficando acima dos níveis de expressão observados no tempo de 0 h. Essa expressão está de acordo com os relatos da literatura, onde *c-Myc* praticamente não é detectado nas células quiescentes (0 h), seguido por um aumento brusco nas primeiras horas de ativação e diminuindo para níveis baixos, mas detectáveis, durante todo o tempo que a célula permanece em ciclo celular (Wierstra & Alves, 2008). Após 96 h de estimulação com anti-CD3, os linfócitos T continuam proliferando (Caetano *et al.*, 2002), o que justifica a expressão aumentada de *c-Myc* encontrada em 24 e 48 h, quando comparada com a de 0 h.

O envolvimento da via de calcineurina nos diversos processos celulares pode ser verificado através da utilização das drogas imunossupressoras ciclosporina A ou FK506, que bloqueiam a atividade desta proteína (Shaw *et al.*, 1995; Rao *et al.*, 1997; Kiani *et al.*, 2000). A inibição da calcineurina impede a translocação nuclear e a ativação das proteínas NFAT. Assim, para investigar a possível correlação entre NFAT e a expressão de *c-Myc*, linfócitos T

CD4 purificados de camundongos C57BL/6 *naives* foram mantidos *in vitro* por 6 h sem estimulação ou com estímulo de anti-CD3, na presença ou não de ciclosporina A. Como ilustrado na **Figura 5A**, através de análise por PCR em tempo real, a indução de *c-Myc* provocada pelo estímulo de anti-CD3 foi completamente bloqueada pela administração de ciclosporina A, demonstrando que a via de calcineurina é fundamental para a indução deste gene e sugerindo um possível papel para as proteínas NFAT durante este processo. Do mesmo modo, este resultado também foi observado nos níveis proteicos de *c-Myc* (**Figura 5C**). Reforçando esses dados, há outros trabalhos mostrando a inibição da expressão de *c-Myc* por ciclosporina A tanto em nível de mRNA (Furue *et al.*, 1990; Golay *et al.*, 1992) quanto de proteína (Koenig *et al.*, 2010).

Para obter uma evidência mais direta do envolvimento do NFAT1 especificamente na regulação de *c-Myc*, utilizamos linfócitos T CD4 *naives* de animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} para avaliar a expressão da proteína *c-Myc* frente ao estímulo com anti-CD3. Embora não houvesse diferença na expressão de *c-Myc* entre as células *naives*, após 6 e 24 h de estimulação com anti-CD3, os linfócitos NFAT1^{-/-} expressavam níveis reduzidos de proteína *c-Myc* quando comparados com os NFAT1^{+/+} (**Figura 5D**), sugerindo que o fator de transcrição NFAT1 regule positivamente a expressão de *c-Myc*.

Em conjunto, nossos dados demonstram um papel importante para a via de Ca²⁺/calcineurina/NFAT1 na indução de *c-Myc* pela sinalização de TCR em linfócitos e sugerem que o NFAT1 atue como um regulador positivo da expressão gênica de *c-Myc*.

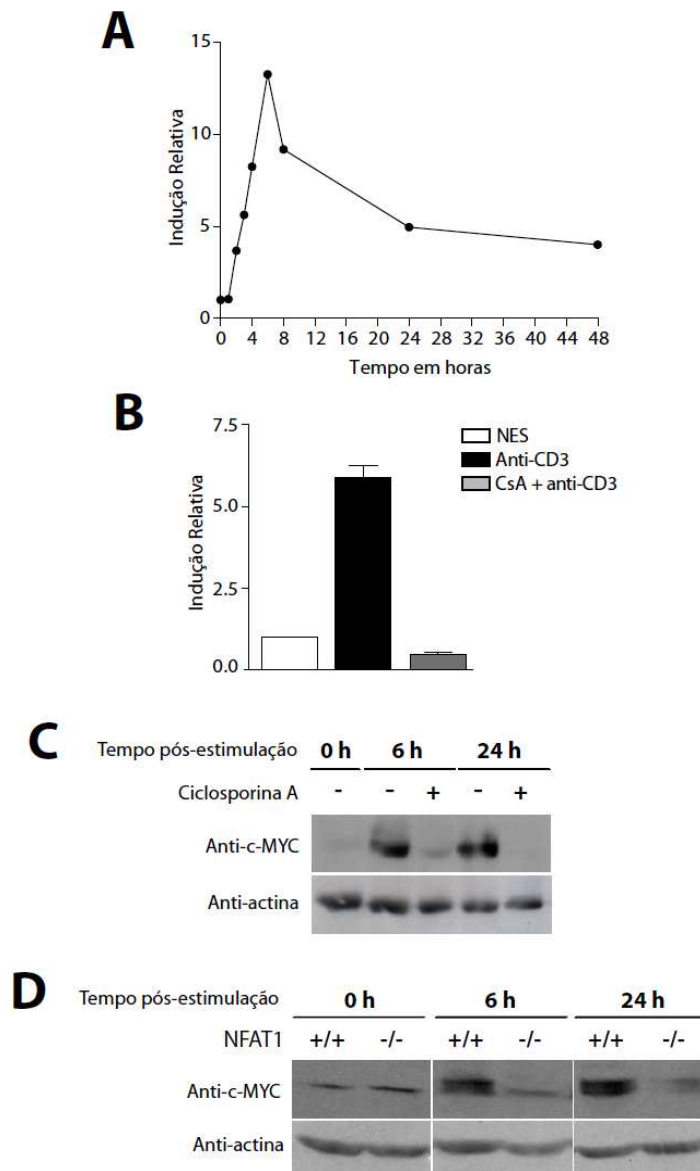


Figura 5 - A expressão de *c-Myc* é dependente da via de Ca^{2+} /calcineurina/NFAT1: Linfonodos totais de animais C57BL/6 (**A**, **B** e **C**) ou NFAT1^{+/+} ou NFAT1^{-/-} (**D**) entre 8 e 12 semanas de idade foram retirados, as células T CD4 foram purificadas e mantidas *in vitro* com estímulo de anti-CD3 (1 $\mu\text{g/mL}$) aderido à placa. (**A**) o RNA celular total foi extraído em 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24 e 48 h após estimulação. O cDNA foi sintetizado e a expressão do mRNA de *c-Myc* foi avaliada por PCR em tempo real. A normalização foi feita através da expressão do gene constitutivo HPRT e está representada em relação ao 0 h. (**B**) Após 6 horas em cultura sem estímulo (NES), ou estimuladas com anti-CD3 na ausência ou na presença de ciclosporina A (CsA, 1 μM), o RNA celular total foi extraído e a análise realizada como descrito em **A**. A administração de CsA foi feita 15 minutos antes do estímulo com anti-CD3. O resultado está expresso como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes, em relação ao NES. (**C** e **D**) A extração de proteína total foi realizada nos tempos indicados e o western blot foi realizado com anticorpos anti-*c-Myc* (Santa Cruz, N-262) e anti-actina (Sigma, A3853). Todos os resultados são representativos de três experimentos independentes.

4.1.2 O fator de transcrição NFAT1 se liga ao promotor de c-Myc.

4.1.2.1 O promotor do gene c-Myc contém supostos sítios de ligação para NFAT, que são conservados em humanos e camundongos

Os resultados recém apresentados sugerem que a via que ativa o NFAT1 pode ativar a expressão de c-Myc. Entretanto, eles não fornecem informações de quão direta é essa regulação. O próximo passo foi realizar uma análise de bioinformática com o promotor de c-Myc, procurando por teóricos sítios de ligação para as proteínas NFAT. Os programas de bioinformática buscam esses sítios baseados em uma matriz específica para cada fator de transcrição (**Figura 6A**) e, geralmente, a quantidade de sítios encontrada pela predição excede o número de sítios ocupados fisiologicamente. Assim, sugere-se que ao fazer uma busca por supostos sítios de ligação em um determinado promotor, se faça a mesma análise em um gene ortólogo, presumindo que regiões conservadas evolutivamente foram selecionadas para manter funções específicas (Nardone *et al.*, 2004), ou seja, é mais provável que uma sequência conservada em espécies diferentes tenha função biológica. Neste sentido, as sequências genômicas do promotor de c-Myc de humanos e camundongos, incluindo o éxon 1, que tem uma grande região não traduzida e – 3000 pb a 5' dele, foram obtidas do banco de dados do ENSEMBL e submetidas a dois programas de bioinformática: o rVISTA e o GENOMATIX. Como resultado, oito supostos sítios de ligação para o NFAT foram encontrados em cada espécie, sendo sete deles conservados nas duas espécies. Os sítios conservados foram utilizados no presente estudo e suas localizações no promotor (em relação ao início de transcrição de P1) estão representadas na **Figura 6B**, que também mostra o alinhamento dos sítios entre humanos e camundongos. Esses sítios são chamados aqui de NFATRE (NFAT responsive elements).

Em relação à sequência, o núcleo canônico de ligação para o NFAT é composto pelos nucleotídeos GGAAA (Rao *et al.*, 1997), que são encontrados nos sítios NFATRE 2, 3, 5-7, ou, se o sítio estiver na fita oposta, pelos nucleotídeos CCTTT, encontrados no NFATRE 1 humano. O NFATRE 1 murino apresenta uma pequena, mas importante variação (CTTTT), configurando um sítio não ideal de ligação para o NFAT. Da mesma maneira, o NFATRE 4 contém uma variação de GGAAA para GCAAA, tanto em humanos quanto em camundongos. O sítio proximal (NFATRE 7, localizado a +101 pb em humanos e +98 pb em camundongos) está localizado entre P1 e P2 – os dois principais inícios de transcrição de c-Myc. Com exceção deste sítio, todos os demais estão localizados a dezenas de pares de bases do início de

transcrição e, embora não façam parte da região que compreende o promotor basal, podem atuar como *enhancers* ou *silencers* (Lee & Young, 2000).

Embora o NFATRE 7 se localize entre P1 e P2, ele pode ser importante na regulação dos transcritos originados a partir dos dois promotores. Já foi demonstrado que quando a transcrição de P2 é diminuída, a de P1 é aumentada e vice-versa. Além disso, a mutação do sítio de E2F especificamente, que é sobreposto com o NFATRE 7, diminui a transcrição a partir de P1 e aumenta a partir de P2 (Albert *et al.*, 2001; Wiestra & Alves, 2008).

4.1.2.2 O DBD da proteína NFAT1 recombinante se liga *in vitro* ao promotor de *c-Myc*

Apesar de serem conservados em humanos e camundongos, a similaridade de sequências não garante que os sítios encontrados pela análise de bioinformática tenham sido selecionados evolutivamente (Nardone *et al.*, 2004) e a identificação daqueles que realmente ligam proteínas requer testes bioquímicos e experimentais (Wray *et al.*, 2003). Assim, o domínio de ligação ao DNA (DBD) da proteína NFAT1 recombinante, previamente clonado em bactérias M15 (**Figura 7A**), foi purificado e sua capacidade de se ligar *in vitro* foi testada. Como ilustrado na **Figura 7B**, o processo de purificação do DBD resultou em uma banda única, de tamanho molecular esperado (~ 32,67 KDa). Em seguida, a capacidade de ligação ao DNA desse domínio foi avaliada por um ensaio de EMSA, com um oligonucleotídeo controle, contendo o sítio distal de ligação para o NFAT no promotor de *Il-2* humano (**Figura 7C**). Utilizando concentrações crescentes do DBD purificado, verificou-se que ocorreu a formação de complexos DNA-proteína e que a intensidade destes complexos era proporcional à concentração de proteína utilizada, confirmando a funcionalidade desse domínio para ensaios de ligação *in vitro*.

Em seguida, o mesmo ensaio foi realizado, agora com os oligonucleotídeos contendo os supostos sítios de ligação de NFAT ao promotor de *c-Myc* murino (**Figura 8A**). Dos sete sítios testados, três deles (NFATRE 2, 5 e 7) apresentaram a formação de complexos DNA-proteína, também de forma proporcional à quantidade de proteína utilizada. Aparentemente, a ligação do DBD do NFAT1 aos sítios NFATRE 2 e 5 ocorre com maior avidez em relação à do NFATRE 7, pois com a mesma concentração de proteína, a banda resultante da ligação entre o DBD e o oligo contendo o NFATRE 7 tem intensidade menor. Além disso, nós também observamos uma ligação muito fraca do DBD do NFAT1 com o oligo que contém o NFATRE 6.

Por último, para mostrar que essa ligação é específica aos supostos sítios encontrados pela análise de bioinformática e não a uma outra região contida no oligo, os três oligonucleotídeos que apresentaram ligação foram mutados apenas no núcleo consenso de ligação ao NFAT (GGAAA→ACTCA) e o mesmo ensaio foi repetido (**Figura 8B**), agora ou com os oligos selvagens ou com os mutados. Como esperado, a mutação nesses cinco pares de base aboliu a formação dos complexos DNA-proteína, confirmando que a ligação é específica aos sítios em estudo. Dessa forma, demonstramos que, *in vitro*, o DBD da proteína NFAT1 é capaz de se ligar diretamente a pelo menos três sítios do promotor de *c-Myc*.

4.1.2.3 O NFAT1 se liga *in vivo* ao promotor de *c-Myc*

Para demonstrar que a proteína NFAT1 se liga ao promotor de *c-Myc*, linfócitos T CD4 isolados de animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram submetidos a um ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP). Os linfócitos foram diferenciados para o fenótipo Th1 por uma semana e, depois desse período, foram cultivados por mais 4 h na ausência de estímulo, ou foram estimulados com PMA e ionomicina (P + I). As células foram fixadas para manter as interações DNA-proteína e o DNA foi imunoprecipitado com anticorpos anti-NFAT1; anti-histona H4 acetilada, ou sem anticorpo, como controle negativo da reação. Por fim, a capacidade de ligação do NFAT1 aos diferentes sítios foi avaliada por PCR convencional.

O ensaio de ChIP possibilita a detecção das interações DNA-proteína que ocorrem *in vivo* e para determinar a preservação e a especificidade destas interações no presente ensaio, *primers* específicos para a região de ligação do NFAT1 ao promotor de IL-4 ou ao promotor de IFN- γ , foram utilizados para amplificar o DNA imunoprecipitado. A proteína NFAT1 é capaz de se ligar aos dois promotores (Kubo *et al.*, 1994; Sica *et al.*, 1997, Avni *et al.*, 2002), mas após a diferenciação para Th1, apenas o *locus* de IFN- γ está permissível à transcrição e, portanto, aos fatores que o regulam, ao passo que o *locus* de IL-4 se encontra silenciado (Avni *et al.*, 2002). Como ilustrado na **Figura 9A**, a proteína NFAT1 foi capaz de se ligar apenas ao promotor de IFN- γ e nos linfócitos NFAT1^{+/+} ativados com PMA e ionomicina, confirmando a viabilidade e a especificidade da técnica.

Para o promotor de *c-Myc*, foram desenhados três pares de *primers*, de forma que pudessem amplificar as regiões que contêm os supostos sítios de ligação para NFAT aqui estudados (**Figura 9B**). Não foi possível desenhar um par de *primer* para cada um dos sete sítios, uma vez que alguns deles se localizam muito próximos fisicamente. Assim, o par de

primer 1 amplifica a região que contém os sítios NFATRE 1 e 2 e o par 2 amplifica a região que contém os sítios NFATRE 5 e 6. O par 3 amplifica a região que contém apenas o NFATRE 7. Dentro de cada conjunto de reações, a intensidade da banda do controle positivo (INPUT) foi praticamente igual nas quatro condições, indicando que a quantidade de DNA utilizada em cada uma delas foi similar. A imunoprecipitação com anti-histona H4 acetilada mostrou que a cromatina está acessível em todas as condições, para as regiões amplificadas pelos três conjuntos de *primers*.

Em relação à imunoprecipitação com anti-NFAT1, podemos observar na **Figura 9C** que a ativação dos linfócitos NFAT1+/+ com PMA e ionomicina induziu a ligação deste fator de transcrição à região amplificada pelo par de *primer* 1, o que não ocorreu com os linfócitos NFAT1-/-, como esperado. Um resultado semelhante foi encontrado para o par de *primer* 2, apesar de já ser notada uma pequena ligação nas células não ativadas. Apesar dos pares de *primer* 1 e 2 também amplificarem as regiões que contém os sítios NFATRE 1 e 6, respectivamente, a ligação identificada pelo ensaio de ChIP deve ser específica aos sítios NFATRE 2 e 5, já que o DBD do NFAT1 não se ligou aos dois primeiros (**Figura 8**). Em contrapartida, a ligação do NFAT1 à região amplificada pelo par de *primer* 3 não foi identificada nessas células. Esse par de *primer* amplifica a região que contém o sítio proximal NFATRE 7, previamente identificado como um sítio que liga tanto NFAT1 quanto NFAT2 em células pancreáticas (Koenig *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010). Interessantemente, foi mostrado que apenas o NFAT2 se liga a este sítio em linfócitos B, enquanto o NFAT1 não se liga (Pham *et al.*, 2010). É importante ressaltar que o NFATRE 7 se localiza numa região que sobrepõe sítios de ligação para vários fatores de transcrição, como ETS1/2, STAT3, E2F, Smad3/4 e MET (Facchini *et al.*, 1997; Wierstra & Alves, 2008) (**Figura 9D**). Os sítios são sobrepostos e os diferentes fatores se ligam alternadamente a ele. Assim, a ligação de um fator a essa região exclui a ligação dos demais. Se um desses outros fatores estivesse ligado no tempo da nossa análise, que foi de 4 h após ativação, isso impediria a ligação do NFAT1. Assim, não podemos excluir a possibilidade do NFAT1 se ligar a este sítio em diferentes tempos ou condições.

Além disso, a ligação do NFAT1 ao NFATRE 7 pode não ter sido detectada pelo ensaio de ChIP por causa de sua baixa afinidade pelo NFAT1 como observado nos ensaios de EMSA. Fazendo um paralelo com outra situação, foi mostrado que quando as proteínas NFAT são superexpressas em células Jurkat, tanto o NFAT1 quanto o NFAT2 se associam com o promotor de TNF- α em ensaios de ChIP. Contudo, a associação fisiológica entre os NFATs

endógenos e o promotor de TNF- α foi muito fraca para confirmar esse achado (Kaminuma *et al.*, 2008).

Este conjunto de resultados demonstra que, em linfócitos T CD4 diferenciados para Th1, o NFAT1 se liga *in vivo* a duas regiões distais do promotor de *c-Myc*. Por outro lado, não conseguimos detectar a ligação do NFAT1 ao sítio proximal.

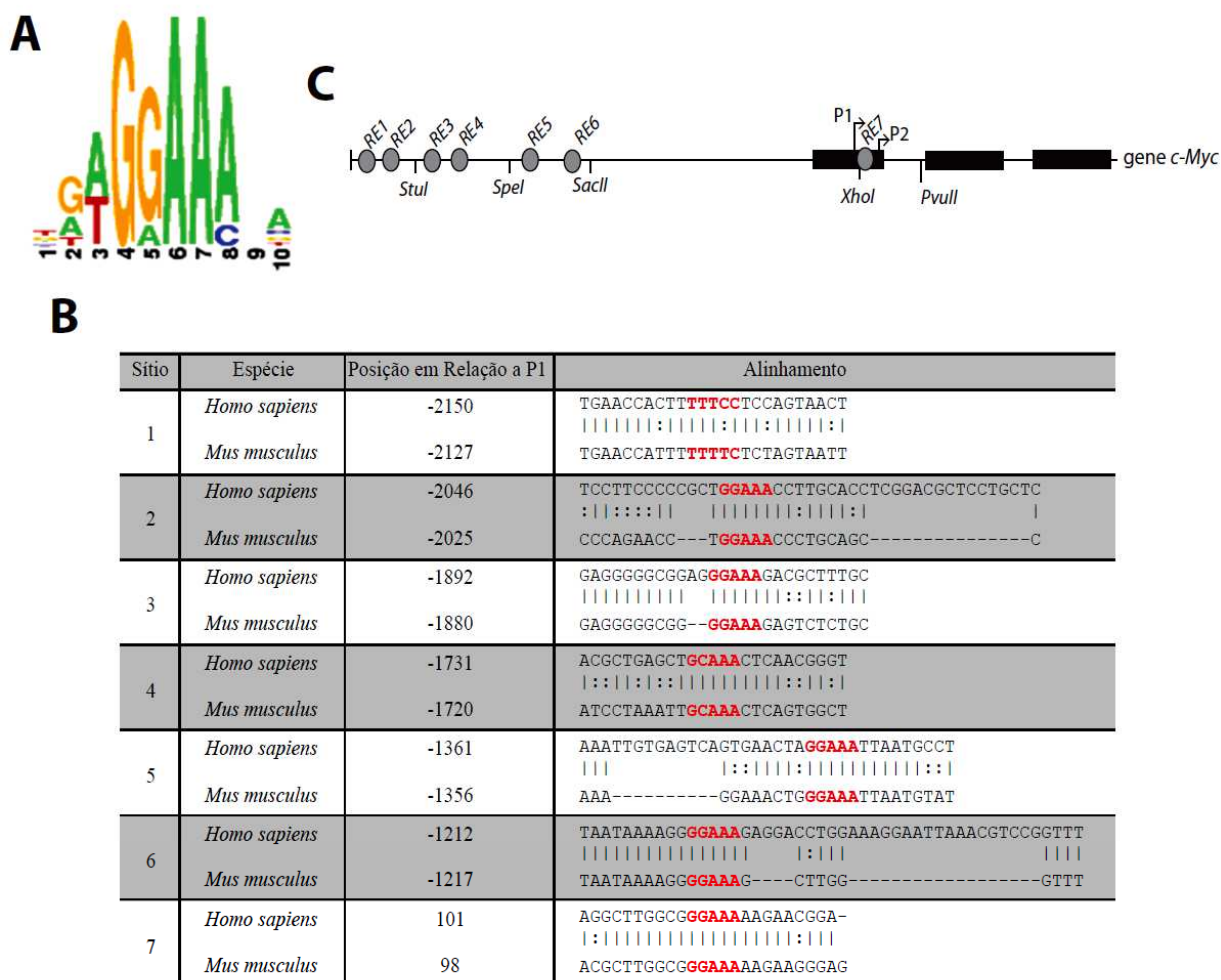


Figura 6 - Supostos sítios de ligação para NFAT no promotor de *c-Myc*: (A) Matriz de busca por sítios de ligação para os fatores de transcrição NFAT obtido do software do Genomatix. (B) A tabela mostra a posição (em relação a P1) e a sequência dos sete sítios de ligação para NFAT encontrados pela análise de bioinformática. O alinhamento de cada um dos sítios entre humanos e camundongos está mostrado na direita da tabela. As sequências dos sítios murinos ilustradas representam os oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de EMSA. Ainda, os cinco nucleotídeos em vermelho representam o núcleo canônico de ligação para a proteína NFAT. (C) Representação esquemática do gene *c-Myc*, com a região promotora, os três éxons (retângulos pretos) e os dois principais inícios de transcrição (P1 e P2). Na região promotora, os sete supostos sítios de ligação para NFAT encontrados pela análise de bioinformática estão representados por círculos cinzas.

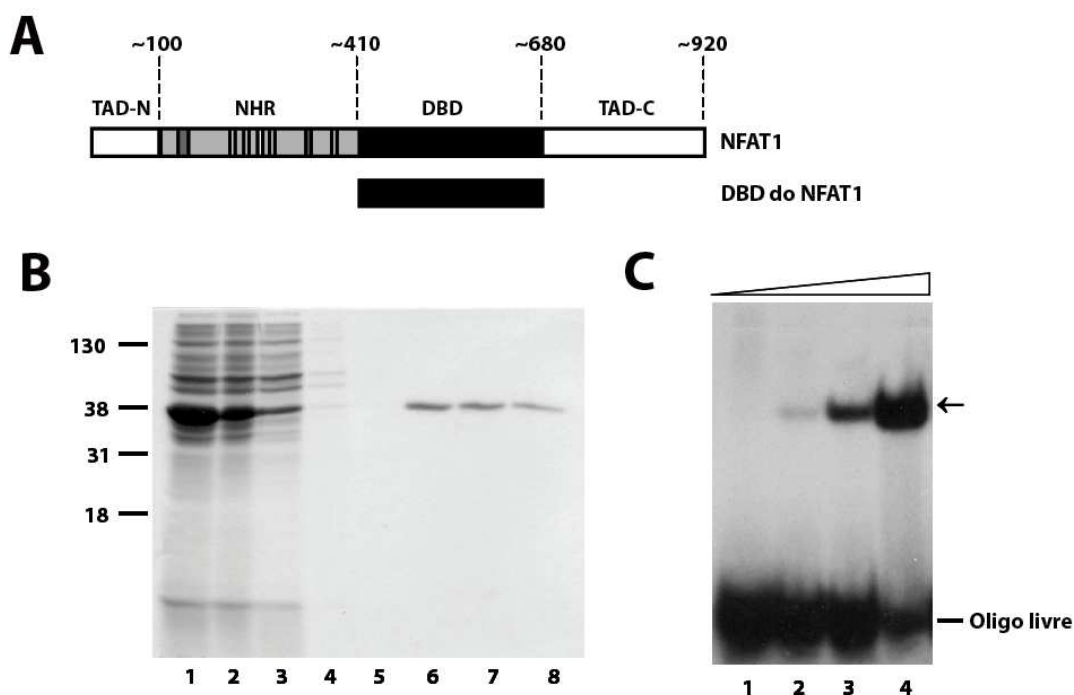


Figura 7 - Purificação e ligação do DBD da proteína NFAT1 ao sítio distal do promotor de IL-2 humano: (A) Representação esquemática da proteína NFAT1 com seus domínios, enfatizando a região do domínio de ligação ao DNA (DBD – DNA *binding domain*), que foi expresso em bactérias M15 e purificado através de uma coluna de afinidade a níquel (QIAGEN). (B) Gel de poliacrilamida desnaturante 12 % corado com coomassie blue, mostrando os passos de purificação do DBD da proteína murina recombinante NFAT1. 1. Extrato total da bactéria após sonicação; 2. Após passagem pela coluna; 3-5. Lavagens da coluna; 6-8. Eluições da proteína. As bandas indicam o padrão de peso molecular (em KDa). (C) Concentrações crescentes do DBD da proteína murina recombinante (1. 1 nM; 2. 10 nM; 3. 100 nM e 4. 1 μ M) foram incubados com um oligonucleotídeo contendo o sítio distal de ligação ao NFAT do promotor de IL-2 humano, marcado radioativamente ($[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP). Os complexos DNA-proteína foram analisados pelo ensaio de EMSA e estão indicados pela seta ($\leftarrow$).

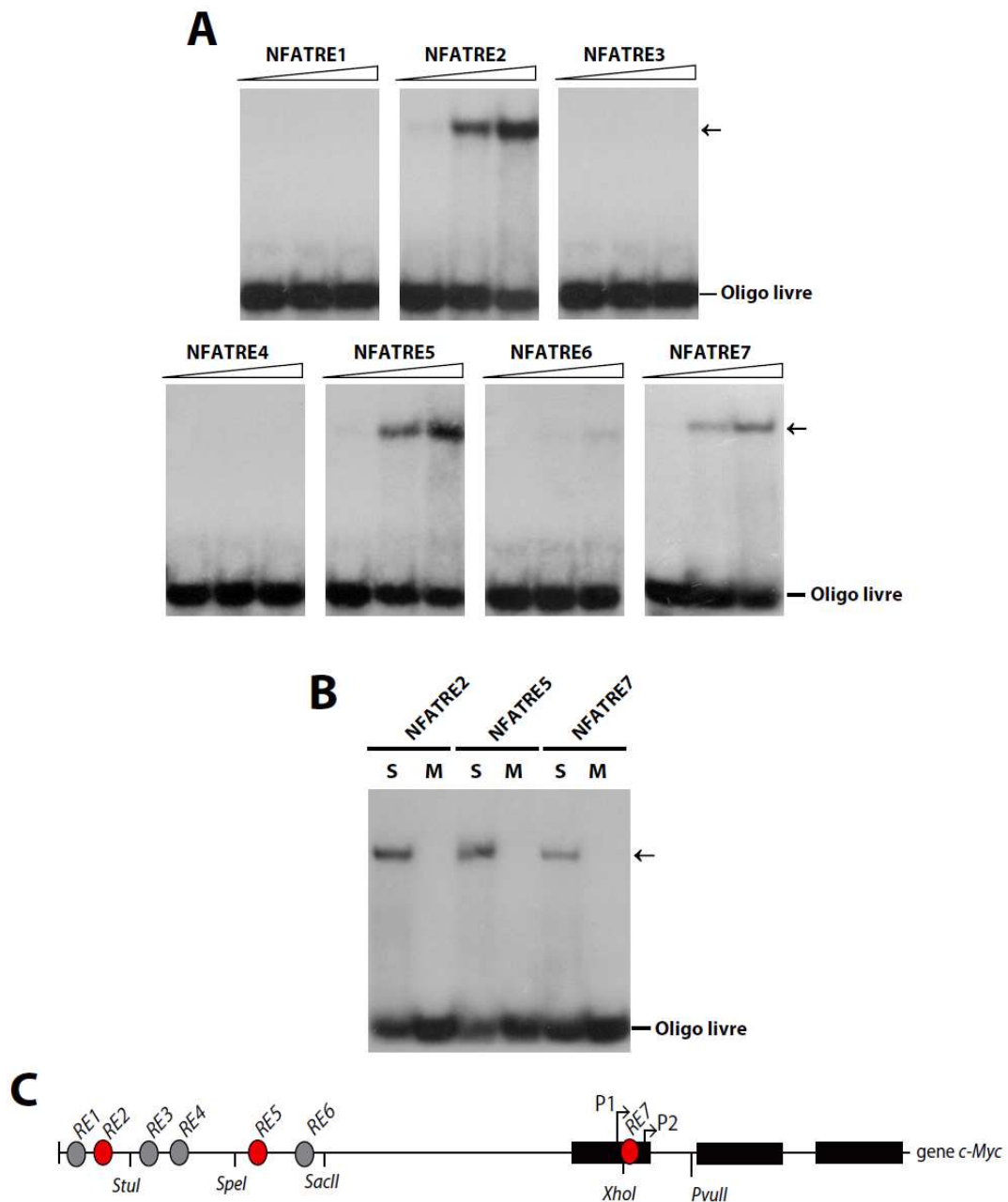


Figura 8 - O domínio de ligação ao DNA (DBD) do NFAT1 se liga especificamente ao promotor de *c-Myc*: (A) Os sete oligonucleotídeos contendo os supostos sítios de ligação para o NFAT do promotor de *c-Myc* murino (mostrados na Figura 6B) foram marcados radioativamente ($[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP) e incubados com concentrações crescentes do DBD da proteína NFAT1 (100 nM, 500 nM e 1 μM , respectivamente). Os complexos DNA-proteína foram então analisados por EMSA e estão indicados pela seta ($\leftarrow$). (B) Os três oligonucleotídeos do promotor de *c-Myc* que mostraram ligação em (A) foram mutados no núcleo canônico de ligação ao NFAT (GGAAA $\rightarrow$ ACTCA). Os oligos selvagens (S) e mutados (M) marcados radioativamente ($[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP) foram incubados com 500 nM do DBD da proteína NFAT e submedidos ao ensaio de EMSA. Os complexos DNA-proteína estão indicados pela seta ($\leftarrow$). (C) Os sítios que mostraram ligação ao NFAT1 estão em vermelho no esquema. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

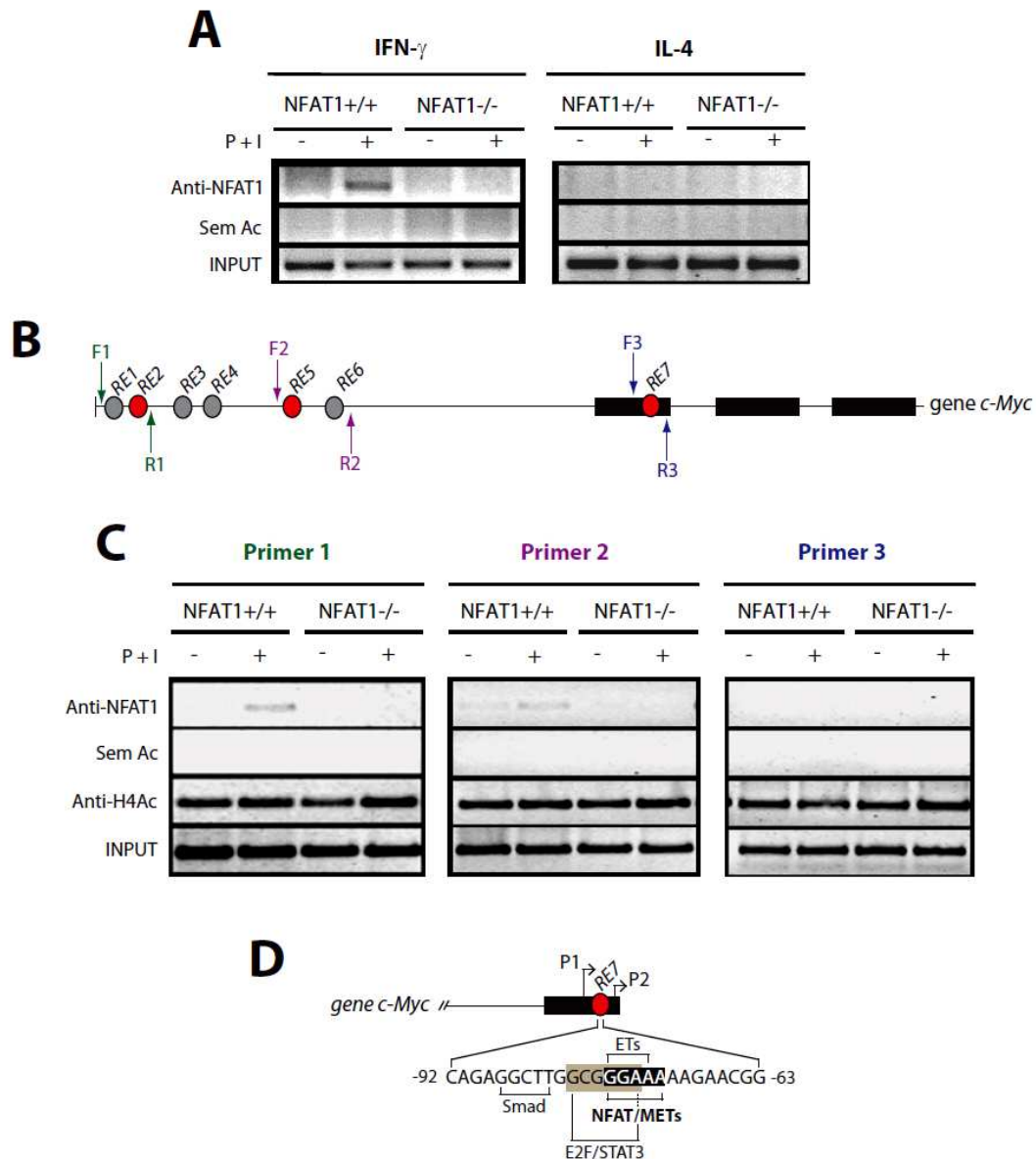


Figura 9 - *In vivo*, o NFAT1 se liga diretamente ao promotor de *c-Myc*: Linfócitos T CD4 foram isolados de camundongos NFAT1+/+ ou NFAT1-/- e diferenciados para o fenótipo Th1. Essas células foram mantidas não estimuladas ou estimuladas com PMA (10 nM) e ionomicina (1 mM) por 4 h (P + I). Após esse período, os extratos nucleares foram imunoprecipitados com anticorpos anti-NFAT1, anti-histona H4 acetilada (anti-H4ac), ou sem anticorpos (SemAc). O DNA foi então purificado e analisado por PCR com *primers* específicos para a região em que o NFAT1 se liga no promotor dos genes de IFN- γ e IL-4 (**A**), ou para as regiões do promotor de *c-Myc* (**C**) que contêm os sítios de ligação para NFAT detectados pela técnica de EMSA (Figura 9 A e B). A PCR também foi realizada com o DNA purificado antes da imunoprecipitação (INPUT). (**B**) Representação esquemática do gene *c-Myc*, indicando os sítios que mostraram ligação pela técnica de EMSA em vermelho. Os retângulos em verde (F1 e R1), roxo (F2 e R2) e azul (F3 e R3), indicam a região de anelamento dos *primers* utilizados para os sítios 2, 5 e 7, respectivamente, no ensaio de ChIP. (**D**) A figura mostra o sítio 7 de NFAT, localizado numa região que sobrepõe sítios de ligação para vários fatores de transcrição. O ChIP foi realizado apenas uma vez e cada PCR foi repetida três vezes.

4.1.3 Regulação da transativação do promotor de *c-Myc* pelo NFAT1

4.1.3.1 Os sítios distais de ligação para o NFAT são reguladores negativos, enquanto o sítio proximal é um elemento positivo para a regulação mediada pelo NFAT1

Para caracterizar o papel da proteína NFAT1 na expressão gênica de *c-Myc*, nós avaliamos a responsividade do promotor *c-Myc* humano a uma proteína NFAT1 constitutivamente ativa (CA-NFAT1) por ensaios de gene repórter em células HEK293T. Usando uma proteína constitutivamente ativa, que não requer ativação por se localizar constitutivamente no núcleo (Okamura *et al.*, 2000; Robbs *et al.*, 2008), nós pudemos minimizar os efeitos de outros fatores de transcrição na indução do promotor de *c-Myc*.

Como ilustrado na **Figura 10A**, a expressão da proteína CA-NFAT1 apenas teve um efeito discreto na transativação do promotor completo de *c-Myc* (-2446pb-Luc) quando comparada com a do vetor vazio, mas o CA-NFAT1 levou a uma clara indução na atividade do promotor em uma construção que remove mais de 1 kb do promotor distal (-1237pb-Luc), que remove, dentre outros elementos, os sítios NFATRE 2 e 5. Esses resultados sugerem que a região deletada tem um efeito negativo na atividade do promotor *c-Myc*, enquanto um elemento positivo está localizado no restante do promotor. Da mesma maneira, a análise do promotor mínimo de P2 (-109pb-Luc), que contém o NFATRE 7, mostrou que o CA-NFAT1 ainda foi capaz de aumentar a atividade do promotor, sugerindo que o NFATRE 7 é um elemento positivo para a transativação mediada pelo CA-NFAT1.

Para avaliar a função dos sítios distais de NFAT especificamente, nós realizamos mutagênese sítio dirigida dos sítios NFATRE 2 e 5 no contexto do promotor completo. A mutação individual dos sítios distais não alterou a transativação do promotor (dados não mostrados), mas, surpreendentemente, como ocorreu com a construção -1237pb-Luc, o CA-NFAT1 aumentou a atividade do promotor de *c-Myc* quando os sítios NFATRE 2 e 5 foram mutados em conjunto, indicando que esses elementos funcionam como reguladores negativos da expressão de *c-Myc*. Note que mesmo sem a superexpressão de NFAT1 (barra branca, pLIREs) a transativação da construção mutada foi maior quando comparada com a do promotor completo. Provavelmente isso se deve ao impedimento da ligação de NFAT endógeno ou ainda de outro fator de transcrição que poderia se ligar a esses sítios. Por outro lado, embora a mutação do NFATRE 7 tenha resultado em uma diminuição da transativação quando comparada com a do promotor selvagem (compare as barras brancas), o CA-NFAT1

não alterou a transativação do promotor quando esse sítio foi mutado, mostrando que a ligação do CA-NFAT1 apenas aos sítios distais não induz a atividade do promotor.

Para confirmar o papel positivo do NFATRE 7 na regulação da expressão de *c-Myc*, nós mutamos esse sítio no contexto do promotor mínimo. Como mostrado na **Figura 10B**, quando este sítio foi mutado, o CA-NFAT1 não foi mais capaz de induzir a transativação do promotor, comprovando que o NFATRE 7 é um elemento positivo para o NFAT1. Esses resultados em conjunto sugerem que os elementos distais responsivos ao NFAT1 são reguladores negativos, enquanto o proximal tem um efeito positivo na transativação mediada pelo NFAT1. Além disso, os sítios distais parecem exercer um papel predominante na regulação do promotor de *c-Myc* em relação ao sítio proximal, já que o CA-NFAT1 só aumenta a atividade do promotor quando os sítios distais estão deletados ou mutados.

4.1.3.2 A mutação dos elementos responsivos ao NFAT sugere que outro sítio importante para a transativação mediada pelo NFAT1 exista no promotor c-Myc

Com o objetivo de determinar se os NFATRE 2, 5 e 7 eram os únicos sítios responsivos ao NFAT1 existentes no promotor de *c-Myc*, nós mutamos esses três sítios juntos no contexto do promotor completo. Surpreendentemente, observamos que o CA-NFAT1 ainda aumentava a atividade do promotor nessa construção (-2446pb-Mut2,5,7-Luc, **Figura 11A**), sugerindo que outro sítio funcional de NFAT1 está presente no promotor de *c-Myc*, ou que o CA-NFAT1 esteja se ligando a sítios não NFAT, como demonstrado para os promotores de *Nur77* (Youn *et al.*, 2000) e *p21^{Cip1}* (Santini *et al.*, 2001).

Para mapear a região do promotor de *c-Myc* que é responsiva ao NFAT1, usamos uma construção chamada aqui de FragA-Luc (He *et al.*, 1998), que compreende os nucleotídeos -2446 até -1237, ressaltando que essa construção não está sob controle do promotor mínimo de *c-Myc*. De forma inesperada, o FragA-Luc foi amplamente induzido pelo CA-NFAT1 (**Figura 11B**). Como o FragA-Luc compreende os sítios negativos NFATRE 2 e 5, esse dado vai contra os resultados encontrados para esta região no contexto do promotor completo (**Figura 10A**). Esses resultados levaram à sugestão de que a função repressiva dos sítios NFATRE 2 e 5 pudesse depender de interações com o promotor basal, que não podem estar presentes no FragA-Luc, pois ele não contém o promotor mínimo de *c-Myc*. Essa hipótese foi sustentada pelo achado de que as mutações nos NFATRE 2 e 5 não alteram a responsividade do FragA-Luc ao CA-NFAT1 (**Figura 11B**), o que também vai contra os resultados do promotor completo carregando essas mutações (**Figura 10A**). Portanto, esses dados indicam que outro

elemento na região compreendida pelo FragA-Luc é responsivo ao NFAT1 e que fora do contexto do promotor mínimo, os sítios NFATRE 2 e 5 não atuam como elementos negativos para a transativação mediada por NFAT1, sugerindo um papel para o dobramento de cromatina em definir a responsividade do promotor de *c-Myc* aos sítios distais de NFAT1.

Em seguida, realizamos deleções sequenciais no FragA-Luc para identificar a região responsiva ao CA-NFAT1. Como mostrado na **Figura 11C**, essa região se localiza entre os nucleotídeos 891-1219 do FragA-Luc, na vizinhança do NFATRE 5. Uma análise dessa região específica revelou dois outros supostos sítios NFAT GGAAA e um CCTTT, que não tinham sido identificados pela análise de bioinformática, além do NFATRE 6 (**Figura 12A**). Para analisar se algum desses sítios NFAT era de fato responsivo ao NFAT1, nós mutamos os três sítios (**Figura 12B**). Nenhuma dessas mutações alterou a responsividade do FragA-Luc ao CA-NFAT1. Assim, o único elemento possivelmente responsivo ao NFAT nessa região era o NFATRE 6, que tinha sido excluído do estudo devido a sua fraca ligação ao NFAT1 demonstrada pelo ensaio de EMSA (veja **Figura 8**). Inesperadamente, a mutação do NFATRE 6 diminuiu significativamente a transativação mediada pelo CA-NFAT1 (**Figura 12B**), indicando que esse sítio é responsável pela atividade do CA-NFAT1 no FragA-Luc. Portanto, nossos dados sugerem que o NFAT1 se ligue ao NFATRE 6 com baixa afinidade, mas que quando os outros elementos responsivos ao NFAT são abolidos, o NFAT1 pode se ligar ao NFATRE 6 e induzir a atividade do promotor de *c-Myc*.

4.1.3.3 *p300* aumenta a transativação do promotor de *c-Myc* mediada pelo NFAT1

Já é bem estabelecido que o remodelamento de cromatina é um fator crítico na regulação do promotor de *c-Myc* (Wierstra & Alves, 2008; Liu *et al.*, 2006; Nagl *et al.*, 2007) e muitas evidências têm apontado o NFAT como um fator de transcrição envolvido nesse processo, devido a sua habilidade de recrutar proteínas de remodelamento e histonas acetiltransferases para a cromatina (Garcia-Rodriguez *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Pham *et al.*, 2010). Embora tenhamos visto que os sítios distais de NFAT são elementos dominantes e negativos sobre o sítio proximal na transativação do promotor de *c-Myc* mediada pelo NFAT1 (**Figura 10**), nós também mostramos que os linfócitos CD4 de camundongos NFAT1^{+/+} expressam níveis aumentados de *c-Myc* em relação aos dos camundongos NFAT1^{-/-} (**Figura 5D**). Uma das explicações para esses resultados controversos é a de que uma proteína parceira colabora com o NFAT1 para induzir a expressão de *c-Myc*. Paralelamente a essa hipótese, já foi mostrado que o NFAT interage com

p300, um coativador transcricional que liga remodelamento de cromatina com transcrição (Chan & La Tangué, 2001), para induzir a atividade de diferentes promotores, como *IL-2*, *IL-5* e *Nur77* (Garcia-Rodriguez *et al.*, 1998; Avots *et al.*, 1999; Youn *et al.*, 2000; Chan & La Tangué, 2001; Liu *et al.*, 2004;). Assim, resolvemos investigar a influência de p300 na transativação do promotor de *c-Myc* mediada pelo NFAT1. Para isso, transfectamos o promotor completo de *c-Myc* (-2446pb-Luc) junto com um vetor que codifica a expressão da proteína p300 em células HEK293T.

Como pode ser visto na **Figura 13A**, a expressão de p300 reprime o promotor de *c-Myc*, o que está de acordo com a literatura (Baluchamy *et al.*, 2003; Sankar *et al.*, 2008). Entretanto, a expressão concomitante de p300 e CA-NFAT1, ao contrário da expressão de CA-NFAT1 sozinha, levou ao aumento da atividade do promotor de *c-Myc* (**Figura 13B**). Este achado explica porque as células T CD4 dos camundongos NFAT1^{+/+} expressam mais *c-Myc* em relação às NFAT1^{-/-} e reforça a importância de proteínas parceiras na regulação transcricional mediada pelas proteínas NFAT, como já descrito para diversos outros promotores (Rao *et al.*, 1997; Hogan *et al.*, 2003; Macian *et al.*, 2005). Dessa forma, mostramos que o NFAT1 pode colaborar com p300 para induzir a transcrição de *c-Myc* e sugerimos que a resposta mediada pelo NFAT1 seja dependente de outros fatores de transcrição aos quais ele se associa.

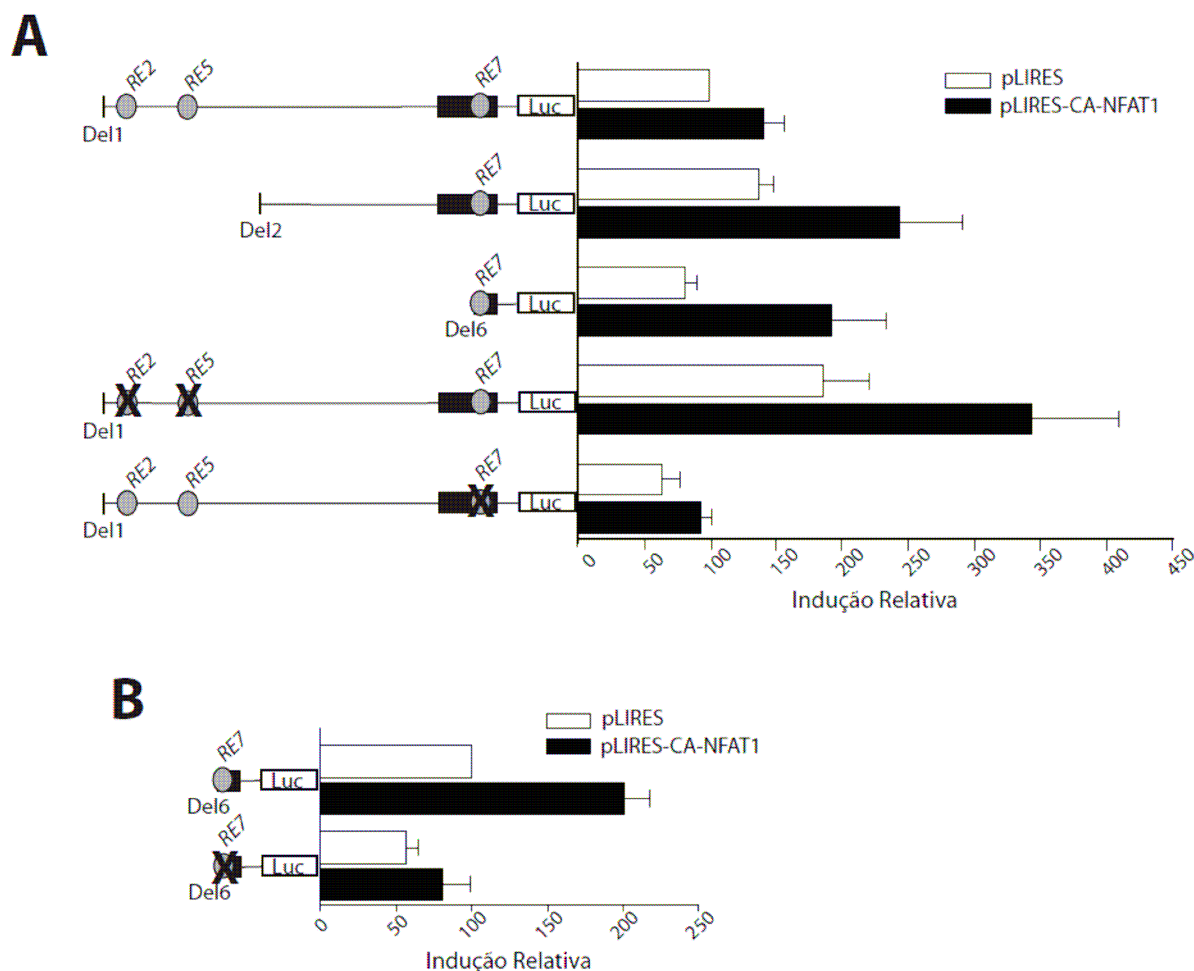


Figura 10 – A transativação do promotor de *c-Myc* humano na linhagem celular HEK293T é regulada por NFAT1: Células HEK293T foram cotransfectadas com 0,3 µg do vetor pBV-luc, contendo diferentes construções do promotor de *c-Myc* humano; 3 µg do vetor pLIREs-EGFP ou pLIREs-EGFP-CA-NFAT1 e 0,03 µg do vetor de renilla, pRL-TK. Depois de 24 h, as células foram lavadas com PBS 1x e mantidas em meio DMEM sem soro. Passadas mais 24 h, as células foram lisadas e o sobrenadante foi utilizado para a leitura de luciferase, que foi normalizada pela leitura de renilla. **(A)** Deleções e mutagênese sítio dirigida dos sítios indicados no contexto do promotor completo. **(B)** Mutagênese do sítio proximal no contexto do promotor mínimo de P2. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes, em relação à construção contendo o promotor completo (pLIREs da construção – 2446 pb).

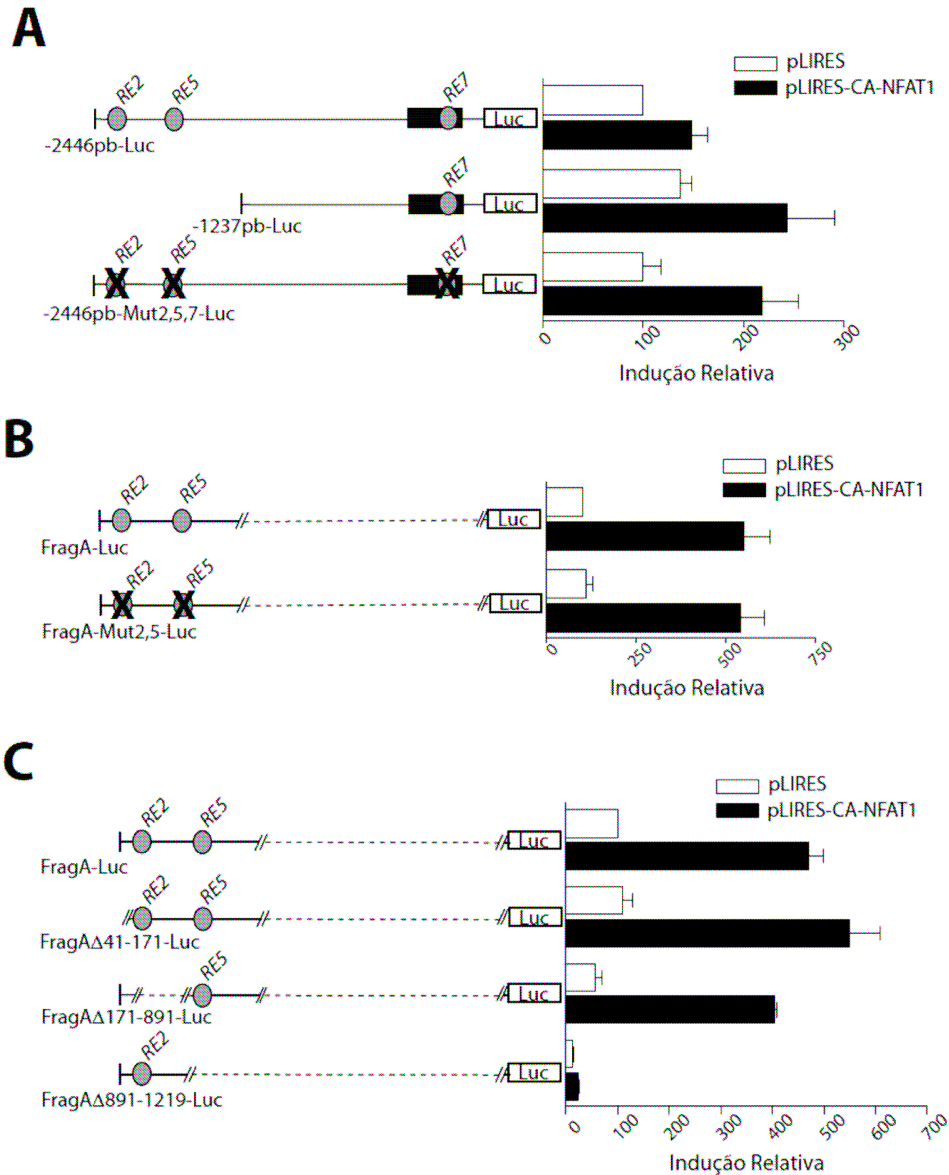


Figura 11 – Identificação de outro elemento funcional de NFAT1 no promotor de *c-Myc*: Células HEK293T foram cotransfectadas com 0,3 μ g do vetor pBV-luc, contendo diferentes construções do promotor de *c-Myc* humano; 3 μ g do vetor pLIREs-EGFP ou pLIREs-EGFP-CA-NFAT1 e 0,03 μ g do vetor de renilla, pRL-TK. Depois de 24 h, as células foram lavadas com PBS 1x e mantidas em meio DMEM sem soro. Passadas mais 24 h, as células foram lisadas e o sobrenadante foi utilizado para a leitura de luciferase, que foi normalizada pela leitura de renilla. As transativações estão normalizadas em relação ao promotor completo selvagem (pLIREs) (**A**) ou ao FragA-Luc (pLIREs) (**B** e **C**). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes.

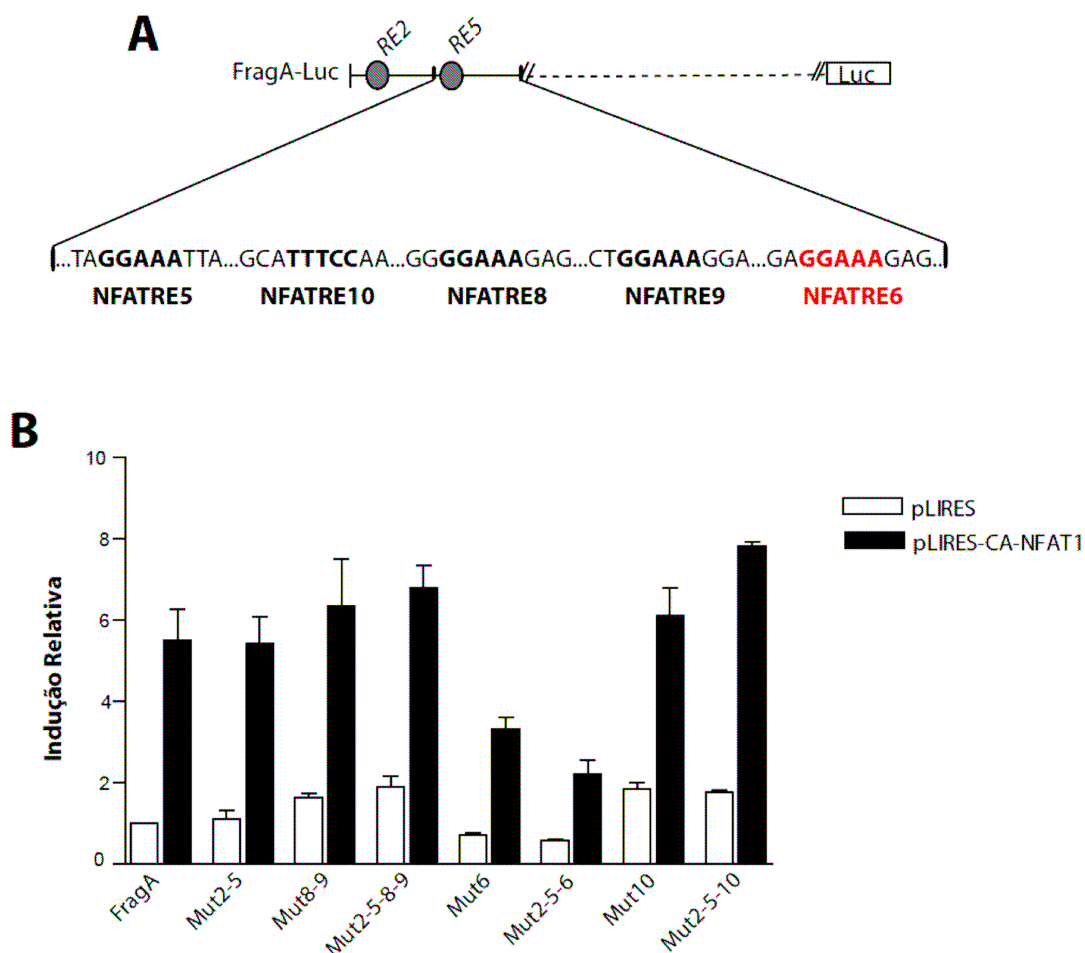


Figura 12 - O NFATRE 6 é um sítio positivo para a transativação mediada pelo NFAT1 no FragA-Luc: (A) Representação esquemática dos supostos sítios de ligação para o NFAT1 localizados na região responsiva ao CA-NFAT1 no vetor FragA Δ 891-1219-Luc. (B) Células HEK293T foram cotransfectadas com 0,3 μ g dos vetores pBV-luc; 3 μ g do pLIREs ou pLIREs-EGFP-CA-NFAT1 e 0,03 μ g do vetor de renilla, pRL-TK. Depois de 24 h, as células foram lavadas com PBS 1x e mantidas em meio DMEM sem soro. Passadas mais 24 h, as células foram lisadas e o sobrenadante foi utilizado para a leitura de luciferase, que foi normalizada pela leitura de renilla. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes, em relação ao FragA-Luc (pLIREs).

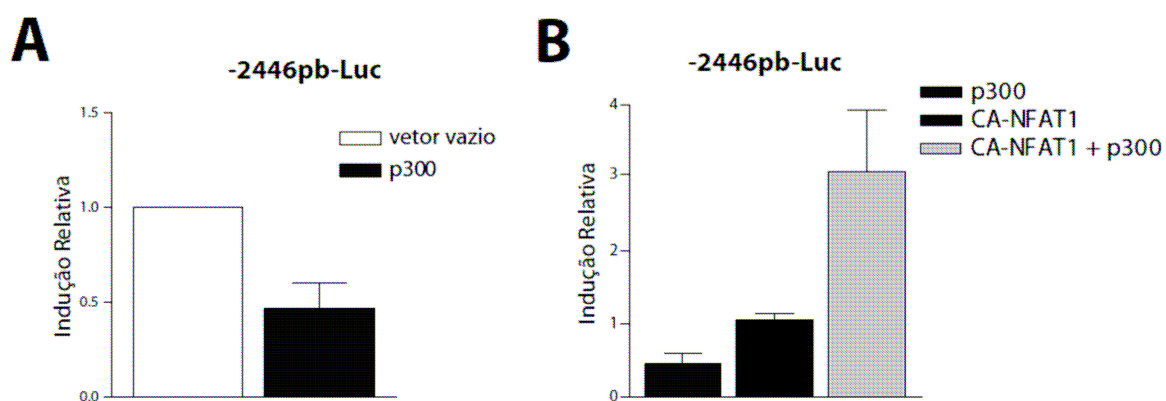


Figura 13 - p300 aumenta a transativação mediada pelo NFAT1 no promotor de *c-Myc*: Células HEK293T foram transfectadas com 0,1 μ g do vetor -2446pb-Luc; 1 μ g do vetor pLIREs-EGFP ou pLIREs-EGFP-CA-NFAT1, 0,01 μ g do vetor de renilla, pRL-TK e, quando indicado, 5 μ g pBOS-p300. Depois de 24 h, as células foram lavadas com PBS 1x e mantidas em meio DMEM sem soro. Passadas mais 24 h, as células foram lisadas e o sobrenadante foi utilizado para a leitura de luciferase, que foi normalizada pela leitura de renilla. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes, em relação ao vetor vazio (pLIREs).

4.2 REGULAÇÃO DA TRANSATIVAÇÃO DO PROMOTOR DE C-MYC PELO NFAT2

Embora todas as proteínas da família NFAT compartilhem um domínio de ligação ao DNA (DBD) altamente conservado, que confere a todas elas a mesma especificidade de ligação ao DNA (Rao *et al.*, 1997), é claro na literatura que as proteínas NFAT1 e NFAT2 podem exercer tanto funções redundantes como opostas na fisiologia celular (Macian, 2005; Rao *et al.*, 1997; Viola *et al.*, 2005; Robbs *et al.*, 2008). No que diz respeito ao promotor de *c-Myc*, em alguns tipos celulares tanto NFAT1 como NFAT2 se ligam e transativam o NFATRE 7, enquanto em outros apenas o NFAT2 tem essa função. Para investigar se o NFAT2 pode afetar diferentemente os NFATREs avaliados nesse estudo, ensaios de gene repórter superexpressando uma proteína NFAT2 constitutivamente ativa (CA-NFAT2) foram realizados em células HEK293T, com as mesmas construções do promotor de *c-Myc* utilizadas na **Figura 10**.

Diferente do que foi observado com o CA-NFAT1, a superexpressão do CA-NFAT2 sozinho aumentou a transativação do promotor completo de *c-Myc* (**Figura 14A**). Além disso, a intensidade de indução do promotor permaneceu praticamente a mesma com as construções -1237pb-Luc, -109pb-Luc, e mesmo com a construção -2446pb-Mut7-Luc, resultado que foi inesperado uma vez que o NFATRE 7 foi descrito por diferentes trabalhos como um elemento positivo para a transativação mediada pelo NFAT2. Uma vez que a mutação desse sítio não aboliu a transativação mediada pelo CA-NFAT2, este resultado indica que a responsividade do promotor completo de *c-Myc* ao CA-NFAT2 é determinada por algum outro sítio, não identificado neste estudo. Independente disso, o papel positivo do NFATRE 7 foi confirmado com a mutação desse sítio no contexto do promotor mínimo (**Figura 14B**), assim como mostrado para o CA-NFAT1 (**Figura 10B**). Esse resultado mostra que o NFATRE 7 é o único sítio responsivo ao NFAT localizado no promotor mínimo de *c-Myc* em células HEK293T. Esses resultados mostram quão duvidoso pode ser usar fragmentos de um promotor para inferir a regulação conferida por proteínas específicas. De fato, com exceção de um trabalho (Bucholz *et al.*, 2006), todos os artigos utilizaram apenas o promotor mínimo de *c-Myc* para avaliar a transativação mediada pelas proteínas NFAT.

Por último, a mutação dos sítios distais de NFAT no contexto do promotor completo de *c-Myc* aumentou tanto a transativação do vetor vazio quanto a do vetor que expressa o CA-NFAT2 (**Figura 14A**). Esses dados estão de acordo com o resultado obtido com o CA-NFAT1 (**Figura 10A**), mas apesar dos sítios distais aparentemente terem um papel negativo para a transativação do NFAT2, eles não são dominantes sobre os outros NFATREs, como

mostrado para o NFAT1. Juntos, esses resultados indicam que o CA-NFAT2 é capaz de transativar o promotor completo de *c-Myc* através de um elemento que ainda não foi identificado e que o NFATRE 7 não é o sítio positivo preponderante para o CA-NFAT2. Além disso, esses dados demonstram que os NFATRE 2 e 5 são negativos, mas não preponderantes para a transativação mediada pelo CA-NFAT2.

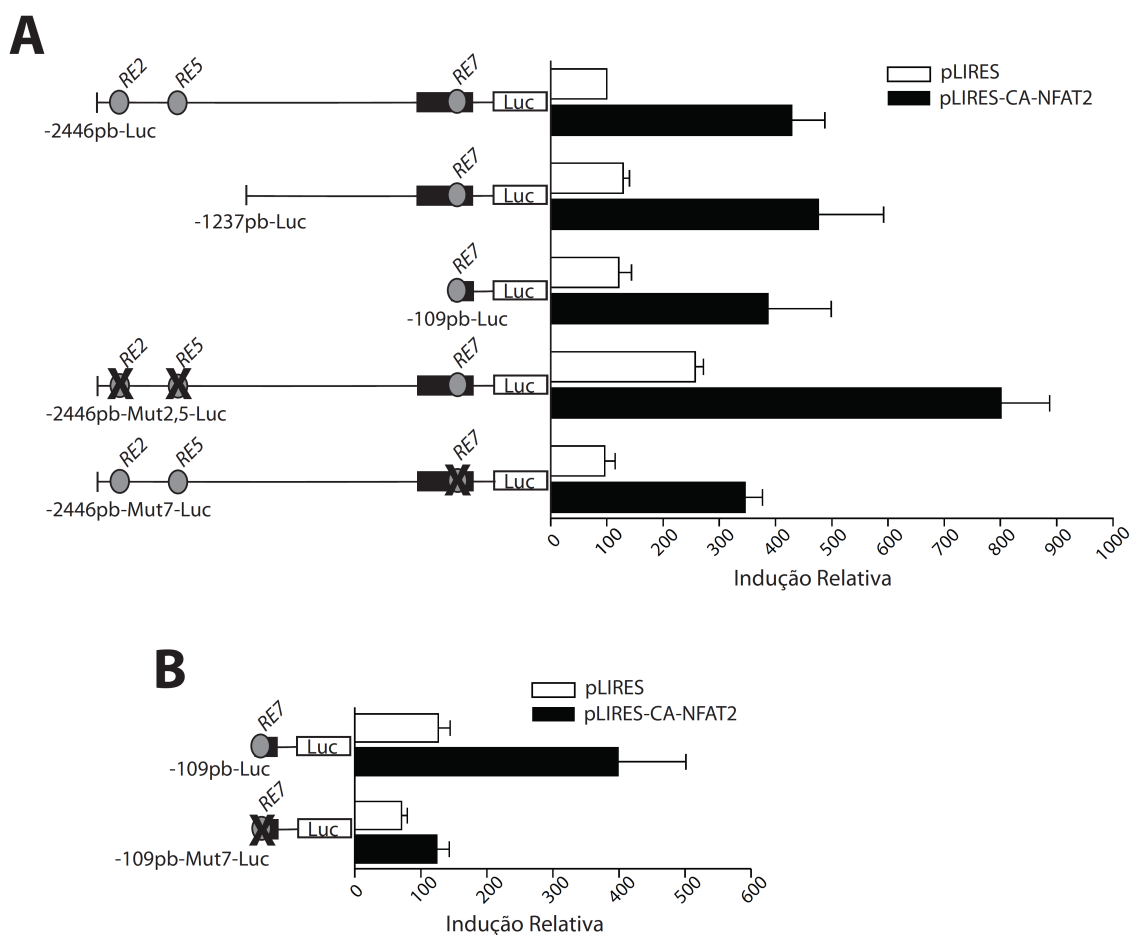


Figura 14 – A regulação do promotor de *c-Myc* pelo NFAT2 ocorre preponderantemente por elementos positivos: Células HEK293T foram cotransfectadas com os plasmídeos de luciferase pBV-luc (0,3 μ g), pLIREs ou pLIREs-EGFP-CA-NFAT2 (3 μ g) e pRL-CMV (0,03 μ g). Depois de 48h, as células foram lisadas e o sobrenadante foi utilizado para a leitura de luciferase, que foi normalizada pela leitura de renilla. **(A)** Deleções e mutagênese sítio dirigida dos sítios indicados no contexto do promotor completo. **(B)** Mutagênese do sítio proximal no contexto do promotor mínimo de P2. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes, em relação ao vetor vazio (pLIREs)

4.3 REGULAÇÃO DA FUNÇÃO DO NFAT1 PELA PROTEÍNA IRF-2BP2

4.3.1 A proteína IRF-2BP2 reprime genes de citocina regulados pelo NFAT1

4.3.1.1 A proteína IRF-2BP2 reprime a transativação de genes mediados pelo NFAT1

A proteína IRF-2BP2 foi previamente identificada em nosso laboratório como um parceiro proteico do fator de transcrição NFAT1 (Carneiro *et al.*, 2011). Apesar de ter sido descrita como um repressor transcrricional pela maioria dos trabalhos na literatura (Childs & Goodbourn, 2003; Koeppel *et al.*, 2009, Yeung *et al.*, 2011), já foi relatado que a IRF2-BP2 ativa a expressão de VEGFA, uma citocina angiogênica importante para a revascularização de músculo isquêmico (Teng *et al.*, 2010). Com o objetivo de entender o papel dessa nova interação entre IRF-2BP2 e NFAT1, testou-se o efeito da IRF-2BP2 na transcrição de genes sabidamente regulados pelo NFAT1, utilizando ensaios de gene repórter de luciferase em células Jurkat. Essas células foram transfectadas por eletroporação e depois de 24 horas, elas foram ativadas por mais 6 horas com PMA e ionomicina para permitir a ativação e a translocação nuclear do NFAT1.

Inicialmente, utilizamos o plasmídeo repórter 3xNFAT-Luc, que contém três cópias do sítio consenso de ligação para NFAT-AP-1 do promotor de IL-2. Como mostrado na **Figura 15A**, a expressão de NFAT1 induziu a atividade do promotor 3xNFAT-Luc, conforme esperado. Entretanto, a expressão concomitante de NFAT1 com quantidades crescentes de IRF-2BP2 levou a uma diminuição desse sinal de forma dose-dependente, indicando uma função repressiva para a IRF-2BP2. Em seguida, avaliamos a função da IRF-2BP2 na transativação dos promotores proximais de *IL-2* e de *IL-4*. Na **Figura 15B e C** mostramos que o NFAT1 induziu a transativação desses promotores, mas que a cotransfecção com a IRF-2BP2 também reduziu essa ativação mediada pelo NFAT1, da mesma maneira que observamos com o 3xNFAT-Luc. Por último, avaliamos a transativação mediada pelo NFAT1 do elemento $\kappa 3$ (um fragmento do promotor de *TNF- α*), que acontece independente da cooperação do NFAT1 com o parceiro proteico AP-1 e verificamos que a função repressiva da IRF-2BP2 também foi mantida nas células que coexpressavam NFAT1 e IRF-2BP2 (**Figura 15D**, à direita). Esses dados sugerem que a IRF-2BP2 tem um efeito repressor na transativação mediada pelo NFAT1 e que este efeito é independente da cooperação do NFAT1 com o fator de transcrição AP-1.

4.3.1.2 A proteína IRF-2BP2 diminui a expressão dos genes de citocina IL-2 e IL-4

Uma vez que a IRF-2BP2 reprime a transcrição das citocinas estudadas, o próximo passo foi verificar se essa repressão era refletida em nível proteico. Para este fim, o efeito da superexpressão de IRF-2BP2 na expressão endógena das citocinas IL-2 e IL-4 foi avaliado em linfócitos primários murinos. Assim, células T CD4 primárias foram purificadas de camundongos C57/BL6 e transduzidas com retrovírus contendo os vetores pLIREs-EGFP ou pLIREs-EGFP-IRF-2BP2. 24 h após a transdução, as células foram estimuladas com PMA e ionomicina por 6 h, fixadas, marcadas com anticorpos específicos para IL-2 e IL-4 e analisadas por citometria de fluxo, para determinar a marcação intracelular das citocinas em questão. Como mostrado na **Figura 16**, os linfócitos infectados com IRF-2BP2 apresentaram uma diminuição dos níveis de IL-2 e IL-4 em relação aos linfócitos transduzidos com o vetor vazio. Esses dados corroboram os dados de transativação dos promotores de IL-2 e IL-4 (**Figura 15**) e demonstram a importância da IRF-2BP2 em reprimir a expressão de genes alvo de NFAT1.

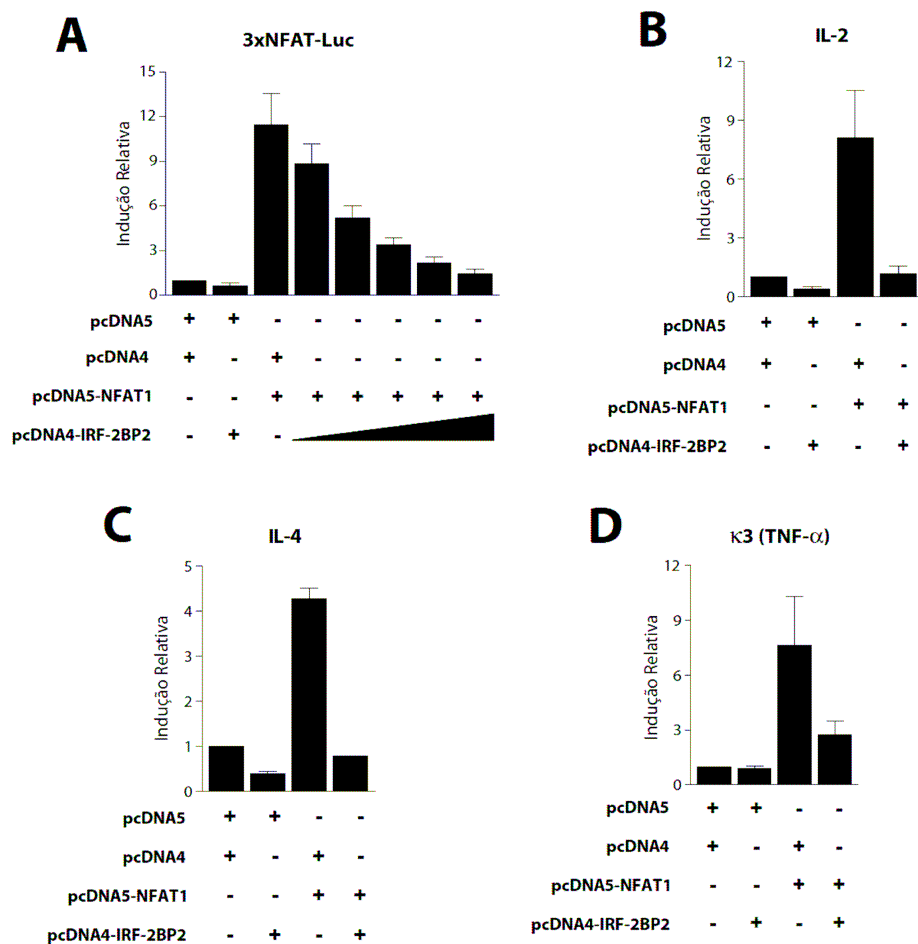


Figura 15 – A proteína IRF-2BP2 reprime a transativação mediada pelo NFAT1: (A e B) Células Jurkat foram eletroporadas com 1 µg dos vetores de luciferase indicados em cada letra; 0,1 µg do vetor de renilla, pRL-TK; 8 µg de cada um dos vetores vazios e/ou 8 µg de pcDNA5-NFAT1 e 0,5 a 8 µg (A) ou 8 µg (B-D) de pcDNA4-IRF-2BP2. 24 h após a transfecção, as células foram estimuladas com PMA (10 nM) e ionomicina (1 µM) por mais 6 h. As células foram então lisadas e o sobrenadante foi utilizado para a leitura de luciferase, que foi normalizada pela leitura de renilla. Os resultados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes em relação à transativação obtida com os vetores vazios (pcDNA5 e pcDNA4).

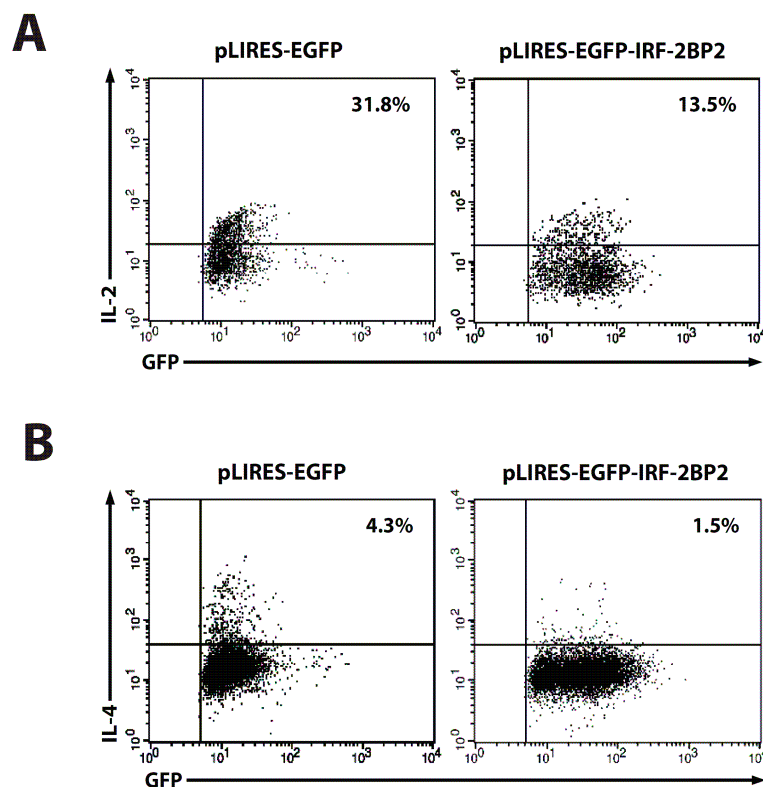


Figura 16 - A superexpressão da proteína IRF-2BP2 reprime a expressão de citocinas em linfócitos primários: Linfócitos primários T CD4 extraídos de linfonodos totais de camundongos C57/BL6 foram estimulados *in vitro* com anti-CD3 (1 μ g/mL) e anti-CD28 (1 μ g/mL) por 48 h. Após esse período, as células foram transduzidas com pLIREs-EGFP ou pLIREs-EGFP-IRF-2BP2. 24 h após a transdução, as células foram re-estimuladas com PMA (10 nM) e ionomicina (1 μ M) por 6 h. Em seguida, as células foram recolhidas, fixadas, permeabilizadas e marcadas com anti-IL-2-ficoeritrina (1:200) e anti-IL-4-aloficocianina (1:50). A marcação das citocinas intracelulares IL-2 e IL-4 foi analisada por citometria de fluxo.

4.3.2 A função de repressão da IRF-2BP2 é restrita à proteína NFAT1 dentro da família NFAT

As citocinas IL-2 e IL-4 também são alvos de outras proteínas da família NFAT (Rao *et al.*, 1997; Macian, 2005; Viola *et al.*, 2005). Portanto, a repressão observada nos ensaios de marcação de citocina intracelular poderia ser em função da repressão da IRF-2BP2 sobre outros membros da família NFAT. Entretanto, a IRF-2BP2 foi pescada em um ensaio de duplo-híbrido, onde apenas a região C-terminal da proteína NFAT1 foi utilizada (Carneiro *et al.*, 2011). Essa região tem pouca conservação entre as proteínas NFAT e portanto sugeria que o papel repressor da IRF-2BP2 ocorresse apenas sobre a função de NFAT1. Para avaliar se a IRF-2BP2 realmente não tem função sobre os outros membros da família NFAT, foram realizados ensaios de transativação em células Jurkat, utilizando o vetor 3xNFAT-Luc e a superexpressão das proteínas NFAT1, NFAT2, NFAT3 e NFAT4, além da proteína NFAT1ΔC, que como o nome sugere, não possui a região do C-terminal do NFAT1, que interage com a IRF-2BP2.

Após 24 horas de eletroporação, as células transfectadas foram estimuladas com PMA e ionomicina e como pode ser observado na **Figura 17**, a transativação mediada tanto pelo NFAT1ΔC quanto pelo NFAT2 foi menor que a transativação mediada pelo NFAT1 selvagem, o que faz sentido já que o TAD C-terminal do NFAT1, que não está presente no NFAT1ΔC nem no NFAT2, é um domínio de transativação. No entanto, o fenótipo repressor da IRF-2BP2 observado na transativação mediada pelo NFAT1 foi abolido quando o C-terminal do NFAT1 foi deletado, sugerindo que a interação, que ocorre entre a IRF-2BP2 e o C-terminal do NFAT1 (Carneiro *et al.*, 2011), é fundamental para o fenótipo de repressão. Do mesmo modo, a IRF-2BP2 não reprimiu a transativação mediada pelo NFAT2, indicando que seu fenótipo repressor é específico para o NFAT1. As proteínas NFAT3 e NFAT4 não induziram a transativação do vetor 3xNFAT-Luc nos nossos ensaios, então não foi possível avaliar a função da IRF2-BP2 na transativação mediada por esses genes. Apesar disso, foi mostrado por ensaios de *pull-down* que a IRF-2BP2 não é capaz de interagir com outras proteínas da família NFAT (Carneiro *et al.*, 2011). Assim, nossos dados sugerem que o fenótipo repressor da IRF-2BP2 é restrito ao NFAT1 dentro da família NFAT.

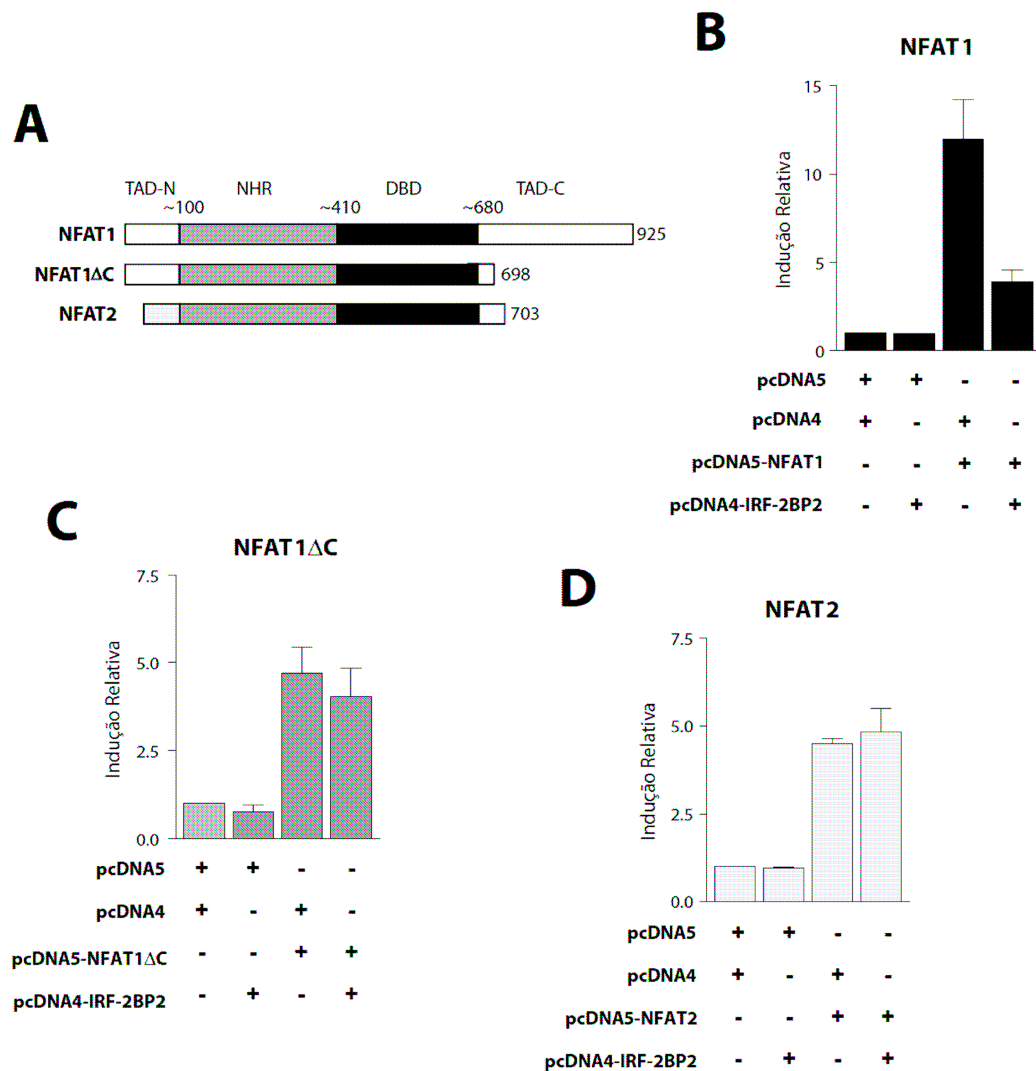


Figura 17 - A IRF-2BP2 não é capaz de reprimir a transativação mediada pelas proteínas NFAT1ΔC e NFAT2: (A) Representação esquemática das proteínas NFAT1, NFAT1ΔC e NFAT2. (B-D) Células Jurkat foram eletroporadas com 1 µg do vetor 3xNFAT-Luc; 0,1 µg do vetor de renilla, pRL-TK; 8 µg de cada um dos vetores vazios e/ou 8 µg de pcDNA4-IRF-2BP2 e 8 µg de um dos vetores de NFAT: pcDNA5-NFAT1 (B), pcDNA5-NFAT1ΔC (C) ou pcDNA3-NFAT2 (D). 24 h após a transfecção, as células foram estimuladas com PMA (10 nM) e ionomicina (1 µM) por mais 6 h. As células foram então lisadas e o sobrenadante foi utilizado para a leitura de luciferase, que foi normalizada pela leitura de renilla. Os resultados estão expressos como média ± EPM de pelo menos três experimentos independentes em relação à transativação obtida com os vetores vazios (pcDNA5 e pcDNA4).

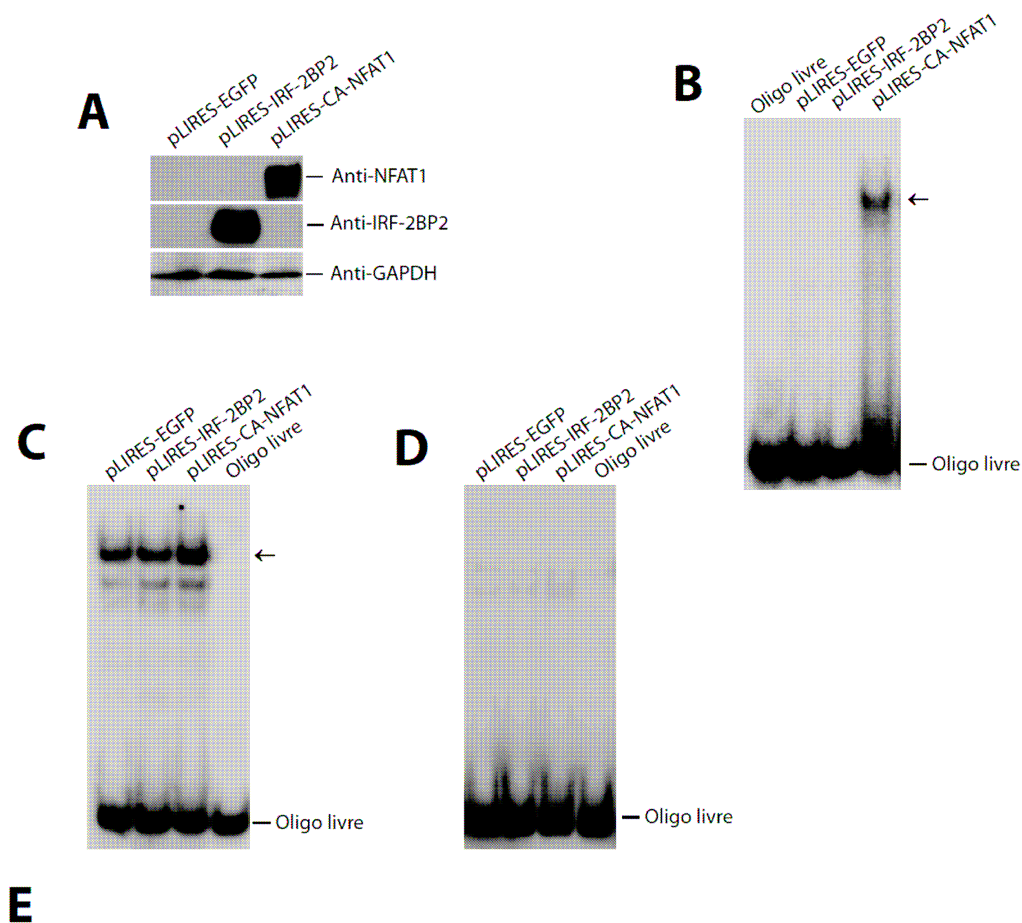
4.3.3 A função repressora da IRF-2BP2 não parece ocorrer via ligação direta ao DNA

Até aqui, nossos dados mostraram que a IRF-2BP2 é um regulador negativo da proteína NFAT1, aparentemente pela supressão da atividade transcricional do NFAT1. Além do NFAT1, descrito nesse trabalho, a IRF-2BP2 também interage e reprime a função de IRF-2 (Childs & Goodbourn, 2003). Entretanto, o mecanismo pelo qual a IRF-2BP2 reprime seus genes alvo não é conhecido. A proteína IRF-2BP2 apresenta um domínio *zinc finger* do tipo C4 em seu N-terminal (Childs & Goodbourn, 2003), que é frequentemente encontrado no domínio de ligação ao DNA de diversas proteínas (Laity *et al.*, 2001), tornando possível que a IRF-2BP2 se ligue ao DNA. Assim, testamos a possibilidade da IRF-2BP2 se ligar diretamente ao DNA por ensaios de EMSA.

Uma vez que a IRF-2BP2 reprime a transativação do plasmídeo 3xNFAT-Luc, utilizamos um oligonucleotídeo que constitui o sítio de ligação do NFAT ao DNA no promotor de IL-2, exatamente a mesma sequência encontrada na construção 3xNFAT-Luc. Esse oligo marcado radioativamente foi incubado com o extrato nuclear de células HEK293T transfectadas com os vetores pLIREs-EGFP, pLIREs-EGFP-IRF-2BP2 ou pLIREs-EGFP-CA-NFAT1, o último utilizado como controle positivo de ligação. A **Figura 18B** mostra que o CA-NFAT1 se liga ao oligo de IL-2 selvagem, como esperado, mas que não existe ligação entre as proteínas do extrato nuclear de células expressando o vetor vazio, nem do extrato das células que expressam IRF-2BP2, indicando que a IRF-2BP2 não se liga diretamente ao DNA.

Uma justificativa para esse resultado era a de que a IRF-2BP2 pudesse se ligar numa região localizada nas extremidades desse oligo, que contém 29 pb (**Figura 18E**), o que poderia dificultar sua ligação no EMSA, enquanto isso não ocorreria nos ensaios de transativação, pois a sequência desse oligo está representada 3x *in tandem* no 3xNFAT-Luc. Para excluir essa hipótese, desenhamos outros dois oligos a partir do oligo de IL-2, estendendo sua sequência para 5' ou 3' (**Figura 18E**). Algumas proteínas endógenas das células HEK se ligam no oligo estendido para 5', uma vez que dois complexos DNA-proteína são observados com os extratos nucleares das células transfectadas tanto com o pLIREs-EGFP vazio, quanto com IRF2-BP2 e CA-NFAT1, mas não são observados com o oligo livre (**Figura 18C**). Note que o complexo DNA-proteína maior é intensificado com o extrato de células superexpressando CA-NFAT1. Esse dado mostra que o CA-NFAT1 é capaz de se ligar no oligo estendido para 5'. Entretanto, nenhuma das bandas é intensificada com o extrato contendo IRF-2BP2 e também não há formação de um novo complexo, mostrando que a IRF-

2BP2 não se liga a este oligo. Por último, nenhum complexo foi observado com o oligo estendido para 3' (**Figura 18D**). O extrato celular que contém CA-NFAT1 não se liga a este oligo, conforme esperado, pois a sequência GGAAA, que liga NFAT, não está presente neste último (**Figura 18E**). Assim, o ensaio de EMSA com esses dois novos oligos confirmou que a IRF-2BP2 não se liga a nenhuma sequência contida no oligo de IL-2 (**Figura 18C e D**). Esse conjunto de resultados sugere fortemente que a ligação direta da BP2 ao DNA não é o mecanismo pelo qual ela exerce sua função repressora.



Oligo de IL-2 estendido para 3': 5' A AAA TTT GTT TCA TAC AGA AGG CTT TCA TTG TA 3
 Oligo de IL-2 selvagem: 5' GCC CAA AGA **GGA AAA** TTT GTT TCA TAC AG 3'
 Oligo de IL-2 estendido para 5': . 5' A GTT ACT TTT GTG TCT CCA CCC CAA AGA **GGA AA** 3'

Figura 18 – A proteína IRF-2BP2 não parece se ligar diretamente ao DNA: Células HEK293T foram transfectadas com os vetores pLIREs-EGFP; pLIREs-EGFP-IRF-2BP2 ou pLIREs-EGFP-CA-NFAT1. Após 48 h de transfecção, a extração de proteína nuclear dessas células foi realizada. O extrato proteico foi dosado e 100 µg de proteína foram utilizadas para o ensaio de *western blot* (A). (B-D) 7,5 µg desse extrato nuclear foram incubados com um oligonucleotídeo marcado radioativamente ([γ^{32} P] ATP). Os complexos DNA-proteína foram analisados pelo ensaio de EMSA e estão indicados pela seta (←). (B) Oligo contendo o sítio distal de ligação ao NFAT do promotor de IL-2 humano; (C) Oligo de IL-2 estendido para a direção 5'; (D) Oligo de IL-2 estendido para a direção 3'. (E) Representação esquemática dos três oligonucleotídeos utilizados. Esse resultado é representativo de pelo menos dois experimentos independentes.

4.4 A IRF-2BP2 ALTERA O CICLO CELULAR DAS CÉLULAS NIH3T3

4.4.1 A IRF-2BP2 atrasa a progressão do ciclo celular das células NIH3T3

Apesar da proteína IRF-2BP2 regular a função de genes críticos para a homeostasia celular, como a de IRF-2 (Childs & Goodbourn, 2003), p53 (Koeppel *et al.*, 2008) e NFAT1 (Carneiro *et al.*, 2011), pouco se sabe sobre sua contribuição fisiológica e qual a gama de genes que ela regula. Para esclarecer a função da IRF-2BP2 na progressão do ciclo celular, células NIH3T3 foram transduzidas com retrovírus contendo os vetores pLIREs-EGFP e pLIREs-EGFP-IRF-2BP2. As células transduzidas foram sincronizadas por confluência e privação de soro, replaqueadas em meio DMEM 10% por 24, 48 e 72 h, marcadas com iodeto de propídeo (PI) e analisadas por citometria de fluxo.

A **Figura 19B** mostra que o percentual de transdução após sincronização e privação de soro foi similar para as células transduzidas tanto com o vetor vazio quanto com IRF-2BP2. Além disso, o percentual de células nas fases G_0/G_1 logo após a sincronização também foi similar para as duas culturas (**Figura 20**). Entretanto, após 24 horas do replaqueamento, a diferença do percentual de células em G_0/G_1 chegava a 30%. Enquanto ~ 43 % das células expressando o vetor vazio estavam em G_0/G_1 e 57% em S ou G_2/M , ~ 73 % das transduzidas com IRF-2BP2 ainda estavam em G_0/G_1 e apenas 27% em S ou G_2/M , indicando um atraso na progressão do ciclo celular mediado pela IRF-2BP2. Após 48 h de cultura, os valores de G_0/G_1 eram de ~ 54 e 61 %, respectivamente e muito provavelmente a maioria das células transduzidas com o vetor vazio já havia completado seu primeiro ciclo de divisão nesse ponto. Após 72 h esses níveis se inverteram, como o vetor vazio apresentando 64 % de células em G_0/G_1 e a IRF-2BP2 apresentando 56 %. Esses dados mostram que a IRF-2BP2 atrasa a saída das células de G_0/G_1 , mas que esse atraso não configura um arresto de ciclo, uma vez as células conseguem progredir pelas outras fases do ciclo celular, apesar da progressão ser muito mais lenta.

Um ensaio clonogênico realizado com essas mesmas células transduzidas mostrou que após 7 e 14 dias de cultura, as células expressando o vetor vazio formaram muitos clones, enquanto que as transduzidas com a IRF-2BP2 praticamente não formaram, ou os clones eram muito pequenos (**Figura 21A**). Como o ensaio clonogênico testa a capacidade das células sobreviverem e replicarem, a indução de morte celular pela IRF-2BP2 poderia justificar o menor número de clones formados. A **Figura 21B** mostra que após 24 h de replaqueamento, no tempo onde há maior diferença de ciclo celular entre as culturas, as células transduzidas

com o vetor vazio apresentavam 1,23% de conteúdo de DNA sub-G₀, enquanto as células transduzidas com IRF-2BP2 expressavam 5,26%, indicando que a IRF-2BP2 não induz morte celular nessas células. A análise de indução de morte celular por PI não foi realizada em tempos mais tardios nas células sincronizadas, mas em ensaios onde as células NIH3T3 foram transduzidas e replaqueadas sem passarem pelo passo de confluência e privação de soro, a superexpressão de IRF-2BP2 não induziu morte até 72 h pós plaqueamento (**Figura 22B**). Nessas condições, a IRF-2BP2 também formou menos clones ou clones de menor tamanho em relação aos formados pelas células transduzidas com o vetor vazio (**Figura 22A**). Assim, esses dados sugerem que a superexpressão da IRF-2BP2 atrasa a progressão das células NIH3T3 para as fases S e G₂/M do ciclo celular, levando à formação de clones menores e em menor número em relação ao vetor vazio e que esse fenótipo aparentemente não envolve a indução de morte celular.

4.4.2 As células superexpressando IRF-2BP2 apresentam níveis reduzidos de mRNA de *c-Myc* e de ciclina D1 e níveis aumentados de ciclina D2

Dado que a superexpressão de IRF-2BP2 atrasa a progressão das células NIH3T3 para as fases S e G₂/M do ciclo celular, avaliamos a expressão do mRNA de genes importantes durante G₁ e durante a transição de G₁/S das culturas transduzidas com pLIREs-EGFP ou pLIREs-EGFP-IRF-2BP2. As células transduzidas também foram replaqueadas após confluência e privação de soro e o mRNA total foi extraído após 0, 6, 12, 24 e 48 h. A expressão do mRNA foi avaliada por PCR em tempo real.

Analizando a expressão dos genes de *c-Myc* e de ciclina D1, que são expressos antes do ponto de restrição de G₁, observamos que o pico de expressão de *c-Myc* em células transduzidas com o vetor vazio foi em 12 h após a ressuplementação com soro (**Figura 23A**). Entretanto, as células que superexpressam IRF-2BP2 não foram capazes de induzir a expressão de *c-Myc* aos níveis obtidos com o vetor vazio. Enquanto os níveis de *c-Myc* chegaram a aumentar 20 x nas células com o vetor vazio, as células expressando IRF-2BP2 só aumentaram 6 x. Nós também observamos que a expressão de ciclina D1 aumenta em 12 h nas células transduzidas com o vetor vazio, com pico em 24 h, quando o mRNA é induzido 6 x (**Figura 23B**). Curiosamente, a expressão de ciclina D1 não foi induzida nas células transduzidas com a IRF-2BP2 durante todo o período avaliado. Entretanto, observamos que as células transduzidas com IRF-2BP2 induziram a expressão de ciclina D2, que por sua vez,

não é induzida nas células transduzidas com o vetor vazio (**Figura 23B e C**). O aumento de ciclina D2 já foi observado em 6 h, com pico em 12 e 24 h, quando há aumento de 3,5 x.

Apesar da diminuição da expressão de *c-Myc* e da indução de ciclina D2 invés de D1, a expressão das ciclinas E2 e A2 aumentou nas duas culturas após 24 e 48 h. Surpreendentemente, em 24 h a expressão de ciclina E2 foi maior nas células transduzidas com a IRF-2BP2. Enquanto a indução foi de 4,5 vezes para o vetor vazio, ela chegou a 13 vezes para a IRF-2BP2. Em relação à ciclina A2, apesar de sua atividade ser importante durante a fase S do ciclo celular, sua expressão começa a ser detectada no final de G₁ (Dubravka & Scott, 2000). Nós não encontramos diferenças na expressão de ciclina A2 entre as células transduzidas com o vetor vazio ou com a IRF-2BP2.

Esses resultados mostram que a superexpressão de IRF-2BP2 diminui a indução dos genes de *c-Myc* e ciclina D1, induzidos antes do ponto de restrição de G₁, mas que esse fenótipo não impede a indução dos genes de ciclina E2 e A2, que são expressos no final de G₁ e na transição de G₁/S, sugerindo que a diferença de expressão de genes de ciclina não é o mecanismo pelo qual a IRF-2BP2 atrasa a progressão do ciclo celular. A regulação do ciclo celular é extremamente complexa e envolve diferentes famílias proteicas além das ciclinas, como as CDKs e CKIs (Dubravka & Scott, 2000). Assim, iremos avaliar a expressão dessas moléculas nos próximos experimentos.

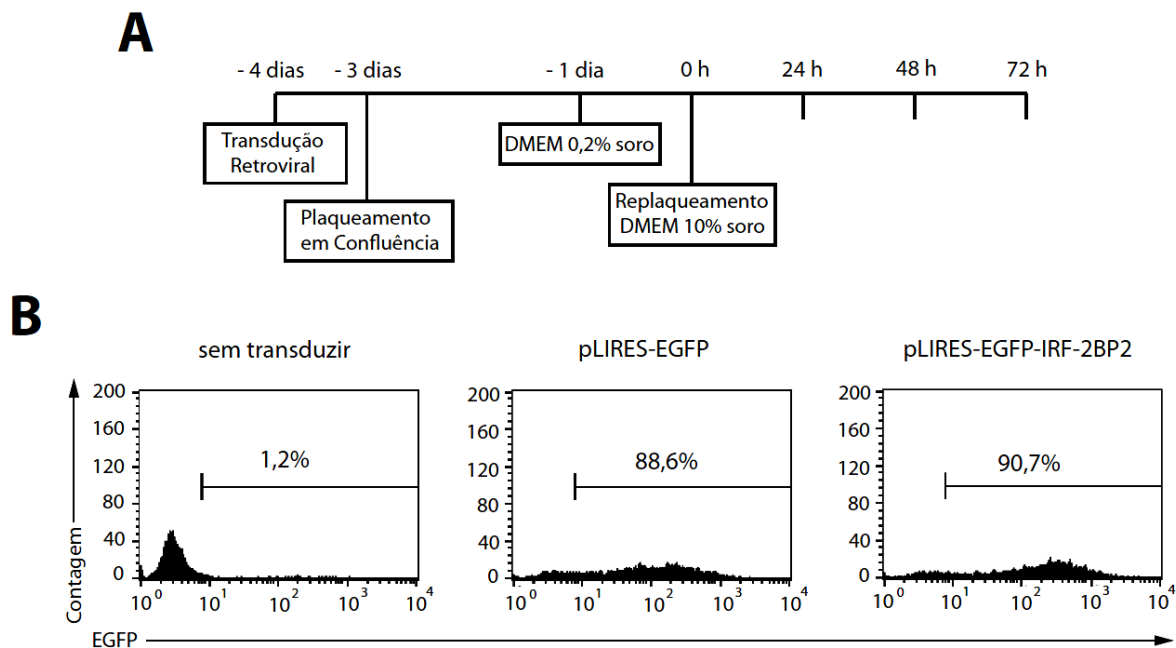


Figura 19 - Percentual de transdução após confluência e privação de soro de células NIH3T3: (A) Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para a análise de ciclo e morte celular das células NIH3T3. Essas células foram transduzidas com retrovírus contendo os vetores pLIREs-EGFP ou pLIREs-EGFP-IRF-2BP2. No dia seguinte, as células foram plaqueadas em confluência e dois dias depois, o meio de cultura foi substituído por DMEM 0,2% SFB. 24 horas após a troca do meio, as células foram soltas e replaqueadas em DMEM 10% SFB pelos tempos indicados, quando as análises foram realizadas. (B) Percentual de transdução no tempo do início dos experimentos (0 h).

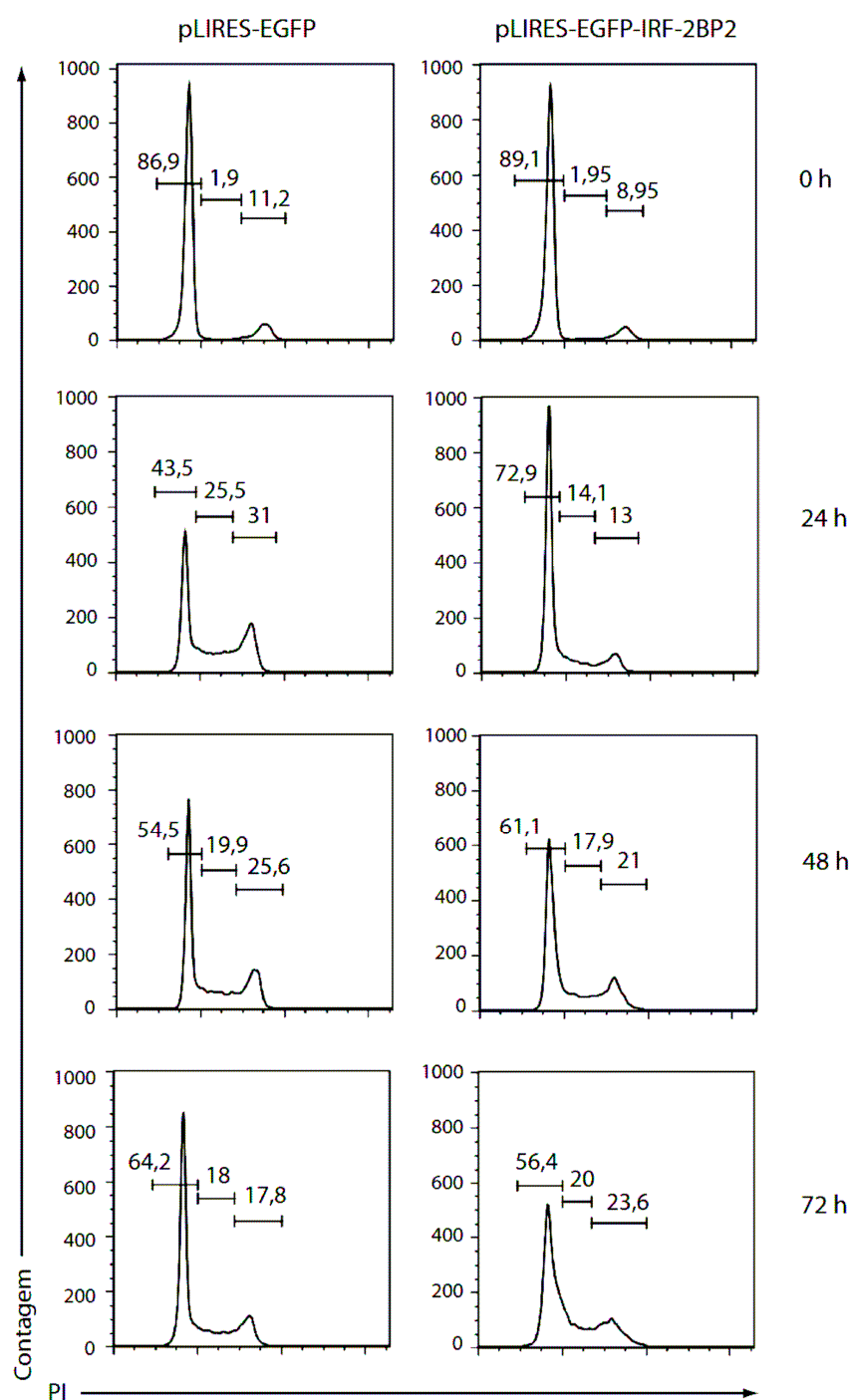


Figura 20 – A superexpressão de IRF-2BP2 atrasa a progressão do ciclo celular de células NIH3T3: Células NIH3T3 foram transduzidas com retrovírus contendo os vetores pLIREs-EGFP e pLIREs-EGFP-IRF-2BP2. 24 h após a transdução, as células foram mantidas em confluência e privação de soro conforme descrito na **Figura 19**. Em seguida, as células foram replaqueadas pelos tempos indicados, depois tripsinizadas, marcadas com iodeto de propídeo e analisadas por citometria de fluxo. A percentagem de células em cada uma das fases do ciclo celular (G₀/G₁, S, G₂/M, respectivamente) está indicada na figura. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

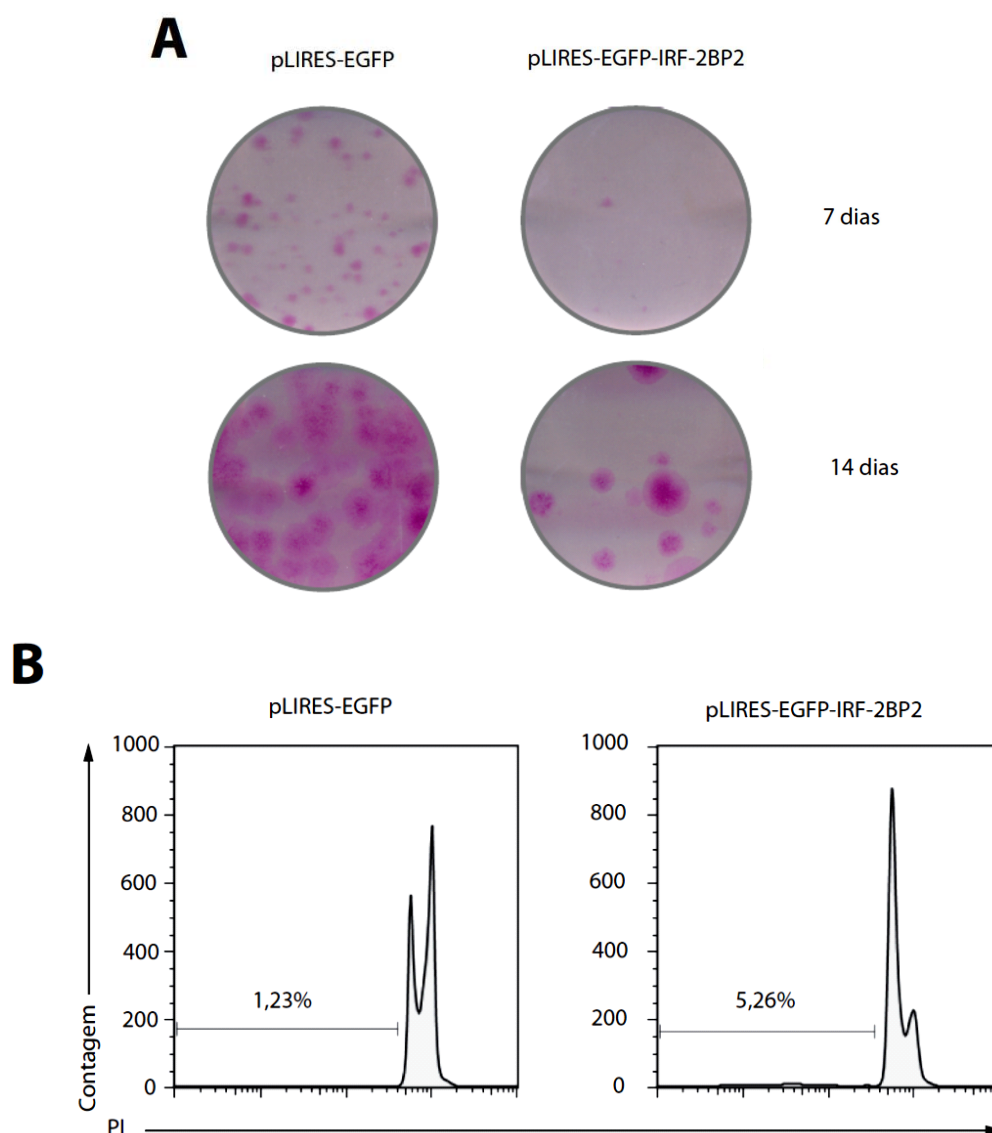


Figura 21 – A supereexpressão de IRF-2BP2 leva à formação de menos clones, mas isso aparentemente não está relacionado com indução de morte celular: Células NIH3T3 foram transduzidas com retrovírus contendo os vetores pLIREs-EGFP e pLIREs-EGFP-IRF-2BP2. 24 h após a transdução, as células foram mantidas em confluência e privação de soro conforme descrito na **Figura 19**. Em seguida, as células foram replaqueadas. **(A)** Nos tempos indicados, o meio de cultura foi removido, as placas de cultura foram lavadas com PBS 1x e em seguida coradas com cristal violeta. **(B)** Após 24 horas de cultura, as células foram tripsinizadas, marcadas com iodeto de propídeo e analisadas por citometria de fluxo. O percentual de conteúdo sub-G₀ está indicado. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

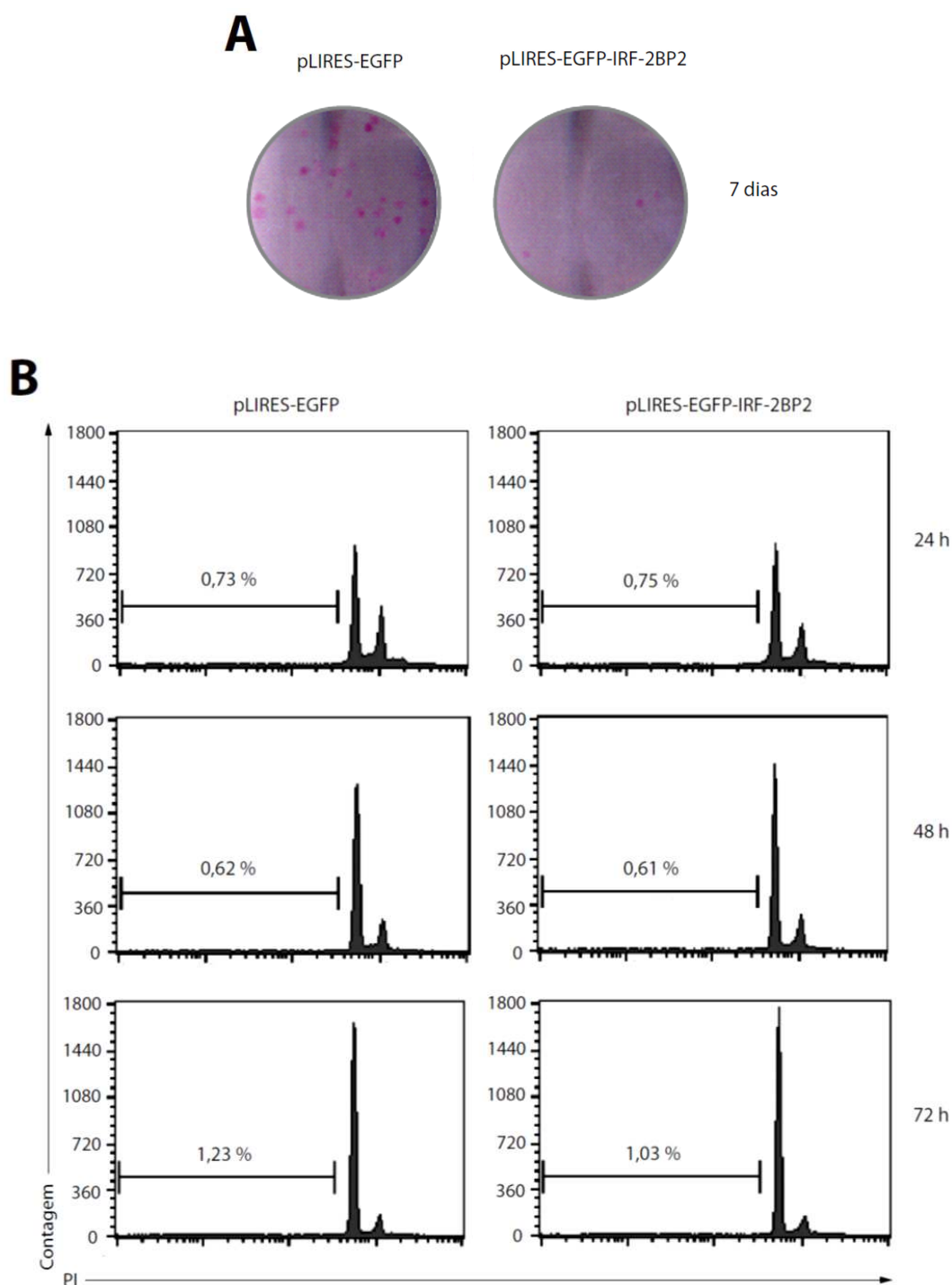


Figura 22 – Em células não sincronizadas, a supereexpressão de IRF-2BP2 também leva à formação de menos clones, sem indícios de indução de morte celular: Células NIH3T3 foram transduzidas com retrovírus contendo os vetores pLIREs-EGFP e pLIREs-EGFP-IRF-2BP2. 24 h após a transdução, as células foram replaqueadas. **(A)** 7 dias após o plaqueamento, o meio de cultura foi removido, as placas de cultura foram lavadas com PBS 1x e em seguida coradas com cristal violeta. **(B)** Após os tempos indicados, as células foram tripsinizadas, marcadas com iodeto de propídeo e analisadas por citometria de fluxo. O percentual de conteúdo sub- G_0 está indicado. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes.

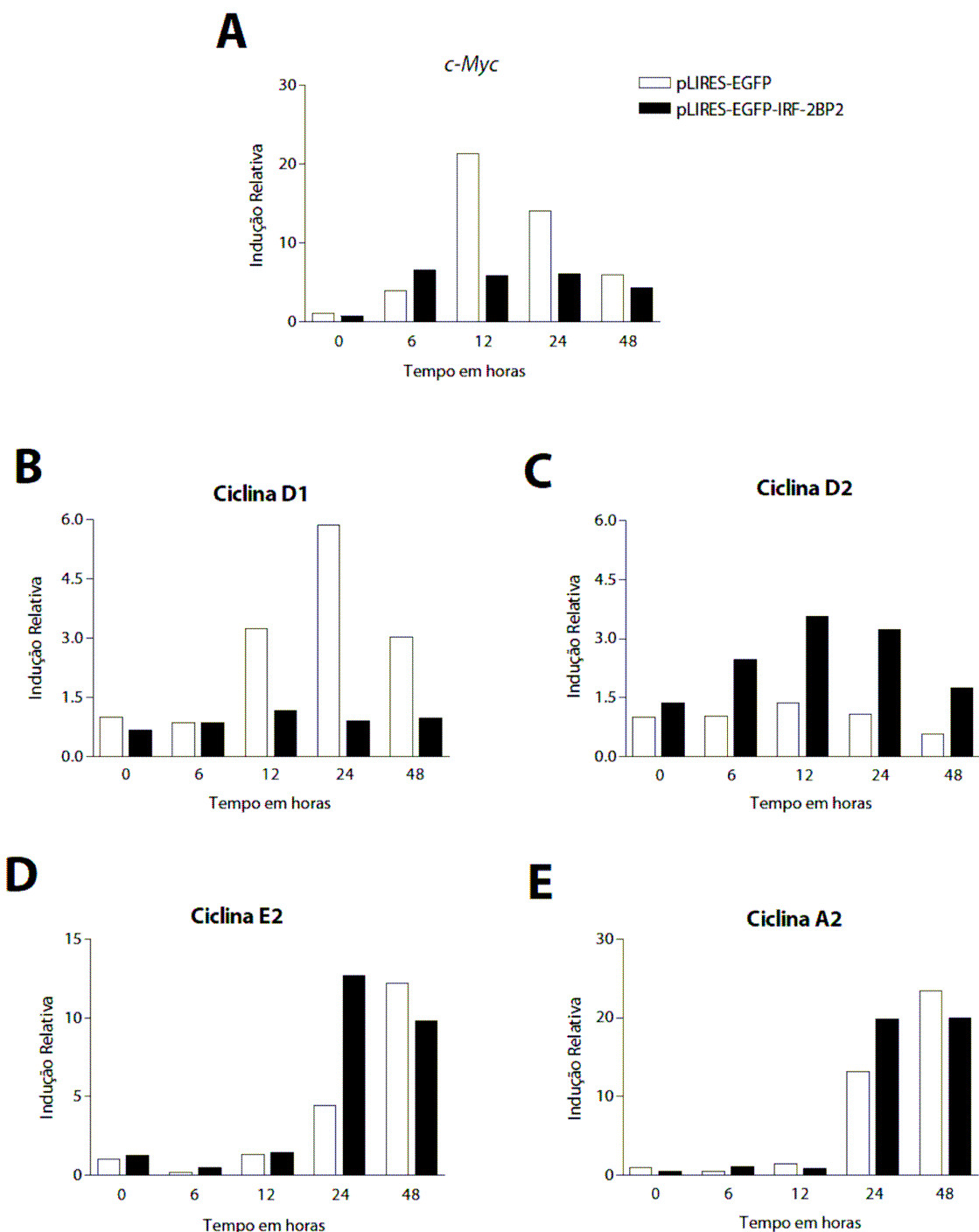


Figura 23 – A superexpressão de IRF-2BP2 leva à diminuição dos níveis de mRNA de *c-Myc* e ciclina D1 e ao aumento de ciclina D2: Células NIH3T3 foram transduzidas com retrovírus contendo os vetores pLIREs-EGFP e pLIREs-EGFP-IRF-2BP2. 24 h após a transdução, as células foram mantidas em confluência e privação de soro conforme descrito na Figura 19. Em seguida, as células foram replaqueadas pelos tempos indicados. O RNA celular total foi extraído, o cDNA sintetizado e a expressão dos genes de *c-Myc* (A) e das ciclinas D1 (B), D2 (C), E2 (D) e A2 (E) foi avaliada por PCR em tempo real. A normalização foi feita através da expressão do gene constitutivo HPRT e está representada em relação ao 0 h (pLIREs-EGFP). Os resultados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO

5.1 REGULAÇÃO DO PROTO-ONCOGENE C-MYC PELO NFAT1

Na primeira parte deste trabalho, nós caracterizamos a regulação transcricional do promotor de *c-Myc* pelo fator de transcrição NFAT1. Trabalhos anteriores relacionaram o aumento de expressão de *c-Myc* com um sítio de ligação para NFAT localizado no promotor mínimo de *c-Myc* (chamado aqui de NFATRE 7), que é induzido tanto pelo NFAT2 (Buchholz *et al.*, 2006; Koenig *et al.*, 2010; Pham *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010) quanto pelo NFAT1 (Koenig *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010). Entretanto, regiões distais do promotor de *c-Myc* são fundamentais para a precisa regulação de sua expressão e essas regiões são frequentemente interrompidas como resultado de mecanismos genéticos como quebras e inserções provirais, que frequentemente estão associadas com a carcinogênese (Remmers *et al.*, 1986; Dudley *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2005; Wierstra I, Alves, 2008). No promotor de *c-Myc*, eu e heterocromatina estão separadas pelo MINE (*c-Myc insulator element*), que funciona como um eficiente *insulator*, localizado a aproximadamente - 2,5 kb do início de transcrição de *c-Myc* (Gombert *et al.*, 2003). Todas essas observações nos levaram a avaliar a importância do NFAT1 nesse contexto de 2,5 kb.

Primeiramente, demonstramos um importante papel regulatório para a via de Ca^{2+} /calcineurina/NFAT1 no controle da expressão do proto-oncogene *c-Myc*. Mostramos que tanto a expressão de mRNA quanto de proteína *c-Myc* são induzidos pela estimulação via TCR em linfócitos T CD4 e que essa indução é bloqueada por Ciclosporina A (**Figura 5**), fato que levou à sugestão do envolvimento das proteínas da família NFAT neste processo. Três dos quatro membros da família NFAT regulados por Ca^{2+} - NFAT1, NFAT2 e NFAT4 - são expressos em linfócitos (Rao *et al.*, 1997; Kiani *et al.*, 2000; Macian *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 2003) e qualquer um deles poderia estar envolvido na regulação de *c-Myc*, uma vez que eles se ligam à mesma sequência de DNA no promotor dos genes que regulam. Para avaliar a participação específica da proteína NFAT1, a expressão de *c-Myc* foi avaliada em linfócitos provenientes de animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} estimulados *in vitro* com anti-CD3. A diminuição de expressão da proteína *c-Myc* encontrada nos linfócitos NFAT1^{-/-} levou à suposição de que o NFAT1 estaria direta ou indiretamente ativando a expressão de *c-Myc*.

Com o objetivo de avaliar se essa relação era direta, realizamos uma análise de bioinformática, onde encontramos sete supostos sítios de ligação para NFAT no promotor de

c-Myc, conservados em humanos e camundongos (**Figura 6**). Ensaios de EMSA mostraram que *in vitro*, o NFAT1 é capaz de se ligar a três desses sítios, aparentemente com maior afinidade aos sítios distais NFATRE 2 e 5, em relação ao proximal, NFATRE 7 (**Figura 8**) previamente identificado. Nós também verificamos uma interação muito fraca entre o NFAT1 e o NFATRE 6, que a princípio não foi considerada. A ligação de NFAT1 aos dois sítios distais foi posteriormente confirmada *in vivo* por ensaios de imunoprecipitação de cromatina (ChIP), com linfócitos Th1 ativados com PMA e ionomicina (**Figura 9**). Este conjunto de resultados demonstra claramente que o NFAT1 é capaz de se ligar ao promotor de *c-Myc* e sugere que o NFAT1 exerce um papel direto na regulação desse gene.

Para caracterizar o papel do NFAT1 na expressão de *c-Myc*, realizamos ensaios de transativação com o promotor de *c-Myc* humano em células HEK293T e mostramos que os sítios distais são elementos negativos para a transativação mediada pelo NFAT1 (**Figura 10A**), enquanto o sítio proximal é um elemento positivo (**Figura 10**). Além disso, a mutagênese dos sítios NFAT sugere fortemente que a regulação através dos sítios distais é dominante sobre a regulação conferida pelo sítio proximal, pois o NFAT1 só aumenta a atividade do promotor de *c-Myc* quando os sítios distais são abolidos (**Figura 10A**). Inesperadamente, mesmo quando os três elementos NFAT foram mutados, o CA-NFAT1 ainda era capaz de aumentar a atividade transcricional do promotor de *c-Myc*, sugerindo a presença de outro sítio positivo, mas recessivo para o NFAT1 (**Figura 11A**), que foi mapeado entre os nucleotídeos -1555 e -1227 em relação a P2, próximo do NFATRE 5 (**Figura 11C**). Uma série de mutagênese sítio-dirigida foi realizada em vários supostos sítios NFAT localizados nessa região mapeada, e novos ensaios de transativação mostraram que esse sítio recessivo era o NFATRE 6 (**Figura 12**), analisado no início do estudo, mas descartado pela fraca interação com o NFAT1 no ensaio de EMSA (**Figura 8A e C**). Assim, esses dados de transativação identificaram vários elementos responsivos ao NFAT1 no promotor de *c-Myc*, suportando um modelo no qual existe uma hierarquia funcional para os elementos reguladores dependentes de NFAT. O NFAT1 se liga com maior afinidade a alguns dos elementos, como demonstrado para os sítios negativos distais, mas, quando estes elementos são rompidos ou não estão acessíveis, o NFAT1 pode se ligar aos sítios de menor afinidade, tais como o NFATRE 7 e o NFATRE 6, para regular positivamente este promotor. Contudo, essa dominância deve variar de acordo com a presença de proteínas parceiras e entre diferentes tipos celulares.

Em relação às proteínas parceiras, nós observamos uma colaboração entre NFAT1 e p300 para induzir a atividade do promotor de *c-Myc*. A inibição do promotor de *c-Myc* por p300 (**Figura 13A**) foi previamente relatada para impedir a saída prematura das células de G₀/G₁ (Baluchamy *et al.*, 2003; Sankar *et al.*, 2008). Os autores hipotetizaram que p300 estaria agindo para reprimir *c-Myc* em *resting*, mas que quando a célula fosse estimulada por mitógenos, outros fatores de transcrição que não estavam ativados agora poderiam se ligar a p300 e estimular a expressão de *c-Myc* (Sankar *et al.*, 2008). Nós sugerimos que o NFAT1 é um desses fatores, dado que a expressão de p300 junto com uma proteína NFAT1 constitutivamente ativa, que fisiologicamente necessitaria de ativação, aumenta a atividade do promotor de *c-Myc* (**Figura 13B**). O TAD N-terminal do NFAT é parcialmente mascarado em células em *resting* pelo domínio regulatório adjacente (Luo *et al.*, 1996b) e Garcia-Rodrigues & Rao (1998) mostraram que o TAD-N pode recrutar HATs como p300. A interação p300-CA-NFAT1 poderia facilitar o recrutamento de cofatores e da RNA polimerase para os promotores dependentes de NFAT. Da mesma maneira, p300 poderia acetilar o NFAT1 e aumentar sua afinidade de ligação ao DNA, como já foi demonstrado para outros fatores de transcrição, como p53 e E2F (Chan & La Thangue, 2001; Iyer *et al.*, 2004; Acharya *et al.*, 2005, Gallinari *et al.*, 2007; Roperio *et al.*, 2007). Essas possibilidades poderiam justificar o aumento na transativação do promotor provocado pela combinação p300-NFAT1 e explicar a maior expressão de *c-Myc* observada nos linfócitos NFAT1^{+/+} em relação aos NFAT1^{-/-} (**Figura 5D**). Notavelmente, a cooperação entre p300 e NFAT1 supera a regulação negativa exercida pelos NFATREs 2 e 5. Como as interações proteína-proteína contribuem para a estabilidade do complexo NFAT-AP-1 (Hogan *et al.*, 2003), a interação entre NFAT1-p300 pode aumentar a afinidade do NFAT1 pelos sítios positivos NFATRE 6 e 7. As proteínas NFAT são transativadores fracos e frequentemente estão associadas com proteínas parceiras para regular a transcrição (Cockerill, 2008). Aparentemente, isto também ocorre durante a regulação do promotor de *c-Myc* pelo NFAT1.

Uma última possibilidade que não pode ser descartada é a de que NFAT1 + p300 estejam se ligando a sítios não-NFATs no promotor de *c-Myc*, como já foi mostrado para a transativação do promotor de *Nur77* (Youn *et al.*, 2000). Nesse trabalho foi mostrado que uma proteína NFAT1 mutante, incapaz de se ligar ao DNA, continua transativando o promotor na presença de MEF2D e p300, enquanto a mutação dos sítios de MEF2D abole a transativação mediada pelo NFAT1. Da mesma maneira, para o promotor de p21, a ligação direta do NFAT1 ao DNA é dispensável e pode ser substituída pela interação do NFAT1 com Sp1/Sp3

(Santini *et al.*, 2001). Neste último trabalho, a interação entre NFAT1 e p300 não foi avaliada, mas é sabido que p300 transativa p21 em cooperação com Sp1 (Billon *et al.*, 1999), tornando possível a formação de um complexo p300-NFAT1-Sp1. Interessantemente, existem cinco sítios de Sp1 no promotor de *c-Myc*. Sabe-se que Sp1 não está ligado no promotor em células em *resting* e que quando liga, regula *c-Myc* positivamente (Wierstra & Alves, 2008). Sp1 então é um alvo interessante para a interação com NFAT1 e p300 durante a regulação do promotor de *c-Myc*. O N-terminal do NFAT1 interage com as regiões N- e C-terminal de p300 (Avots *et al.*, 1999), permitindo a interação com outras proteínas via C-terminal.

O NFATRE 2 se localiza numa região do promotor chamada MINE (“*c-Myc insulator element*”), localizada entre - 1,7 e - 3,3 kb em relação ao éxon 1 e que tem tanto atividade de *insulator*, inibindo a atividade de fatores de transcrição que se ligam a 5’ dele, quanto de repressão do promotor de *c-Myc*. A proteína CTCF se liga constitutivamente a essa região e é responsável por grande parte da atividade de *insulator* provida pelo MINE, mas não pela inibição do promotor (Gombert *et al.*, 2003) como originalmente identificado (Filippova *et al.*, 1996). Interessantemente, o NFATRE 2 e o sítio distal de CTCF estão separados por apenas 86 nucleotídeos e ambos os elementos estão presentes no fragmento de 640 pb, que está envolvido na repressão da atividade transcricional do gene *Neo^r* (Gombert *et al.*, 2003). Além disso, durante a repressão do promotor de *c-Myc*, ocorre uma dobra entre o sítio distal de CTCF e outro elemento CTCF localizado próximo do início de transcrição (Liu *et al.*, 2006). Assim, a ligação de NFAT1 ao NFATRE 2 pode contribuir para o fenótipo repressivo exercido pela região do MINE. Os mecanismos pelos quais P2 está reprimido requerem atividade de histona desacetilase (HDAC) (Albert *et al.*, 2001), e o NFAT1 é capaz de recrutar HDACs, como mostrado durante a repressão do promotor de CDK4 (Baksh *et al.*, 2002). Os mecanismos de bloqueio da iniciação da transcrição de P1 e da elongação da transcrição de P2 também requerem o recrutamento de proteínas HDAC, pelo menos em parte por deslocarem a ligação de E2F do promotor de *c-Myc* (Pullner *et al.*, 1996). Da mesma forma, o NFATRE 5 se encontra entre os nucleotídeos -1690 e - 1054 pb em relação a P1, em uma região que também forma uma estrutura curvada, como predito por modelagem computacional, de modo que essa região pode se aproximar de elementos importantes do promotor basal e influenciar a estrutura da cromatina, por posicionar os nucleossomos através da interação com proteínas histonas e outras proteínas cromossomais (Kumar & Leffak, 1989). Assim, a ligação da proteína NFAT1 aos sítios distais do promotor de *c-Myc* pode resultar no dobramento do promotor e assim permitir sua interação com outras proteínas para

reprimir a transcrição gênica. De fato, a estrutura flexível do DBD do NFAT permite várias superfícies disponíveis para a interação com diferentes parceiros transcricionais, como AP-1 (Macian, 2005; Rao *et al.*, 1997), Maf, ICER, GATA, EGR, Oct, o receptor nuclear PPAR- γ (Hogan *et al.*, 2003; Macian, 2005) e p300 (Youn *et al.*, 2000; Garcia-Rodriguez & Rao, 1998; Liu *et al.*, 2004; Avots *et al.*, 1999) permitindo assim que o NFAT integre a sinalização de Ca^{2+} com várias outras vias de sinalização (Macian, 2005).

Em nossos ensaios de transativação, embora o CA-NFAT2 também regulasse os sítios negativos distais (**Figura 14A**), esses elementos não se mostraram dominantes como visto para o CA-NFAT1 (**Figura 10A**). A regulação mediada pelo CA-NFAT2 ocorre preponderantemente por elementos positivos que não foram analisados mais a fundo no presente trabalho. Experimentos futuros serão necessários para identificar outros sítios NFAT presentes no promotor de *c-Myc*, para determinar em que contexto os diferentes sítios NFAT são usados e para entender os mecanismos moleculares envolvidos neste processo. A regulação do promotor de *c-Myc* é altamente dependente do contexto. Os mesmos fatores que exercem uma influência na transcrição de *c-Myc* em um contexto biológico ou em uma linhagem celular podem ser impotentes em outras circunstâncias (Wiestra & Alves, 2008). De fato, um estímulo que aumenta a expressão de *c-Myc* em uma condição pode diminuí-la em outra (Wiestra & Alves, 2008). Da mesma maneira, a regulação mediada pelo NFAT também já foi descrita como sendo tipo celular específica, por exemplo, para os promotores de *Cox-2* e *TNF- α* . Enquanto dois sítios NFAT são necessários para a completa transativação do promotor de *Cox-2* em células Jurkat (Iñiguez *et al.*, 2000), apenas o sítio proximal parece ser importante em carcinoma de cólon (Duque *et al.*, 2005) e em células endoteliais (Hernandez *et al.*, 2001). Assim, não excluimos a possibilidade de que as proteínas NFAT se liguem a diferentes sítios NFAT no promotor de *c-Myc* dependendo do tipo celular, do estado de ativação da célula e das diferentes funções exercidas por *c-Myc*.

A literatura descreve que a proteína NFAT1 age reprimindo o ciclo celular (Caetano *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2007, Baksh *et al.*, 2002, Robbs *et al.*, 2008) e induzindo a morte (Park *et al.*, 1996; Youn *et al.*, 2000; Oum *et al.*, 20002; Kaminuma *et al.*, 2007; Robbs *et al.*, 2008), enquanto o NFAT2 leva à progressão do ciclo celular (Neal & Clipstone; Robbs *et al.*, 2008). A proteína *c-Myc* pode induzir tanto a progressão do ciclo quanto a morte, sendo o fenótipo resultante completamente dependente do contexto celular. Como exemplo dessa dependência, a expressão de *c-Myc* leva à proliferação em células BALB/c3T3, Rat-1A e em linfócitos T (Eilers *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 2005), e à morte quando expresso em altas

concentrações ou na ausência de fatores de crescimento (Wierstra & Alves, 2008; Facchini & Penn, 1998). Assim, podemos supor que o NFAT2 induza a expressão de *c-Myc* para induzir a proliferação celular (Neal & Clipstone, 2003; Buchholz *et al.*, 2006), enquanto que o NFAT1 aumente a expressão de *c-Myc* para levar à morte e ser importante, por exemplo, para a finalização de uma resposta imune, onde os linfócitos proliferam num primeiro momento, mas depois morrem por morte celular induzida por ativação (AICD, *activation induced cell death*).

Juntos, nossos resultados mostram que a regulação do promotor de *c-Myc* pelo NFAT1 é mais complexa do que se acreditava. Além da indução da expressão de *c-Myc* conferida pelo NFATRE 7, que está localizado no promotor mínimo, o NFAT também se liga a pelo menos outros dois elementos no promotor distal. Os elementos negativos responsivos ao NFAT identificados nesse estudo podem estar contribuindo para o controle da expressão de *c-Myc* por modularem o uso dos sítios regulatórios positivos ou por prevenirem a ativação aberrante de *c-Myc*, que pode resultar em consequências deletérias como a tumorigênese. Além disso, tanto *c-Myc* quanto NFAT estão superexpressos em leucemias, linfomas, cancer pancreático, de cólon e de mama (Jauliac *et al.*, 2002; Marafioti *et al.*, 2005; Arvanitis & Felscher, 2006; Buchholz *et al.*, 2006; Vita & Henriksson, 2006; Wu *et al.*, 2007; Medyouf & Ghysdael, 2008; dentre várias outras). O NFAT controla processos críticos durante a carcinogênese, como angiogênese (Armesilla *et al.*, 1999; Hernandez *et al.*, 2001; Horsley & Pavlath, 2002), migração celular e invasão (Hernandez *et al.*, 2001; Jauliac *et al.*, 2002; Lara-Pezzi *et al.*, 2002; Zaichuk *et al.*, 2004; Yoeli-Lerner *et al.*, 2005; Yiu & Toker, 2006). Ademais, algumas vias que regulam a atividade das proteínas NFAT estão desreguladas no cancer e contribuem tanto para a progressão tumoral (Dejmek *et al.*, 2006, Jauliac *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2006) quanto para a ativação de *c-Myc* (Han *et al.*, 2004; Wierstra & Alves, 2008; Dydensborg *et al.*, 2009). Como exemplos, se incluem a via de WNT, que influencia o comportamento metastático das células de câncer de mama e frequentemente está constitutivamente ativa em câncer de cólon (Dejmek *et al.*, 2006), a via de sinalização de integrina $\alpha 6\beta 4$, que está desregulada no câncer de mama (Jauliac *et al.*, 2002) e a citocina TNF- α , que está envolvida com invasão e metástase (Yan *et al.*, 2006). Portanto, a ativação constitutiva da via de Ca^{2+} /calcineurina junto com a deleção ou mutação dos sítios negativos NFATREs 2 e 5 pode facilitar a ligação do NFAT1 aos elementos positivos e consequentemente aumentar a atividade do promotor de *c-Myc* durante a carcinogênese.

5.2 REGULAÇÃO DA FUNÇÃO DO NFAT1 PELA PROTEÍNA IRF-2BP2

As proteínas da família NFAT executam suas funções durante a transcrição gênica, podendo regular diferentes genes positiva ou negativamente. Nesse processo de regulação transcricional, as proteínas NFAT podem interagir com diferentes parceiros proteicos, que podem tanto potencializar quanto inibir sua função. Na segunda parte deste trabalho, nós investigamos a função da proteína IRF-2BP2, descrita recentemente como um novo parceiro proteico de NFAT1. Mostramos que a indução de citocinas classicamente reguladas pelo NFAT é inibida pela proteína IRF-2BP2 (**Figura 15** e **Figura 16**) e que a IRF-2BP2 reprime especificamente a função do membro NFAT1 dentro da família NFAT, sendo essa especificidade dependente do TAD-C do NFAT1 (**Figura 17**), o domínio da proteína que interage com a IRF-2BP2 (Carneiro *et al.*, 2011).

Estruturalmente, a proteína IRF-2BP2 apresenta um domínio *zinc finger* do tipo C4 em seu N-terminal (Childs & Goodbourn, 2003), que é frequentemente encontrado no domínio de ligação ao DNA de diversas proteínas (Laity *et al.*, 2001). Além disso, a IRF-2BP2 já foi encontrada em dois diferentes complexos proteicos que se ligam ao DNA (Teng *et al.*, 2010; Yeung *et al.*, 2011). Na tentativa de explicar o mecanismo pelo qual a IRF-2BP2 regula a transcrição, avaliamos a possibilidade da IRF-2BP2 se ligar diretamente ao DNA, mas nossos ensaios de EMSA não mostraram evidências de que essa ligação ocorra (**Figura 18**). Esse resultado corrobora com a descrição inicial da IRF-2BP2 como um correpressor transcricional, lembrando que os coativadores e correpressores transcripcionais não se ligam diretamente ao DNA e executam suas funções através da interação com outras proteínas ou complexos proteicos (Wray *et al.*, 2003; Burke & Baniahmad, 2000). De fato, além da ligação ao DNA, os domínios *zinc finger* também são descritos por interagirem com outras proteínas (Laity *et al.*, 2001) e apesar da interação entre NFAT1 e IRF-2BP2 ocorrer com o domínio RING C-terminal da IRF-2BP2, o domínio *zinc finger* N-terminal é fundamental para o seu mecanismo de repressão (Carneiro *et al.*, 2011). Assim, a IRF-2BP2 poderia interagir com outros TFs, componentes da maquinaria basal de transcrição, HDACs ou complexos de remodelamento da cromatina e assim interferir com a ligação do NFAT1 ao DNA, ou ainda com a montagem da maquinaria basal de transcrição. Outra hipótese é que a IRF-2BP2 possa prevenir o recrutamento ou a atividade de HATs como p300 para os promotores dependentes de NFAT1. Uma vez que a IRF-2BP2 impede a morte de células de câncer de mama mediada por NRIF3 via ação da HDAC Sir3A, foi sugerido que a IRF-2BP2 afete a acetilação de

histonas ou a deacetilação de outros fatores de transcrição por meio dessa HDAC (Tinnikov *et al.*, 2009).

Além de ser caracterizado no controle da expressão gênica durante a ativação e diferenciação de linfócitos, o papel do NFAT1 já é bem estabelecido na regulação de genes envolvidos em diferentes funções fisiológicas, como proliferação, apoptose e angiogênese (Caetano *et al.*, 2002; Iñiguez *et al.*, 2003; Yoeli-Lerner *et al.*, 2005; Robbs *et al.*, 2008). O outro parceiro descrito para IRF-2BP2, a IRF-2, também está envolvida na regulação de alguns genes de ciclo celular (Vaughan *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007). Para investigar a função da IRF-2BP2 na progressão desse ciclo, avaliamos a superexpressão de IRF-2BP2 em células NIH3T3 sincronizadas por confluência e privação de soro. Interessantemente, mostramos que a IRF-2BP2 atrasa a transição dessas células de G₀/G₁ para a fase S do ciclo celular (**Figura 20**). No ponto de 24 h da análise, a diferença no percentual de células em G₀/G₁ era de 30 % entre as culturas, quando ~ 73% das células transduzidas com IRF-2BP2 ainda estavam nessa fase. Um ensaio clonogênico mostrou que as células transduzidas com IRF-2BP2 formaram clones menores e em menor número quando comparados com os clones formados pelas células transduzidas com o vetor vazio e que isso provavelmente está relacionado com o atraso na proliferação, já que não encontramos evidências de indução de morte celular pela IRF-2BP2 nessas células (**Figura 21** e **Figura 22**). Apesar disso, os dados de proliferação ainda precisam de confirmação por outras técnicas.

Em relação à morte celular, a descrição na literatura é que a IRF-2BP2 funcione como um fator antiapoptótico (Koeppel *et al.*, 2009; Tinnikov *et al.*, 2009; Yeung *et al.*, 2011), tanto em células de osteosarcomas (Koeppel *et al.*, 2009), quanto de câncer de mama (Tinnikov *et al.*, 2009; Yeung *et al.*, 2011), através da repressão da transcrição dos genes pró-apoptóticos Bax (Koeppel *et al.*, 2009) e FASTKD2 (Yeung *et al.*, 2011). Assim, nossos dados de que a IRF-2BP2 não induz a morte celular de células NIH3T3 estão condizentes com a literatura. O NFAT1, por outro lado, é um gene pró-apoptótico caracterizado em diversos tipos celulares, envolvido na indução dos genes FasL (Latinis *et al.*, 1997; Holtz-Heppelmann *et al.*, 1998), Nur77 (Youn *et al.*, 2000) e TNF- α (Park *et al.*, 1996; McCaffrey *et al.*, 1994; Oum *et al.*, 2002, Kaminuna *et al.*, 2008). Curiosamente, tanto NFAT1 quanto IRF-2 (Chow *et al.*, 2000), que interagem com IRF-2BP2, induzem a expressão de FasL em linfócitos T. Seria interessante avaliar se a IRF-2BP2 também regula genes de morte celular induzidos pelo NFAT e se a superexpressão de IRF-2BP2 reprime a morte mediada por NFAT1.

Voltando para a regulação do ciclo celular mediado pela IRF-2BP2, iniciamos as análises pelos genes expressos em diferentes momentos da fase G₁ do ciclo celular. Um dos primeiros genes expressos após a estimulação mitogênica é o gene *c-Myc*, que dirige a progressão do ciclo regulando positivamente a expressão ou atividade de E2F (Matsumura *et al.*, 2003), ciclinas D (Amati *et al.*, 1998; Collier *et al.*, 2000; Eisenman, 2001), E e A (Facchini & Penn, 1998; Eisenman, 2001), CDK4 (Amati *et al.*, 1998; Hermeking *et al.*, 2000) e Cdc25 (Galaktionov *et al.*, 1996; Eisenman, 2001). Sua função positiva no ciclo celular também ocorre via repressão ou sequestro de CKIs, como p15^{INK4}, p27^{Kip1} e p21^{Cip1} (Amati *et al.*, 1998; Collier *et al.*, 2000). Em células NIH3T3 sincronizadas por confluência e privação de soro, observamos que as células que superexpressam IRF-2BP2 não foram capazes de induzir a expressão de *c-Myc* aos níveis obtidos com o vetor vazio (**Figura 23A**). Enquanto os níveis de *c-Myc* chegaram a aumentar 20 x nas células com o vetor vazio, as células expressando IRF-2BP2 só aumentaram 6 x.

Outro gene que é expresso antes do ponto de restrição de G₁ é a ciclina D, que é induzida por fatores de crescimento (Sherr, 2000) e também por *c-Myc* (Amati *et al.*, 1998; Collier *et al.*, 2000; Eisenman, 2001). As ciclinas do tipo D (D1, D2 e D3) se ligam a CDK4/6 e esse complexo fosforila a proteína Rb, liberando E2F para transcrever os genes de ciclina E, A (Sherr, 2000; Kozar & Sicinski, 2005) e de genes de metabolismo, importantes para a entrada na fase S (Sherr, 2000). O acúmulo de ciclina D é dependente de mitógenos e ocorre no final de G₁ (Sherr, 2000; Dubravka & Scott, 2000), onde o complexo ciclinaD/CDK4/6 executa outra função essencial, por sequestrar os inibidores p27^{Kip1} e p21^{Cip1} dos complexos contendo CDK2, permitindo assim a função dos complexos ciclinaE/A/CDK2 e a transição para a fase S (Sherr, 2000; Kozar & Sicinski, 2005). Nós observamos que as células transduzidas com IRF-2BP2 não induzem a expressão de ciclina D1 em nenhum momento até 48 h após a adição de soro. (**Figura 23B**). Interessantemente, essas células induzem a expressão de ciclina D2 (**Figura 23C**), que por sua vez não é induzida nas células com o vetor vazio. Já foi mostrado que os três tipos de ciclinas D podem se complexar com CDK4/6 e fosforilar Rb. Além disso, a ciclina D2 pode compensar a perda de D1 (Dubravka & Scott, 2000). A ciclina D1 regula genes envolvidos no metabolismo de carboidratos, lipídeos e aminoácidos, enquanto que a ciclina D2 não regula essas vias, mas apesar disso, ambas ciclinas têm funções equivalentes para a progressão do ciclo celular (Mullany *et al.*, 2008). Não sabemos o porquê da IRF-2BP2 fazer essa troca de expressão de ciclina D1 para D2. É possível que ela reprima algum gene responsável por induzir a expressão de ciclina D1 e,

como um mecanismo compensatório, a célula consiga induzir a expressão de D2 para ciclar. Condizente com essa hipótese, já foi mostrado que a IRF-2 induz a expressão de ciclina D1 (Wang *et al.*, 2007).

Independente da menor expressão de *c-Myc* e da troca de expressão de ciclina D1 para ciclina D2, o aumento da expressão das ciclinas E e A ocorreu nos mesmos tempos tanto nas células que superexpressavam o vetor vazio quanto a IRF-2BP2 (**Figura 23D e E**), inclusive, as células transduzidas com a IRF-2BP2 expressavam níveis maiores de ciclina E2 em 24 h quando comparadas com os níveis do vetor vazio. Esses dados indicam que o aumento de 6 x na expressão de *c-Myc* aliado à expressão de ciclina D2 nas células transduzidas com a IRF-2BP2 foi suficiente para a indução das ciclinas importantes para a transição de G₁/S (ciclina E) e para a fase S (ciclina A). As ciclinas E e A se complexam com CDK2 para exercerem sua atividade (Smits & Medema, 2001; Vermeulen *et al.*, 2003) e a atividade de CDK2 é ativada pela fosfatase Cdc25A, que é expressa predominantemente no final de G₁ (Dubravka & Scott, 2000) e é regulada por *c-Myc* (Galaktionov *et al.*, 1996; Eisenman, 2001). *c-Myc* também está associado com o complexo pré-replicativo (Dominguez-Sola *et al.*, 2007). A montagem do complexo pré-replicativo ocorre na fase G₁ do ciclo celular, e é necessária para a posterior replicação do DNA na fase S (Sclafani & Holzen, 2007). Especificamente, *c-Myc* controla a atividade das origens, que ocorre na transição de G₁/S (Dominguez-Sola *et al.*, 2007). Então, essa diminuição de expressão de *c-Myc* observada nas células que superexpressam IRF-2BP2 pode ter consequências em outros pontos do ciclo celular que não na expressão de ciclinas.

Na primeira parte deste trabalho, mostramos que o NFAT1 regula diretamente a transcrição de *c-Myc* e que esse mecanismo envolve a participação de coativadores transcripcionais como p300, que dentre suas várias funções, tem atividade de HAT. Como mencionado anteriormente, a IRF-2BP2 atua como um corepressor transcripcional, podendo prevenir o recrutamento ou a atividade de HATs para os promotores dependentes de NFAT1. Como as células transduzidas com IRF-2BP2 expressam níveis menores de *c-Myc* em relação às transduzidas com o vetor vazio, surge a questão da IRF-2BP2 também estar reprimindo a expressão de *c-Myc* induzida pelo NFAT1 e ter um papel bem mais amplo na regulação do NFAT1, não se restringindo apenas à modulação de genes de citocinas.

A regulação do ciclo celular é extremamente complexa e envolve diferentes famílias proteicas além das ciclinas, como as CDKs e CKIs. As CDKs podem fosforilar múltiplos substratos, podendo ativar ou inibir os mesmos. A atividade das CDKs é controlada por quatro mecanismos: ativação pela ligação às ciclinas; ativação por fosforilação em resíduos de

treonina; inibição por fosforilação em alguns resíduos de treonina ou tirosina e inibição pela ligação de CKIs (Dubravka & Scott, 2000). Qualquer um desses mecanismos pode estar desregulado nas células que superexpressam IRF-2BP2. Dentre as CKIs, a transcrição de p21^{Cip1} induzida por p53 é inibida pela IRF-2BP2 (Koeppel *et al.*, 2009). Entretanto, a interação direta entre IRF-2BP2 e p53 não foi encontrada, o que sugere que esse fenótipo repressor seja mediado por outra proteína endógena. O NFAT1 induz a expressão de p21^{Cip1} (Santini *et al.*, 2001), apesar dessa indução ter sido analisada em um contexto de diferenciação celular e não de proliferação. Pode ser que a repressão de p21^{Cip1} pela IRF-2BP2 ocorra pela interação de IRF-2BP2 com NFAT1. p21^{Cip1} inibe a função dos complexos CDK2/ciclina E/A, podendo assim inibir a transição de G₁/S.

O NFAT1 está relacionado com a repressão da proliferação e do ciclo celular (Caetano *et al.*, 2002), atuando na repressão dos genes de CDK4 e ciclina A2 (Baksh *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2007). Por outro lado, a IRF-2 é descrita como um oncogene em diversos modelos (Wang *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2002; Cui *et al.*, 2012), onde foi mostrado que ela induz a proliferação e a indução de alguns genes de ciclo celular, como histona H4 (Vaughan *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2007), ciclina D1 (Wang *et al.*, 2007), ciclina B1 e p27^{Kip1} (Xie *et al.*, 2002). Ainda não sabemos se a IRF-2BP2 regula os mesmos genes que NFAT1 e/ou IRF-2 durante a progressão do ciclo celular e esse é um dos objetivos para a continuidade deste trabalho. A hipótese da IRF-2BP2 também regular a função do NFAT em outros processos celulares regulados pelo NFAT, como apoptose, ciclo celular e angiogênese, poderia contribuir para explicar as funções distintas exercidas pelos diferentes membros da família NFAT.

6 PERSPECTIVAS

- Realizar um ensaio de super array (RT² Profiler PCR Array, Qiagen) para genes de ciclo celular com células NIH3T3 transduzidas com os vetores pLIREs-EGFP e pLIREs-EGFP-IRF-2BP2;
- Validar a expressão das ciclinas e outros genes de ciclo celular por *western blot*;
- Analisar a proliferação dessas células por CFSE;
- Investigar a função da IRF-2BP2 na transativação de genes de ciclo e morte celular regulados pelo NFAT1.

7 CONCLUSÕES

- A via de Ca^{2+} /calcineurina/NFAT é essencial para a expressão de *c-Myc* em linfócitos T CD4 ativados pelo TCR;
 - O NFAT1 se liga a pelo menos três elementos do promotor de *c-Myc* *in vitro* (EMSA) e aos dois elementos distais *in vivo* (ChIP);
 - Os dois elementos distais de ligação a NFAT (NFATRE 2 e 5) funcionam como reguladores negativos, enquanto o proximal funciona como um sítio positivo para a transativação mediada pelo NFAT1. Além disso, os sítios negativos são dominantes sobre o positivo;
 - Existem ainda outros sítios recessivos, que são positivos para a transativação mediada pelo NFAT1, como o NFATRE 6;
 - p300 aumenta a atividade de transativação do NFAT1 no promotor de *c-Myc*, mostrando que a resposta mediada pelo NFAT1 também depende dos fatores de transcrição aos quais ele se associa.
 - O NFAT2 também regula os elementos mostrados para o NFAT1 no promotor de *c-Myc*, mas essa regulação ocorre preponderantemente através dos sítios positivos.
-
- A IRF-2BP2 reprime a expressão de genes de citocina induzidos pelo NFAT1;
 - A função da IRF-2BP2 é restrita ao membro NFAT1 dentro da família NFAT;
 - A IRF-2BP2 aparentemente não se liga ao DNA e funciona como um repressor transcricional, como anteriormente sugerido;
 - A superexpressão de IRF-2BP2 não induz morte celular nas células NIH3T3, mas leva ao atraso da progressão das fases G_0/G_1 para a fase S do ciclo celular; à diminuição do mRNA de *c-Myc* e de ciclina D1 e ao aumento do mRNA de ciclina D2. Por outro lado, ela não altera a expressão das ciclinas E2 e A2, sugerindo que a diferença de expressão de genes de ciclina não é o mecanismo pelo qual a IRF-2BP2 atrasa a progressão do ciclo celular.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acharya, M.R.; Sparreboom, A.; Venitz, J.; Figg, W.D. Rational development of histone desacetylases inhibitors as anti-cancer agents: a review. *Molec. Pharm.*, **68**:917-32, 2005.
- Adhikary, S.; Eilers, M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**:635-46, 2005.
- Albert, T.; Wells, J.; Funk, J.O.; Pullner, A.; Raschke, E.E.; Stelzer, G.; Meisterernst, M.; Farnham, P.J.; Eick, D. The chromatin structure of the dual c-Myc promoter P1/P2 is regulated by separate elements. *J Biol Chem.*, **8**(276):20482:90, 2001.
- Amati B.; Alevizopoulos, K.; Vlach, J. Myc and the cell cycle. *Front Biosci.*, **3**:d250-68, 1998.
- Ansel K.M.; Greenwald R.J.; Agarwal S.; Bassing C.H.; Monticelli S.; Interlandi J.; Djuretic I.M.; Lee D.U.; Sharpe A.H.; Alt F.W.; Rao A. Deletion of a conserved *Il4* silencer impairs T helper type 1-mediated immunity. *Nat Immunol*, **5**:1251-59, 2004.
- Armesilla A.L.; Lorenzo, E.; Gómez del Arco, P.; Martínez-Martínez, S.; Alfranca, A.; Redondo, J.M. Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor of activated T cells in human endothelial cells: a role for tissue factor gene expression. *Mol Cell Biol.*, **19**(3):2032-43, 1999.
- Avni, O.; Lee, D.; Macian, F.; Szabo, S.J.; Glimcher, L.H.; Rao, A. T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nat Immunol*, **3**(7):643-51, 2002.
- Arvanitis, C and Felsher, D. Conditional transgenic models define how MYC initiates and maintains tumorigenesis. *Semin Cancer Biol.*, **16**(4):313-17, 2006.
- Avots, A.; Buttmann, M.; Chuvpilo, S.; Escher, C.; Smola, U.; Bannister, A. J.; Rapp, U. R.; Kouzarides T. & Serfling, E. CBP/p300 integrates Raf/Rac-signaling pathways in the transcriptional induction of NF-Atc during T cell activation. *Immunity*, **10**: 515-524, 1999.
- Baluchamy, S.; Rajabi, H.N.; Navaraj, A.; Thimmapaya, B. Repression of c-Myc and inhibition of G1 exit in cells conditionally overexpressing p300 that is not dependent on its histone acetyltransferase activity, *PNAS*, **100**(16):9524-29, 2003.
- Baksh, S.; Widlund, H.R.; Frazer-Abel, A.A.; Du, J.; Fosmire, S.; Fisher, D.E.; DeCaprio, J.A.; Modiano, J.F.; Burakoff, S.J. NFATc2-mediated repression of cyclin-dependent kinase 4 expression. *Mol Cell*, **10**: 1071-81, 2002.

Batthey, J.; Moulding, C.; Taub, R.; Murphy, W.; Stewart, T.; Potter, Lenoir, G.; Leder, P. The Human *c-Myc* Oncogene: Structural Consequences of Translocation into the *EgH* Locus in Burkitt Lymphoma. *Cell*, **34**:779-87, 1983.

Beals, C.R.; Sheridan, C.M.; Turck, C.W.; Gardner, P.; Crabtree, G.R. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science*, **275**: 1930-4, 1997.

Bentley, D.L.; Groudine, M. A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of *c-Myc* in differentiated HL60 cells, *Nature*, **321**:702-706, 1986.

Bernard, O.; Cory, S.; Gerondakis, S.; Webb, E.; Adams, J.M. Sequence of the murine and human cellular *myc* oncogenes and two modes of *myc* transcription resulting from chromosome translocation in B lymphoid tumours. *EMBO J*, **2**(12):2375-83, 1983.

Bert, A.G.; Burrows, J.; Hawwari, A.; Vadas, M.A.; Cockerill, P.N. Reconstitution of T cell-specific transcription directed by composite NFAT/Oct elements. *J Immunology*, **65**: 5646-55, 2000.

Billon, N.; Carlisi, D.; Datto, M.B.; van Grunsven, L.A.; Watt, A.; Wang, X.F.; Rudkin, B.B. Cooperation of Sp1 and p300 in the induction of the CDK inhibitor p21^{waf1/cip1} during NGF-mediated neuronal differentiation. *Oncogene*, **18**(18):2872-82, 1999.

Blaeser, F.; Ho, N.; Prywes, R.; Chatila, T.A. Ca²⁺-dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors. *J Biol Chem.*, **7**:275(1):197-209, 2000.

Blobel GA. CREB-binding protein and p300: molecular integrators of hematopoietic transcription. *Blood*, **95**(3):745-55, 2000.

Bodor, J.; Bodorova, J.; Gress, R.E. Suppression of T cell function: a potential role for transcriptional repressor ICER. *J. Leukoc. Biol.*, **67**:774–779, 2000.

Bower, K.E.; Zeller, R.W.; Wachsman, W.; Martinez, T.; McGuire, K.L. Correlation of transcriptional repression by p21(SNFT) with changes in DNA.NF-AT complex interactions. *J. Biol. Chem.* **277**:34967–34977, 2002.

Buchholz, M.; Schatz, A.; Wagner, M.; Miel, P.; Linhart, T.; Adler, G.; Gress, T.M.; Ellenrieder, V. Overexpression of *c-Myc* in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *EMBO J.*, **25**(15):3714-24, 2006.

Buchholz, M.; Ellenrieder, V. An emerging role for Ca²⁺/calcineurin/NFAT signaling in cancerogenesis. *Cell Cycle*, **6**(1):16-9, 2007.

Burke, L.J.; Baniahmad, A. Co-repressors 2000. *FASEB J.*, **14**(13):1876-88, 2000.

Caetano, M.S.; Vieira-de-Abreu, A.; Teixeira, L.K.; Werneck, M.F.; Barcinski, M.; Viola, J.P.B. NFATc2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte

activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. *FASEB J.* **16**(14):1940-42, 2002.

Cantrell, D. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol*, **14**: 259-74, 1996.

Carvalho, L.D.S.; Teixeira, L.K.; Carrossini, N. Caldeira, A.T.N.; Ansel, K.M.; Rao, A.; Viola, J.P.B. The NFAT1 Transcription Factor is a Repressor of Cyclin A2 Gene Expression. *Cell Cycle*, **6**(14):1789-95, 2007.

Carneiro, F.R.; Ramalho-Oliveira, R.; Mogno, G.P.; Viola, J.P. Interferon Regulatory Factor 2 Binding Protein 2 Is a New NFAT1 Partner and Represses Its Transcriptional Activity. *Mol Cell Biol*, **31**:2889-901, 2011.

Chan, H. M. & La Thangue, N. B. CBP and p300: HATs for transcriptional bridges and scaffolds *Journal of Cell Science*, **114**:2363-73, 2001.

Chen, C.; Kang, Y.; Massagué, J. Defective repression of *c-Myc* in breast cancer cells: A loss at the core or the transforming growth factor β growth arrest program. *PNAS*, **98**(3):992-99, 2001.

Childs K.S.; Goodbourn, S. Identification of novel co-repressor molecules for Interferon Regulatory Factor-2. *Nucleic Acids Res*, **31**:3016-26, 2003.

Chow, W.A.; Fang, J.J.; Yee, J.K. The IFN regulatory factor family participates in regulation of Fas ligand gene expression in T cells. *J Immunol.*, **164**(7):3512-8, 2000.

Clapier, C.R.; and Cairns, B.R. The Biology of Chromatin Remodeling Complexes. *Annu. Rev. Biochem.*, **78**:273-304, 2009.

Coller, H.A.; Grandori, C.; Tamayao, P.; Colbert, T.; Lander, E.S.; Eisenman, R.N. Golub, T.R. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling and adhesion. *PNAS*, **97**:3260-65, 2000.

Cockerill, P.N. NFAT Is Well Placed to Direct Both Enhancer Looping and Domain-Wide Models of Enhancer Function. *Science Signaling*, **1**:(13):pe 15, 2008.

Cooper, G. M. RNA Synthesis and Processing. In: *The Cell - A Molecular Approach*. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, 2000.

Crabtree, G.R.; Clipstone, N.A. Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem*, **63**:1045-83, 1994.

Cui, L.; Deng, Y.; Rong, Y.; Lou, W.; Mao, Z.; Feng, Y.; Xie, D.; Jin, D. IRF-2 is over-expressed in pancreatic cancer and promotes the growth of pancreatic cancer cells. *Tumour Biol.*, **33**(1):247-55, 2012.

Dalla-Favera, R.; Bregni, M.; Erikson, J.; Patterson, D.; Gallo, R.C. and Croce, C.M. Human c-Myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *PNAS*, **79**:7824-27, 1982.

Dean, M.; Levine, R.; Ran, W.; Kindy, M.; Sonenshein, G.E.; Campisi, J. Regulation of c-Myc transcription and mRNA abundance by serum growth factors and cell contact, *J Biol Chem.*, **261**(20):9161-66, 1986.

Dejmek, J.; S  fholm, A.; Nielsen, C.; Andersson, T.; Leandersson, K. Wnt-5a/Ca²⁺-induced NFAT activity is counteracted by Wnt-5a/Yes-Cdc42-casein kinase 1   signaling in human mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol.*, **26**(16):6024-36, 2006.

Dominguez-Sola, D.; Ying, C.Y.; Grandori, C.; Ruggiero, L.; Chen, B.; Li, M.; Galloway, D.A.; Gu, W.; Gautier, J.; Dalla-Favera, R. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc, *Nature*, **448**:445-51, 2007.

Dubravka, D.; Scott, D.W. Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. *Cell Research*, **10**:1-16, 2000.

Dudley, J.P.; Mertz, J.A.; Rajan, L.; Lozano, M.; Broussard, D.R. What retroviruses teach us about the involvement of c-Myc in leukemias and lymphomas. *Leukemia*, **16**:1086-98, 2002.

Duque, J.; Fresno, M.; Iñiguez, M.A. Expression and function of the nuclear factor of activated T cells in colon carcinoma cells: involvement in the regulation of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, **280**: 8686-93, 2005.

Dustin, M.L. & Chan, A.C. Signaling takes shape in the immune system. *Cell*, **103**:283-94, 2000.

Dvir, A., Conaway, J. W.; Conaway, R. C. Mechanism of transcription initiation and promoter escape by RNA polymerase II. *Curr Opin Gen Dev*, **11**:209-214, 2001.

Dydensborg A.B.; Teller, I.C.; Groulx, J.F.; Basora, N.; Par  , F.; Herring, E.; Gauthier, R.; Jean, D.; Beaulieu, J.F. Integrin alpha6Bbeta4 inhibits colon cancer cell proliferation and c-Myc activity. *BMC Cancer*, **9**:223, 2009.

Eilers, M; Schirm, S; Bishop, J.M. The MYC protein activates transcription of the   -prothymosin gene. *EMBO J.*, **10**(1):133-41, 1991.

Eisenman, R. Deconstructing Myc. *Genes Dev.*, **15**:2023-30, 2001.

Evan, G.I.; Christophorou, M.; Lawlor, E.A.; Ringshausen, I.; Prescott, J.; Danse, T.; inch, A.; Martins, C.; Murphy, D. Oncogene-dependent Tumor Suppression: Using the Dark Side of the Force for Cancer Therapy, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **LXX**:263-73, 2009.

Facchini, L.M.; Penn, L.Z. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J.*, **12**:633-51, 1998.

Facchini, L.M.; Chen, S.; Marhin, W.W.; Lear, J.N.; Penn, L.Z. The Myc autoregulation mechanism requires MYC-MAX association and involves the c-Myc P2 minimal promoter. *Mol Cell Biol.*, **17**:100-14, 1997.

Felsher D.W.; Bishop, J.M. Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol Cell*, **4**:199-207, 1999.

Filippova, G.N.; Fagerline, S.; Klenova, E.M.; Myers, C.; Dehner, Y.; Goodwin, G.; Neiman, P.E.; Collins, S.J.; Lobanenko, V.V. An Exceptionally Conserved Transcriptional Repressor, CTCF, Employs Different Combinations of Zinc Fingers To Bind Diverged Promoter Sequences of Avian and Mammalian *c-Myc* Oncogenes. *Mol Cell Biol.*, **16**(6):2802-13, 1996.

Furie M.; Katz, S.I.; Kawakami, Y.; Kawakami, T. Coordinate expression of src family protooncogenes in T cell activation and its modulation by cyclosporine. *J Immunol.* **144**(2):736-9, 1990.

Galaktionov, K.; Chen, X.; Beach, D. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of *c-Myc*. *Nature*, **382**:511-17, 1996.

Gallinari, P.; Di Marco, S.; Jones, P.; Pallaoro, M.; Steinkuhler, C. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Research*, **17**:195-211, 2007.

Ganss, B. & Jheon, A. Zinc finger transcription factors in skeletal development. *Crit Rev Oral Biol Med*, **15**:282-297, 2004.

Garcia-Rodriguez, C.; Rao, A. Nuclear Factor of Activated T Cells (NFAT)-dependent Transactivation Regulated by the Coactivators p300/CREB-binding Protein (CBP). *J. Exp. Med.*, **187**(2):2031-36, 1998.

Golay, J.; Cusmano, G.; Introna, M. Independent regulation of c-Myc, B-myb and c-myb gene expression by inducers and inhibitors of proliferation in human B lymphocytes. *J Immunol.*, **149**:300-08, 1992.

Gombert, W.M.; Farris, S.D.; Rubio, E.D.; Morey-Rosler, K.M.; Schubach, W.H.; Krumm, A. The *c-Myc* insulator element and matrix attachment regions define the *c-Myc* chromosomal domain. *Mol Cell Biol.*, **23**(24):9338-48, 2003.

Goodson, M.; Jonas, B.A.; Privalsky, M.A. Corepressors: custom tailoring and alterations while you wait. *Nucl Recept Signal.*, 3:e003. Epub 2005 Oct 21, 2005.

Gottifredi, V.; Priver, C. The S phase checkpoint when the crowd meets at the fork. *Semin Cell Dev Biol*, **16**:355-68, 2005.

Graef, I. A., P. G. Mermelstein, K. Stankunas, J. R. Neilson, K. Deisseroth, R. W. Tsien, and G. R. Crabtree. L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature*, **401**:703-8, 1999.

Hamlyn, P.; Rabbits, T. Translocation joins c-Myc and immunoglobulin γ -1 genes in a Burkitt lymphoma revealing a third exon in the c-Myc oncogene. *Nature*, **304**:135-39, 1983.

Han, S.R.; King, M.K.; Bentley, D.L.; Anderson, C.W.; Eisenman, R.N. A non-AUG translational initiation in c-Myc exon 1 generates an N-terminally distinct protein whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas. *Cell*, **52**:185-95, 1988.

Han, Y.; San-Marina, S.; Liu, J.; Minden, M.D. Transcriptional activation of c-Myc proto-oncogene by WT1 protein. *Oncogene*, **23**:6933-6941, 2004.

Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**: 57-70, 2000.

Harada, H.; Kitagawa, M.; Tanaka, N.; Yamamoto, H.; Harada, K.; Ishihara, M.; Taniguchi, T. Anti-oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2. *Science*, **259**(5097):971-4, 1993.

He, T.; Sparks, A.B.; Rago, C.; Hermeking, H.; Zawel, L.; Costa, L.T.; Morin, P.J.; Vogelstein, B.; Kinzler, K.W. Identification of c-Myc as a Target of the APC Pathway. *Science*, **281**:1509-12, 1998.

He, L.; Lui, J.; Collins, I.; Sanford, S.; O'Connell, B.; Benham, C.J.; Levens, D. Loss of FBP function arrests cellular proliferation and extinguishes c-Myc expression. *EMBO J.*, **19**:1034-44, 2000.

Hermeking, H.; Rago, C.; Schuhmacher, Q.L.; Barret, J.F.; Obaya, A.J.; O'Connell, B.C.; Mateyak, M.K.; Tam, W.; Dang, C.V.; Sedivy, J.M.; Eick, D.; Vogelstein, B.; Kinzler, K. Identification of CDK4 as a target of c-Myc. *PNAS*, **97**(5):2229-34, 2000.

Hernandez, G. L.; Volpert, O. V.; Iñiguez, M. A.; Lorenzo, E.; Martínez-Martínez, S.; Grau, R.; Fresno, M. & Redondo, J. M. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporine A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *J. Exp. Med.*, **193**: 607-20, 2001.

Ho, I. C.; Hodge, M. R.; Rooney, J. W.; Glimcher, L. H. The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue specific expression of interleukin-4. *Cell*, **85**:973-83, 1996.

Hodge, M. R.; Ranger, A. M.; De La Brousse, F. C.; Hoey, T.; Grusby, M. & Glimcher, L. H. Hyperplasia and dysregulation of IL-4 expression in NFATp-deficient mice. *Immunity* **4**: 397-405, 1996.

Hogan, P.G.; Chen, L.; Nardone, J.; Rao, A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin and NFAT. *Genes Dev*, **17**: 2205-32, 2003.

Horsley, V.; Pavlath, G. K. NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J Cell Biol.*, **156**: 771-4, 2002.

Iñiguez M.A.; Rodríguez, A.; Volpert, O.V.; Fresno, M.; Redondo, J.M. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends Mol Med.*, **9**(2):73-8, 2003.

Ito, T.; Ikehara, T.; Nakagawa, T.; Kraus, W.L.; Muramatsu, M. P300-mediated acetylation facilitates the transfer of histone H2A-H2B dimers from nucleosomes to a histone chaperone. *Genes & Development*, **14**:1899-1907, 2000.

Iyer, N. G.; Ozdag, H.; Caldas, C. P300/CBP and cancer. *Oncogene*, **23**:4225-31, 2004.

Jain, J.; McCaffrey, P.G.; Valge-Archer, V.E.; Rao, A. Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature*, **356**:801-04, 1992.

Janeway, Jr. C.A.; Bottomly, K. Signals and signs for lymphocyte response. *Cell*, **76**:275-285, 1994.

Jauliac, S.; López-Rodriguez, C.; Shaw, L.M.; Brown, L.F.; Rao, A.; Toker, A. The role of NFAT transcription factor in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nat Cell Biol*, **4**: 540-4, 2002.

Jinnin M.; Medici, D.; Park, L.; Limaye, N.; Liu, Y.; Boscolo, E.; Bischoff, J.; Vikkula, M.; Boye, E.; Olsen, B.R. Suppressed NFAT-dependent VEGFR1 expression and constitutive VEGFR2 signaling in infantile hemangioma. *Nat Med*. **14**(11):1236-46, 2008.

Johnson, B.V.; Bert, A.G.; Ryan, G.R.; Condina, A.; Cockerill, P.N. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhancer activation requires cooperation between NFAT and AP-1 elements and is associated with extensive nucleosome reorganization. *Mol Cell Biol*, **24**:7914-30, 2004.

Kaminuma, O.; Kitamura, F.; Kitamura, N.; Hiroi, T.; Miyoshi, H.; Miyawaki, A.; Miyatake, S. Differential Contribution of NFATc2 and NFATc1 to TNF- α Gene Expression in T Cells, *J. Immunol.*, **180**(1):319-26, 2008.

Karpurapu, M.; Wang, D.; Singh, N.K.; Li, Q.; Rao, G.N. NFATc1 targets cyclin A in the regulation of vascular smooth muscle cell multiplication during restenosis. *J Biol Chem.*, **83**(39):26577-90, 2008.

Kelly, K.; Cochran, B.H.; Stiles, C.D.; Leder, P. Cell-specific regulation of the c-Myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell*, **35**:603-10, 1983.

Kiani, A.; Rao, A.; Aramburu, J. Manipulating immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT. *Immunity*, **12**: 359-372, 2000.

- Knies-Bamforth U.E.; Fox, S.B.; Poulson, R.; Evan, G.I.; Harris, A.L. c-Myc interacts with hypoxia to induce angiogenesis in vivo by a vascular endothelial growth factor-dependent mechanism. *Cancer Res.*, **6**:6563-70, 2004.
- Koeppel, M.; van Heeringen, S.J.; Smeenk, L.; Navis, A.C.; Janssen-Megens, E.M.; Lohrum, M. The novel p53 target gene IRF2BP2 participates in cell survival during the p53 stress response. *Nucleic Acids Res*, **37**:322-35, 2009.
- Kozar, K.; Sicinski, P. Cell cycle progression without cyclin D-CDK4 and cyclin D-CDK6 complexes. *Cell Cycle*, **4**(3):388-91, 2005.
- Kubo, M.; Kincaid, R.L.; Ransom, J.T. Activation of the interleukin-4 gene is controlled by the unique calcineurin-dependent transcriptional factor NF(P). *J Biol Chem.*, **269**(30):19441-6, 1994.
- Koenig, A. Linhart, T.; Schlengemann, K.; Reutlinger, K.; Ellenrieder, V. NFAT-Induced Histone Acetylation Relay Switch Promotes c-Myc-Dependent Growth in Pancreatic Cancer Cells. *Gastroenterology*, **138**(3):1189-99 2009.
- Kumar S. and Leffak, M. DNA topology of the ordered chromatin domain 5' to the human c-Myc gene. *Nucleic Acids Res.*, **17**:2819-33, 1989.
- Laity J,H., Lee, B.M.; Wright, P.E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol*, **11**:39-46, 2001.
- Lara-Pezzi, E.; Gómez-Gaviro, M.V.; Gálvez, B.G.; Mira, E.; Iñiguez, M.A.; Fresno, M.; Martínez-A, C.; Arroyo, A.G.; López-Cabrera, M. The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest.*, **110**(12):1831-8, 2002.
- Latinis, K.M.; Norian, L.A.; Eliason, S.L.; Koretzky, G.A. Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. *J Biol Chem*, **272**:31427-34, 1997.
- Lee, T.I.; Young, R.A. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet.* **34**:77-137, 2000.
- Lemon, B.; Tjian, R. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev*, **14**:2551-69, 2000.
- Levine, R.A.; McCormack, J.E.; Buckler, A.; Sonenshein, G. Transcriptional and postranscriptional control of c-Myc gene expression in WEHI 231 cells. *Mol Cell Biol.*, **6**:4112-16, 1986.
- Levens, D. How the c-myc Promoter Works and Why It Sometimes Does Not. *J Natl Cancer Inst Monogr*, **39**: 41–43, 2008.

- Levens D. You Don't Muck with MYC. *Genes and Cancer*, **1**(6):547-554, 2010.
- Lewis, R.S. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, **19**: 497-521, 2001.
- Li, Q.; Tanaka, S.; Kisenge, R.R.; Toyoda, H.; Azuma, E.; Komada, Y. Activation-induced T cell death occurs at G1A phase of the cell cycle. *Eur. J. Immunol.* **30**:3329-37, 2000.
- Li, B.; Carey, M.; Workman, J.L. The Role of Chromatin during Transcription. *Cell*, **128**, 707–719, 2007.
- Liu, Z.; Ueda, T.; Miyazaki, T.; Tanaka, N.; Mine, S.; Tanaka, Y.; Taniguchi, T.; Yamamura, H.; Minami, Y. A Critical Role for Cyclin C in Promotion of the Hematopoietic Cell Cycle by Cooperation with c-Myc. *Mol Cell Biol.*, **18**(6):3445-54, 1998.
- Liu, C.; Lu, J.; Tanm, J.; Li, L.; Huang, B. Human IL-5 expression is synergistically regulated by histone acetyltransferase CBP/p300 and transcription factors C/EBP, NF-AT and AP-1. *Cytokine*, **27**:93-100, 2004.
- Liu, J.; Kouzine, F.; Nie, Z.; Chung, H.; Elisha-Feil, Z.; Weber, A.; Zhao, K.; Levens, D. The FUSE/FBP/FIR/TFIIH system is a molecular machine programming a pulse of c-Myc expression. *EMBO J.*, **25**:2119-30, 2006.
- Luo, C.; Burgeon, E.; Rao, A. Mechanisms of transactivation by nuclear factor or activated T cells-1. *J Exp Med.*, **184**:141-47, 1996.
- Luo, C.; Shaw, K.T.Y.; Raghavan, A.; Aramburu, J.; Garcia-Cozar, F.; Perrino, B.A.; Hogan, P.G.; Rao, A. Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:8907–8912, 1996b.
- Lusher, B.; Larsson, L-G. The world according to MYC. Conference on MYC and the Transcriptional Control of Proliferation and Oncogenesis. *EMBO Rep.*, **8**:1110-14, 2007.
- Macian, F.; Lopez-Rodriguez, C.; Rao, A. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene*, **20**: 2476-89, 2001.
- Macian, F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol*, **5**:472-484, 2005.
- Marafioti, T.; Pozzobon, M.; Hansmann, M.L.; Ventura, R.; Pileri, S.A.; Robertson, H.; Gesk, S.; Gaulard, P.; Barth, T.F.; Du, M.Q.; Leoncini, L.; Möller, P.; Natkunam, Y.; Siebert, R.; Mason, D.Y. The NFATc1 transcription factor is widely expressed in white cells and translocates from the cytoplasm to the nucleus in a subset of human lymphomas. *Br J Haematol.*, **128**(3):333-42, 2005.

Marcu, K.B.; Bossone, S.A.; Patel, A.J. Myc function and regulation. *Annual Review Biochem.* **61**:806-60, 1992.

Masuda, E.; Naito, Y.; Tokumitsu, H.; Campbell, D.; Saito, F.; Hannum, C.; Arai, K. I. & Arai, N. NFATx, a novel member of the NFAT family that is expressed predominantly in the thymus. *Mol Cell Biol.*, **15**:2697-706, 1995.

Matsumura, I; Tanaka, H.; Kanakura, Y. E2F1 and c-Myc in Cell Growth and Death. *Cell Cycle*, **2**(4):333-38, 2003.

Medyouf, H.; Alcalde, H.; Berthier, C.; Guillemain, M.C.; dos Santos, N.R.; Janin, A.; Decaudin, D.; de Thé, H. Ghysdael, J. Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med.*, **13**(6):736-41, 2007.

Medyouf, H.; Ghysdael, J. The calcineurin/NFAT signaling pathway A novel therapeutic target in leuckemia and solid tumors. *Cell Cycle*, **7**(3):1-7, 2008.

Mullany, L.K.; White, P.; Hanse, E.A.; Nelsen, C.J.; Goggin, M.M.; Mullany, J.E.; Anttila, C.K.; Greenbaum, L.E.; Kaestner, K.H., Albrecht, J.H. Distinct proliferative and transcriptional effects of the D-type cyclins in vivo. *Cell Cycle*, **7**(14), 2215-2224, 2008.

Naar, A.M.; Lemon, B.D.; Tjian, R. Transcriptional coactivator complexes. *Annu. Rev. Biochem.*, **70**:475–501, 2001.

Nagl, N.G. Jr.; Wang, X.; Patsialou, A.; Van Scoy, M.; Moran, E. Distinct mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes with opposing roles in cell-cycle control. *EMBO J*, **26**:752-63, 2007.

Nardone, J.; Lee, D.U.; Ansel, K.M.; Rao, A. Bioinformatics for the 'bench biologist': how to find regulatory regions in genomic DNA. *Nat Immunol.* **5**(8):768-74, 2004.

Nel, A.E. T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: Signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse. *J Allergy Clin Immunol*, **109**(5):758-70, 2002.

Neal, J.W.; Clipstone, N.A. A constitutively active NFATc1 mutant induces a transformed phenotype in 3T3-L1 fibroblasts. *J Biol Chem*, **278**: 17246-54, 2003.

Nielsen, A.A.; Sørensen, A.B.; Schmidt, J.; Pedersen, F.S. Analysis of wild-type and mutant SL3-3 murine leukemia virus insertions in the c-myc promoter during lymphomagenesis reveals target site hot spots, virus-dependent patterns, and frequent error-prone gap repair. *J Virol.*, **79**(1):67-78, 2005.

Nieminen, A.I.; Partanen, J.I.; Klefstrom, J. C-Myc Blazing a Trail of Death. *Cell Cycle*, **6**(20):2464-72, 2007.

- Okamura, H.; Aramburu, J.; García-Rodríguez, C.; Viola, J.P.B.; Raghavan, A.; Tashirani, M.; Zhang, X.; Qin, J.; Hogan, P.G.; Rao, A. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell*, **6**:539-50, 2000.
- Orphanides, G., Lagrange, T., Reinberg, D. 1996. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev*, **10**:2657-2683.
- Oum, J.H.; Han, J.; Myung, H.; Hleb, M.; Sharma, S.; Park, J. Molecular mechanism of NFAT family proteins for differential regulation of the IL-2 and TNF- α promoters. *Mol Cells*, **13**(1):77-84, 2002.
- Oukka, M.; Ho, I. C.; De La Brousse, F. C.; Hoey, T.; Grusby, M. J. & Glimcher, L. H. The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. *Immunity*, **9**: 295-304, 1998.
- Park, J.; Takeuchi, A.; Sharma, S. Characterization of a new isoform of the NFAT (nuclear factor of activated T cells) gene family member NFATc. *J Biol Chem*, **271**(34):20914-21, 2006. Erratum in: *J Biol Chem* 1996 Dec 27;271(52):33705.
- Pelengaris S.; Khan, M.; Evan, G.I. Suppression of Myc-induced apoptosis in β cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell*, **109**:321-32, 2002.
- Penn, L.Z.; Brooks, M.W.; Laufer, E.M.; Land, H. Negative autoregulation of c-Myc transcription. *EMBO J*, **9**(4):1113-21, 1990.
- Pham, L.V.; Tamayo, A.T.; Li, C.; Bueso-Ramos, C.; Ford, R.J. An epigenetic chromatin remodeling role for NFATc1 in transcriptional regulation of growth and survival genes in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, **116**:3899-906, 2010.
- Pullner, A.; Mautner, J.; Albert, T.; Eick, D. Nucleosomal Structure of Active and Inactive c-Myc Genes. *J Biol Chem*, **271**(6):31452-57, 1996.
- Rabbitts, P.H.; Watson, J.V.; Lamond, A.; Forster, M.A.; Evan, G.; Fisher, W.; Atherton, E.; Sheppard, R.; Rabbitts, T.H. Metabolism of c-Myc gene products: c-Myc mRNA and protein expression in the cell cycle, *EMBO J*, **8**:2009-15, 1985.
- Rainio, E.-M.; Sandholm, J. Koskinen, P. J. Cutting Edge: transcriptional activity of NFATc1 is enhanced by the Pim-1 kinase. *J Immunol*, **168**(4):1524-7, 2002.
- Ranger, A.M.; Grusby, M.J.; Hodge, M.R.; Gravalles, E.M.; de la Brousse, E.C.; Hoey, T.; Mickanins, C.; Baldwins, H.S.; Glimcher, L.H. The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature*, **392**:186-90, 1998a.

Ranger, A.M.; Hodge, M.R.; Gravallesse, E.M.; Oukka, M.; Davidson, L.; Alt, F.W.; de la Brousse, F.; Hoey, T.; Grusby, M.; Glimcher, L.H. Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-ATc. *Immunity*, **8**:125-134, 1998b.

Ranger, A.M.; Gerstenfeld, L.C.; Wang, J.; Kon, T.; Bae, H.; Gravallesse, E.M.; Glimcher, M.J.; Glimcher, L.H. The nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor NFATp (NFATc2) is a repressor of chondrogenesis. *J Exp Med*, **191**: 9-22, 2000.

Rao, A.; Luo, C.; Hogan, P.G. Transcription factors of the NFAT family: Regulation and function. *Annu Rev Immunol*, **15**:707-47, 1997.

Rao, A. Avni, O. Molecular aspects of T-cell differentiation. *Br Med Bull.*, **56**:969-84, 2000.

Rengarajan, J.; Mowen, K.A.; McBride, K.D.; Smith, E.D.; Singh, H.; Glimcher, L.H. Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *J Exp Med.*, **195**:1003-1012, 2002.

Reed, J.C.; Nowell, P.C.; Hoover, R.G. Regulation of c-Myc mRNA levels in normal human lymphocytes by modulators of cell proliferation. *Immunology*, **82**:4221-24, 1985.

Reiner, S.L. Development in Motion: Helper T Cells at Work. *Cell*, **129**:33-36, 2007.

Remmers EF, Yang JQ, Marcu KB. A negative transcriptional control element located upstream of the murine c-myc gene. *EMBO J.*, **5**:899-904, 1986.

Robbs, B.K.; Cruz, A.L.S.; Werneck, M.B.F.; Mognol, G.P.; Viola, J.P.B. Dual role for NFAT transcription factors in regulation of apoptosis, cell proliferation and transformation, *Mol Cell Biol.*, **28**(23):7168-81, 2008.

Ropero, S.; Esteller, M.; The role of histone deacetylases (HDAC) in human cancer. *Molecular Oncology*, **1**:19-25, 2007.

Sambrook J.; Fritsch E.; Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, NY, 1989.

Sankar, N.; Baluchamy, S.; Kadeppagari, R.; Singhal, G.; Weitzman, S.; Thimmapaya, B. p300 provides a corepressor function by cooperating with YY1 and HDAC3 to repress c-Myc. *Oncogene*, **27**:5717-28, 2008.

Santini, M.P.; Talora, C.; Seki, T.; Bolgan, L.; Dotto, G.P. Cross talk among calcineurin Sp1/Sp3 and NFAT in control of p21^{WAF1/CIP1} expression in keratinocyte differentiation. *PNAS*, **98**:9575-9580, 2001.

Sclafani, R.A.; Holzen, T.M. Cell cycle regulation of DNA replication. *Annu Rev Genet.*, **41**:237-80, 2007.

Seder, R.A.; Paul, W.E. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Annu Rev Immunol*, **12**:635-73, 1994.

Shaw, J.P.; Utz, P.J.; Durand, D.B.; Toole, J.J.; Emmel, E.A.; Crabtree, G.R. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science*, **241**:202-5, 1988.

Shaw, K. T.-Y; Ho, A. M.; Raghavan, A.; Kim, J.; Jain, J.; Park, J.; Sharma, S.; Rao, A. & Hogan, P. G. Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *PNAS*, **92**:11205-09, 1995.

Sherman, M. A., D. R. Powell, D. L. Weiss, and M. A. Brown. NF-ATc isoforms are differentially expressed and regulated in murine T and mast cells. *J Immunol*, **162**:2820-8, 1999.

Sherr, C. J. The pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.*, **60**:3689-95, 2000.

Sica. A.; Dorman, L.; Viggiano, V.; Cippitelli, M.; Ghosh, P.; Rice, N.; Young, H.A. Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter. *J Biol Chem.*, **272**(48):30412-20, 1997.

Singh, G.; Singh, S.K.; König, A.; Reutlinger, K.; Nye, M.D.; Adhikary, T.; Eilers, M.; Gress, T.M.; Fernandez-Zapico, M.E.; Ellenrieder, V. Sequential activation of NFAT and c-Myc transcription factors mediates the TGF-beta switch from a suppressor to a promoter of cancer cell proliferation. *J Biol Chem.*, **285**(35):27241-50, 2010.

Smale, S. T. & Kadonaga, J. T. The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem*, **72**:449-479, 2003.

Smith, D.P.; Bath, M.L.; Harris, A.W.; Cory, S. T-cell lymphomas mask slower developing B-lymphoid and myeloid tumours in transgenic mice with broad haemopoietic expression of MYC. *Oncogene*, **24**:3544-53, 2005.

Smits, V.A.J.; Medema, R.H. Cheking out the G₂/M transition. *Biochim Biophys Acta*, **1519**:1-12, 2001.

Sperling, S. Transcriptional regulation at a glance. *BMC Bioinformatics*, **8**(Suppl 6):S2: 1-6, 2007.

Spotts, G.; Patel, Sahdina, Xiao, Q.; Hann, S.R. Identification of downstream-initiated c-Myc proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full-length c-Myc proteins. *Mol Cel Biol.*, **17**:1459-68, 1997.

Szabo, S. J., J. S. Gold, T. L. Murphy, and K. M. Murphy. Identification of cis-acting regulatory elements controlling interleukin-4 gene expression in T cells: roles for NF-Y and NF-ATc. *Mol Cell Biol*, **13**:4793-805, 1993.

Szabo, S.J.; Sullivan, B.M.; Peng, S.L.; Glimcher, L.H. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol.*, **21**:713-58, 2003.

Teng, A.C.; Kuraitis, D.; Deeke, S.A.; Ahmadi, A.; Dugan, S.G.; Cheng, B.L.; Crowson, M.G.; Burgon, P.G.; Suuronen, E.J.; Chen, H.H.; Stewart, A.F. IRF2BP2 is a skeletal and cardiac muscle-enriched ischemia-inducible activator of VEGFA expression. *FASEB J*; **24**:4825-34, 2010.

Teng, A.C.; Al-Montashiri, N.A.; Cheng, B.L.; Lou, P.; Ozmizrak, P.; Chen, H.H.; Stewart, A.F. Identification of a phosphorylation-dependent nuclear localization motif in interferon regulatory factor 2 binding protein 2. *PLoS One.*, **6**(8):e24100, 2011.

Tinnikov, A.A.; Yeung, K.T.; Das, S.; Samuels, H.H. Identification of a novel pathway that selectively modulates apoptosis of breast cancer cells. *Cancer Res.*, **69**(4):1375-82, 2009.

Teixeira, L.A.K. Participação do Fator de Transcrição NFAT1 na Diferenciação e Proliferação de Linfócitos. 2006. 173f. Tese (Doutorado em Química Biológica) - Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 23 de fevereiro de 2006.

Tomono, M.; Toyoshima, K.; Ito, M. & Amano, H. Calcineurin is essential for DNA synthesis in Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochem J.*, **317**:675-680, 1996.

Tomono, M.; Toyoshima, K.; Ito, M.; Amano, H.; Kiss, Z. Inhibitors of calcineurin block expression of cyclins A and E induced by fibroblast growth factor in Swiss 3T3 fibroblasts. *Arch Biochem Biophys*, **353**:374-378, 1998.

Torchia, J.; Glass, C.; Rosenfeld, M.G. Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Current Opinion in Cell Biology*, **10**:373-383, 1998.

Tsai, E.Y.; Junming, Y.; Thanos, D.; Goldfeld, A.E. Cell-Type-Specific Regulation of the Human Tumor Necrosis Factor Alpha Gene in B Cells and T Cells by NFATp and ATF-2/JUN. *Mol. Cel. Biology*, **16**(10):5232-44, 1996.

Vennstrom, B.; Sheiness, D.; Zabielski, J.; Bishop, J.M. Isolation and characterization of c-Myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain. *J. Virol.*, **42**:773-79, 1982.

Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D.R.; Berneman, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.*, **36**:131-49, 2003.

Viola, J.P.B.; Kiani, A.; Bozza, P.T.; Rao, A. Regulation of allergic inflammation and eosinophil recruitment in mice lacking the transcription factor NFAT1: role of interleukin-4 (IL-4) and IL-5. *Blood*, **91**: 2223-30, 1998.

Viola, J.P.B.; Carvalho, L.D.S.; Fonseca, B.P.F.; Teixeira, L.K. NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. *Braz J Med Biol Med.*, **38**:335-44, 2005.

- Vita, M.; Henrikson, M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Sem Cancer Biol.*, **16**:318-30, 2006.
- Von Boehmer, H.; Aifantis, I.; Gounari, F.; Azogui, O.; Haughn, L.; Apostolou, I.; Jaeckel, E.; Grassi, F.; Klein, L. Thymic selection revisited: how essential is it? *Immunol Rev*, **191**:62-78, 2003.
- Wang H.; Mannava, S.; Gracgtchouk, V.; Zhuang, D.; Soengas, M.S.; Gudkov, A.V.; Prochownik, E.V.; Nikiforov, M.A. c-Myc depletion inhibits proliferation of human tumor cells at various stages of the cell cycle. *Oncogene*, **27**(13):1905-15, 2007.
- Wang, Y.; Liu, D.P.; Chen, P.P.; Koeffler, H.P.; Tong, X.J.; Xie, D. Involvement of IFN regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 in the formation and progression of human esophageal cancers. *Cancer Res.*, **67**(6):2535-43, 2007.
- Wierstra, I.; Alves, J. The c-Myc Promoter: Still MysterY and Challenge. *Adv Cancer Res.*, **99**:113-333, 2008.
- Wray, G.A.; Hahn, M.W.; Abouheif, E.; Balhoff, J.P.; Pizer, M.; Rockman, M.V.; Romano, L.A. The evolution of transcriptional regulation in Eukaryotes, *Mol Biol Evol.*, **20**(9):1377-1419 (2003).
- Wu, Y.; Borde, M.; Heissmeyer, V.; Feuerer, M.; Lapan, A.D.; Stroud, J.C.; Bates, D.L.; Guo, L.; Han, A.; Ziegler, S.F.; Mathis, D.; Benoist, C.; Chen, L.; Rao, L. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*, **126**:375-387, 2006.
- Wu, C.H.; Riggelen, J.V.; Yetil, A.; Fan, A.C.; Bachireddy, P.; Felsherm D.W. Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation. *PNAS*, **104**:13028-33, 2007.
- Xanthoudakis, S.; Viola, J.P.B.; Shaw, K.T.; Luo, C.; Wallace, J.D.; Bozza, P.T.; Luk, D.C.; Curran, T.; Rao, A. An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science*, **272**:892-5, 1996.
- Xie, R.L.; van Wijnen, A.J.; van der Meijden, C.M.; Stein, J.L.; Stein, G.S. Forced expression of the interferon regulatory factor 2 oncoprotein causes polyploidy and cell death in FDC-P1 myeloid hematopoietic progenitor cells. *Cancer Res.*, **62**(9):2510-5, 2002.
- Yan, Y.; Li, J.; Ouyang, W.; Ma, Q.; Hu, Y.; Zhang, D.; Ding, J.; Qu, Q.; Subbaramaiah, K.; Huang, C. NFAT3 is specifically required for TNF-alpha-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and transformation of C141 cells. *J Cell Sci.*, **119**(Pt 14):2985-94, 2006.
- Yang, X.Y., Wang, L.H.; Chen, T.; Hodge, D.R.; Resau, J.H.; Da Silva, L.; Farrar, W.L. Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J. Biol. Chem.* **275**:4541-4544, 2000.

Yeung, K.T.; Das, S.; Zhang, J.; Lomniczi, A.; Ojeda, S.R.; Xu, C.F.; Neubert, T.A.; Samuels, H.H. A novel transcription complex that selectively modulates apoptosis of breast cancer cells through regulation of FASTKD2. *Mol Cell Biol*, **31**:2287-98, 2011.

Yiu, G.K.; Toker, A. NFAT Induces Breast Cancer Cell Invasion by Promoting the Induction of Cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* **281**(18):12210-17, 2006.

Yoeli-Lerner, M.; Yiu, G.K.; Rabinovitz, I.; Erhardt, P.; Jauliac, S.; Toker, A. Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol Cell*, **20**:539-50, 2005.

Youn, H.; Chatila, T.A.; Liu, J.O. Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis, *EMBO J.*, **19**(16):4323-31, 2000.

Yoshida H.; Nishina, H.; Takimoto, H.; Marengère, L.E.; Wakeham, A.C.; Bouchard, D.; Kong, Y.Y.; Ohteki, T.; Shahinian, A.; Bachmann, M.; Ohashi, P.S.; Penninger, J.M.; Crabtree, G.R.; Mak, T.W. The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity*, **8**(1):115-24, 1998.

Zaichuk, T.A.; Shroff, E.H.; Emmanuel, R.; Filleur, S.; Nelius, T.; Volpert, O.V. Nuclear Factor os Activated T Cells Balances Angiogenesis Activation and Inhibition. *J. Exp. Med.*, **199**(11):1513-22, 2004.

Zhang, H.; Xie, X.; Zhu, X.; Zhu, J.; Hao, C.; Lu, Q.; Ding, L.; Liu, Y.; Zhou, L.; Liu, Y.; Huang, C.; Wen, C.; Ye, Q. Stimulatory cross-talk between NFAT3 and estrogen receptor in breast cancer cells. *J Biol Chem.*, **280**(52):43188-97, 2005.

9 APÊNDICES

9.1 ARTIGOS ORIGINAIS

- 9.1.1 Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors. Robbs BK, Cruz AL, Werneck MB, Mognol GP, Viola JP. *Mol Cell Biol.* 2008; 28(23):7168-81.
- 9.1.2 Melatonin protects CD4⁺ T cells from activation-induced cell death by blocking NFAT-mediated CD95 ligand upregulation. Pedrosa AM, Weinlich R, Mognol GP, Robbs BK, Viola JP, Campa A, Amarante-Mendes GP. *J Immunol.* 2010; 184(7):3487-94.
- 9.1.3 Interferon regulatory factor 2 binding protein 2 is a new NFAT1 partner and represses its transcriptional activity. Carneiro FR, Ramalho-Oliveira R, Mognol GP, Viola JP. *Mol Cell Biol.* 2011; 31(14):2889-901.
- 9.1.4 Transcriptional regulation of the c-Myc promoter by NFAT1 involves negative and positive NFAT-responsive elements. Mognol GP, de Araujo-Souza PS, Robbs BK, Teixeira LK, Viola JP. *Cell Cycle.* 2012; 11(5):1014-1028.

9.2 CAPÍTULO DE LIVRO

- 9.2.1 Fatores de Transcrição e Regulação da Expressão Gênica. Mognol, GP; Viola, JP. In: *Tratado de Oncologia*, Capítulo 19. Editado por P.M.G. Hoff. São Paulo, Editora Atheneu, no prelo.