Instituto Nacional de Câncer

Centro de Pesquisa

Divisão de Biologia Celular

REGULAÇÃO DO PROTO-ONCOGENE *c-myc* PELO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFAT1

GIULIANA PATRÍCIA MOGNOL

Rio de Janeiro
Março de 2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

GIULIANA PATRÍCIA MOGNOL

REGULAÇÃO DO PROTO-ONCOGENE *c-myc* PELO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFAT1

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Centro de Pesquisa, Divisão de Biologia Celular, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Oncologia.

ORIENTADOR: Dr. João Paulo de Biaso Viola

Rio de Janeiro
Março de 2008

82516861 32331509

M696r Mognol, Giuliana Patrícia

Regulação do Proto-oncogene *c-myc* pelo Fator de Transcrição NFAT1/ Giuliana Patrícia Mognol. – Rio de Janeiro: INCA/CPQ, 2008.

XIV, 87f.: il. alg. color. graf.

Orientador: João Paulo de Biaso Viola

Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacioanal de Câncer, CPQ, Divisão de Biologia Celular, Pós-graduação em Oncologia, 2008.

Inclui bibliografia: 74-84.

1. NFAT1. 2. c-myc. 3. Regulação da transcrição. I. Viola, João Paulo de Biaso II. Instituto Nacional de Câncer, CPQ. III. Divisão de Biologia Celular. III. Título.

CDD 616.99407120

Este trabalho foi realizado na Divisão de Biologia Celular do Centro de Pesquisa 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), da CAPES, 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).

À minha mãe, Nilse, que é meu exemplo, meu espelho e meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Por ordem dos acontecimentos...

Aos meus pais, Leoniro e Nilse. Pela vida! Pelo amor, dedicação, educação, incentivo... As palavras não conseguem demonstrar a importância de vocês em minha vida. Apesar da distância, sinto vocês perto todos os dias... Obrigada por aceitarem minhas escolhas e por ficarem felizes com as minhas realizações.

À minha irmã preferida (e também única), Jacqueline. Em cada fase, em cada descoberta... lá estava você! Aliás, não lembro de mim antes de você chegar. A amizade, a liberdade e a confiança que sempre tivemos uma com a outra fez de mim uma pessoa mais segura.

À minha grande família, muito presente em toda minha vida.

Ao meu namorado, Fernando. Querido, espero que você saiba que está em todos os meus planos. Amo essa nova fase que estamos passando! Obrigada pelo amor, incentivo, paciência, carinho e também pela ajuda com a dissertação!

À Flavinha e à Melissa da UFRGS, que me acolheram nos estágios e deram uma mãozona para eu conseguir um contato aqui no INCA. Ao Leonardo, que foi esse contato, mediou minha entrada no lab e foi importante no processo de adaptação à cidade.

À família do Flavinho! Cézar, Rosaura, Flávio, Pri, Moleza, Lú, Dani e Vanessa. Vocês abriram as portas de casa de uma maneira que eu quase não acreditei! E duas vezes!!! Saibam que vocês são nossa família aqui e que nossa amizade será para sempre!

À Nina e à Poliana, que também foram importantes durante a minha adaptação ao Rio.

Ao meu orientador, João. Adoro sua forma de nos orientar, sempre tão presente, com a porta da sala sempre aberta. Sei que “caí de pára-quedas” no lab, mas espero ter conquistado sua confiança. Muito, mas muito obrigada pela oportunidade!

Ao Bruno, que aceitou dividir um pedacinho do seu projeto quando cheguei, que sempre esteve disposto a discutir experimentos, a ajudar e que se tornou um grande amigo.

Ao Gustavo (Little)! Quantas vezes nós, sem bolsa, juntávamos os trocados e íamos tomar um chopp? Quando tudo aqui era diferente pra mim, era com você que eu me sentia bem.

À Bianca, que considero uma amigona! Somos tão diferentes... Mas é sempre contigo que quero conversar. Admiro seu jeito de sempre “pensar no lado do outro”.

À Patrícia, que em pouco tempo se tornou uma amiga dentro e fora do lab (deve ser a terrinha...) e ao Fabinho também! Um agradecimento especial pela ajuda com os experimentos de Real Time.

A todo pessoal do lab, incluindo as crianças, pelo companheirismo, risadas e ajuda. O bom astral daquele lugar faz nossos dias ficarem mais leves, mesmo com os experimentos que nem sempre funcionam... Em especial, ao pessoal que me ajudou com os experimentos,

principalmente no finalzinho e também com dicas para a dissertação: Paty, Bia, Flavinha, André, Bruno e Érika .

Ao pessoal que mantém tudo funcionando: Alexsandra, Marlon, Isabel e Bruno Aguiar.

Aos amigos da facul: Leli, Alê, Anna e Halison, que continuam dando muito apoio. Fico feliz por nossa amizade superar a distância!

À CAPES, pela provisão da bolsa de mestrado.

RESUMO

A família de fatores de transcrição NFAT (Fator Nuclear de Células T ativadas) tem diferentes funções regulatórias no ciclo celular, apoptose, diferenciação celular e angiogênese. O proto-oncogene *c-myc*, que está envolvido em todos estes mecanismos, é reprimido em alguns modelos, em resposta à Ciclosporina A, que inibe a ativação das proteínas NFAT. Dados anteriores de nosso laboratório mostraram que os linfócitos de camundongos NFAT1-/- sensibilizados com ovalbumina, apresentaram níveis aumentados de c-MYC quando comparados com os linfócitos dos camundongos NFAT1+/+. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar se o NFAT1 regula diretamente a expressão de c-MYC. Este estudo mostrou que linfócitos T de camundongos NFAT1-/- *naives* superexpressam c-MYC em relação aos linfócitos NFAT1+/+, através de ensaios de PCR em tempo real. Uma análise de bioinformática encontrou sete supostos sítios de ligação para NFAT no promotor de *c-myc*, conservados em humanos e camundongos. Três desses sítios foram confirmados por um ensaio de mudança de mobilidade eletroforética, incluindo o sítio proximal, que é regulado por NFAT2. Além disso, um ensaio de imunoprecipitação de cromatina com linfócitos murinos demonstrou que o NFAT1 se liga diretamente ao promotor de *c-myc in vivo*. Estes resultados sugerem que o NFAT1 tem um importante papel na regulação do promotor de *c-myc*, aparentemente regulando negativamente sua expressão.

Palavras-chave: NFAT1, *c-myc*, análise de promotor.

ABSTRACT

The Nuclear Factor of Activated T Cells (NFAT) family of transcription factors has different regulatory functions in the cell cycle, apoptosis, cell differentiation and angiogenesis. The c-*myc* proto-oncogene, which is also involved in those mechanisms, is repressed, in some models, in response to Cyclosporine A that inhibits NFAT activation. Previous data of our laboratory found that lymphocytes from NFAT1-/- mice sensitized with ovalbumin presented higher levels of c-MYC mRNA when compared with the NFAT1+/+. Hence, the aim of this work was to evaluate whether the NFAT1 directly regulates the c-MYC expression. This study showed that T lymphocytes from NFAT1-/- *naive* mice overexpress c-MYC mRNA when compared with the NFAT1+/+ mice assessed by Real Time PCR. A bioinformatic analysis found seven putative NFAT binding sites in the *c-myc* promoter, conserved in human and mouse. Three of them were confirmed by an Eletrophoretic Mobility Shift Assay, including the proximal site, which is upregulated by NFAT2. Additionally, a Chromatin Immunoprecipitation Assay with mouse T lymphocytes demonstrated that NFAT1 directly binds to *c-myc* promoter *in vivo*. These findings suggest that NFAT1 plays an important role in the regulation of *c-myc* promoter apparently through the inhibition of this expression.

Keywords: NFAT1, *c-myc*, promoter analysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formação do complexo de iniciação da transcrição 3

Figura 2 - Representação esquemática das proteínas da família NFAT 9

Figura 3 - Ativação das proteínas NFAT 11

Figura 4 - Estrutura do *locus* de *c-myc* humano 19

Figura 5 - Cinética de expressão do mRNA de c-MYC 41

Figura 6 – A expressão do mRNA de c-MYC é bloqueada por ciclosporina A em células T $CD4^+$. 43

Figura 7 - Cinética de expressão do mRNA de c-MYC em linfócitos de camundongos NFAT1+/+ e NFAT1-/- 45

Figura 8 - Supostos sítios de ligação para NFAT no promotor de *c-myc* 48

Figura 9 - Purificação e ligação do DBD da proteína NFAT ao sítio distal do promotor de IL-2 humano 51

Figura 10 - O DBD do NFAT se liga ao promotor de *c-myc*. 52

Figura 11 - A ligação do DBD do NFAT ao promotor de *c-myc* é específica 53

Figura 12 – Ligação do NFAT1 ao promotor de IFN-γ de células T $CD4^+$ diferenciadas para Th1 56

Figura 13 - *In vivo*, o NFAT1 se liga diretamente ao promotor de *c-myc* 57

Figura 14 – Representação dos vetores contendo as deleções do promotor de *c-myc* humano 60

Figura 15 - Transativação do promotor de *c-myc* humano na linhagem celular Jurkat 61

Figura 16 - Transativação das deleções do promotor de *c-myc* humano em células Jurkat 62

LISTA DE ABREVIATURAS

AICD	Morte Celular Induzida por Ativação (Activation Induced Cell Death)
APC	Células Apresentadoras de Antígeno (Antigen Presenting Cells)
BR	Região Básica, (Basic Region)
Ca^{2+}	Íon divalente de cálcio
CDK	Quinase Dependente de Ciclina, (Cyclin Dependent Kinases)
CK-1	Caseína quinase 1, (Casein Kinase 1)
CKI	Inibidor de CDK, (CDK Inhibitor)
COX-2	Ciclooxigenase-2
CRAC	Receptor de Canais Ativados por Ca^{2+}, (Ca^{2+} Receptor Activated Channels)
CsA	Ciclosporina A
CTL	Linfócito T Citotóxico, (Cytotoxic T Lymphocyte)
DAG	Diacilglicerol
DBD	Domínio de Ligação ao DNA, (DNA Binding Domain)
DNA	Ácido Desoxiribonucleico, (Deoxyribonucleic Acid)
E2F	Fator de Ligação ao Promotor de E2, (E2 Promoter Binding Factor)
FBP	Proteína de Ligação ao Elemento Longínquo 5' (Far upstream element-Binding Protein)
FUSE	Elemento Longínquo a 5'(Far Upstream Element)
g	Grama
G1/2	Fase intermediária 1 e 2 (Gap1/2)
GSK-3	Quinase-3 de Glicogênio Sintase, (Glycogen Synthase Kinase-3)
HLH-LZ	Motivo de hélice-dupla-hélice leucina-zíper, (Helix Loop Helix-Leucine Zipper)
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, (Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase)
ICAM-1	Molécula 1 de Adesão Intercelular (Intercellular Cell Adhesion Molecule-1)
IL	Interleucina
Inr	Elemento iniciador da transcrição

IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato
ITAMs	Motivo de Ativação Baseado no Imunoreceptor de Tirosina (Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif)
JNK	Quinase de Região N-Terminal de c-Jun, (JUN N-Terminal Kinase)
L	Litro
LFA-1	Antígeno 1 Associado com a Função de Linfócito (Lymphocyte Function-Associated Antigen-1)
M	Fase de Mitose, (Mitosis)
mg	Miligrama
MAX	Fator X Associado a MYC (MYC-Associated factor X)
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade, (Major Histocompatibility Complex)
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
IFN-γ	Interferon-γ
ITAMs	Motivo de Ativação baseado no Imunoreceptor de Tirosina, (Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif)
NES	Sinal de Exportação Nuclear, (Nuclear Export Signal)
NFAT	Fator Nuclear de células T Ativadas (Nuclear Factor of Activated T cells)
NHR	Região de Homologia a NFAT, (NFAT-Homology Region)
nM	Nanomolar
NK	Matadora Natural, (Natural Killer)
NLS	Sinal de Localização Nuclear, (Nuclear Localization Signal)
Pb	Pares de bases
PBS	Salina Fosfatada Tamponada, (Phosphate Buffer Sulfate)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, (Polymerase Chain Reaction)
PEDF	Fator Derivado do Pigmento Epitelial, (Pigment Epithelial-Derived Factor)
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato de membrana (Phosphatidylinositol Bisphosphate)
PKC	Proteína quinase C, (Protein Kinase C)
PLCγ	Fosfolipase Cγ, (Phospholipase Cγ)
PMA	Forbol Miristato Acetato, (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate)

Rb	Retinoblastoma
REFs	Fibroblastos Embrionários de Rato, (Rat Embrionic Fibroblasts)
RNA	Ácido Ribonucleico, (Ribonucleic Acid)
S	Fase de Síntese, (Synthesis)
SP	Motivo de Serina e Prolina Repetidos, (Serine Proline-Repeat Motif)
SRR	Região Rica em Serina, (Serine-Rich Region)
TAD	Domínio de Transativação, (Transactivation Domain)
TBP	Proteína de Ligação ao TATA box, (TATA Binding Protein)
TCR	Receptor de Células T, (T Cell Receptor)
TFs	Fatores de Transcrição, (Transcription Factors)
Th	Célula T auxiliar(T *h*elper)
TNF	Fator de Necrose Tumoral, (Tumor Necrose Factor)
U	Unidades
V	Volts
VEGF	Fator de Crescimento Celular Vascular Endotelial, (Vascular Endothelial Cell Growth Factor)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1

1.1 REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO EM EUCARIOTOS 1
1.2 OS LINFÓCITOS T 4
1.2.1 Ativação de linfócitos T 5
1.2.2 Diferenciação de linfócitos T CD4$^+$ 6
1.3 A FAMÍLIA DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO NFAT 7
1.3.1 Estrutura e Ativação do NFAT 8
1.3.2 Distribuição e funções das proteínas NFAT 11
1.3.3 NFAT, ciclo celular e tumorigênese 13
1.4 O PROTO-ONCOGENE *c-myc* 17
1.4.1 Estrutura do gene e da proteína 17
1.4.2 Regulação da expressão de c-MYC 20
1.4.3 Atividades biológicas de c-MYC 22
1.4.3.1 Apoptose, Ciclo Celular e Tumorigênese 23

2 OBJETIVOS 26

2.1 OBJETIVO GERAL 26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 26

3 MATERIAIS E MÉTODOS 27

3.1 ANIMAIS 27
3.2 CULTURA DE CÉLULAS 27
3.3 PURIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4$^+$ 28
3.4 DIFERENCIAÇÃO Th1 28
3.5 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA 28
3.6 PCR EM TEMPO REAL 29
3.7 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA 30
3.8 PURIFICAÇÃO DO DBD DA PROTEÍNA NFAT 31
3.9 ENSAIO DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA (EMSA) 31
3.10 ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA (ChIP) 34
3.11 PLASMÍDEOS 37
3.12 ENSAIOS DE TRANSATIVAÇÃO 37

4 RESULTADOS 39

4.1 A EXPRESSÃO DO mRNA DE c-MYC É DEPENDENTE DA VIA DE Ca^{2+}/CALCINEURINA 39
4.1.1 Expressão temporal do mRNA de c-MYC em linfócitos T estimulados com anti-CD3 39
4.1.2 A expressão do mRNA de c-MYC é bloqueada por CsA em linfócitos T CD4+ 42
4.1.3 Estimulados ou não, os linfócitos T CD4$^+$ dos camundongos NFAT1-/- expressam mais c-MYC em relação aos NFAT1+/+ 44
4.2 O FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFAT1 SE LIGA AO PROMOTOR DE *c-myc* 46

4.2.1 O promotor do gene c-myc apresenta supostos sítios de ligação para NFAT, que são conservados em humanos e murinos *46*
4.2.2 O DBD da proteína NFAT1 recombinante se liga in vitro ao promotor de c-myc *49*
4.2.3 O NFAT1 se liga in vivo ao promotor de c-myc *54*
4.3 ENSAIOS DE TRANSATIVAÇÃO DO PROMOTOR DE *c-myc* HUMANO 58

5 DISCUSSÃO 63

6 CONCLUSÕES 73

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 74

8 APÊNDICE I - REGIÃO PROMOTORA DO GENE *c-myc* 85

1 INTRODUÇÃO

1.1 REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO EM EUCARIOTOS

Os genes que codificam proteínas em eucariotos são transcritos pelo complexo da holoenzima RNA polimerase II, que é composta por 10 a 12 proteínas. Durante a transcrição, ocorre a montagem de um complexo de proteínas na região promotora dos genes, chamadas de fatores basais de iniciação da transcrição (Orphanides *et al.,* 1996; Lee & Young, 2000, Dvir *et al.*, 2001). O promotor basal (ou core), é uma região proximal, de aproximadamente 100 pb (pares de bases), onde a maquinaria enzimática de transcrição é montada. Sua função é posicionar o início da transcrição relativo à seqüência codificante (Lee & Young, 2000). Embora necessário para a transcrição, o promotor basal não gera, por si só, níveis significativos de mRNA, já que a maioria das proteínas que se ligam ao promotor basal 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 seqüências de nucleotídeos desses sítios de ligação determinam quais fatores podem se associar com o promotor de um dado gene, o que depende de quais fatores estão presentes no núcleo na forma ativa e, em muitos casos, da presença de cofatores. Os fatores de transcrição ativos diferem durante o desenvolvimento, em reposta a estímulos e condições ambientais e entre 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

seqüência de reconhecimento do fator geral de transcrição II B (TFIIB). Um promotor pode ser formado por combinações destas seqüências ou por todas elas (Lee & Young, 2000; Ohler & Niemann, 2001; Smale & Kadonaga, 2003).

Estudos de reconstituição da transcrição *in vitro* revelaram que o processo requer cinco fatores de transcrição (TF, "Transcription Factor") basais: TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH e um sexto fator, que potencializa a transcrição, TFIIA (Orphanides *et al.*, 1996). Primeiramente ocorre o reconhecimento do promotor pelo TFIID, um complexo contendo a proteína ligadora da seqüência 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-TFIIF, seguido de TFIIE e TFIIH. O último tem atividade helicase e separa a fita dupla 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).

Os fatores de transcrição consistem em pelo menos dois domínios funcionais distintos: o domínio de ligação ao DNA, que reconhece e se liga às seqüências específicas no promotor de genes específicos e o domínio de ativação ou repressão, que, ou interage diretamente com componentes da maquinaria basal de transcrição, facilitando ou inibindo sua associação com o promotor basal e, assim resultando em aumento ou diminuição da razão de transcrição, ou interage previamente com outro fator de transcrição ou cofator e depois se liga ao DNA como homo ou heterodímero, podendo inibir fisicamente a ligação de outro fator de transcrição num sítio próximo ou alterar a estrutura da cromatina (Wray *et al.*, 2003, Ganss & Jheon, 2004).

Outra forma comum de regulação da transcrição ocorre por interações proteína-proteína através de um dobramento do DNA (Figura 1). 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 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).

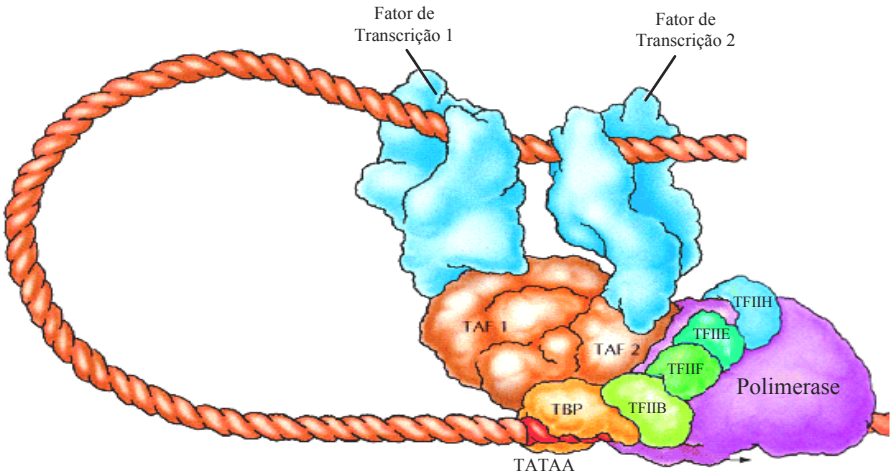


Figura 1 - Formação do complexo de iniciação da transcrição: A sequência TATA é reconhecida pela proteína TBP ("TATA box Binding Protein"), que faz parte do complexo TFIID, representado pela TBP e pelas TAFs ("TBP Associated Factors"). O fator TFIIB recruta a RNA polimerase II (Polimerase), sendo a associação dos fatores TFIIF, E e H necessária para o início da transcrição. Outros fatores de transcrição se ligam à 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 OS LINFÓCITOS T

O Sistema Imunológico é responsável por defender o organismo de antígenos estranhos ao corpo e por reconhecer e tolerar os antígenos próprios. A primeira linha de defesa contra os patógenos, denominada de resposta imune inata, é mediada por barreiras físicas, como as superfícies epiteliais e suas substâncias antimicrobianas; por células fagocíticas, dendríticas e NKs ("Natural Killer"); além de citocinas, componentes sanguíneos e inflamatórios. Esta resposta é rápida, não específica e caracterizada por reagir essencialmente da mesma maneira a sucessivas infecções do mesmo antígeno. A especificidade da resposta é conferida pelo sistema imune adaptativo, composto pelos linfócitos B e T. A resposta rápida durante uma segunda infecção ao mesmo antígeno é conferida pelas células de memória, produzidas pelos linfócitos durante a primeira infecção (Janeway & Bottomly, 1994).

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"), que compreende uma subunidade de ligação ao antígeno, formada pelas cadeias α e β e por uma subunidade de sinalização, composta por quatro cadeias CD3 (duas ε, uma γ e uma δ) e por duas cadeias ξ (Nel, 2002). Ainda no timo, os linfócitos T se diferenciam em dois tipos celulares, caracterizados pela expressão dos co-receptores CD4 e CD8. Os linfócitos T $CD4^+$ são denominados T auxiliares (Th, "T helper") e os linfócitos T $CD8^+$ são denominados T citotóxicos (CTL, "Cytotoxic T Lymphocyte") (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 APC ("Antigen Presenting Cells") (Janeway & Bottomly, 1994).

1.2.1 Ativação de linfócitos T

Os linfócitos T saem do timo *naives* 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 (MHC, "Major Histocompatibility Complex") da célula APC é reconhecido pelos linfócitos T, através do seu TCR e dos co-receptores CD4 e CD8. Os linfócitos T $CD4^+$ interagem com moléculas de MHC de classe II, enquanto os linfócitos T $CD8^+$, reconhecem as de MHC de classe I. 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, que é gerado através da interação de moléculas co-estimulatórias, 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"), expresso nas APCs (Crabtree & Clipstone, 1994; Dustin & Chan, 2000). A ativação de linfócitos T desencadeia os processos de proliferação, diferenciação e aquisição de funções efetoras (Janeway & Bottomly, 1994).

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 co-receptores 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 e da cadeia ζ, 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-bifosfato (PIP_2) de membrana em inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 é responsável pela liberação de cálcio (Ca^{2+}) a partir de reservatórios intracelulares e DAG media 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, 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 diferenciação (Crabtree & Clipstone, 1994; Cantrell, 1996; Lewis, 2001).

1.2.2 Diferenciação de linfócitos T CD4$^+$

Os linfócitos T CD4$^+$ são indispensáveis na determinação e no direcionamento das respostas imunes, através da secreção de citocinas, que atuam como fatores de crescimento e diferenciação para eles mesmos e para outros tipos celulares (Szabo *et al*., 2002, Szabo *et al*., 2003). 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). Enquanto os processos que levam aos fenótipos Th17 e Treg ainda estão sendo desvendados (Reiner, 2007), o mecanismo de diferenciação Th1 e Th2 é bem estabelecido e caracterizado pela produção de padrões distintos de citocinas (Seder & Paul, 1994; Szabo *et al*., 2003). A diferenciação Th1/Th2 depende de vários fatores, como tipo e concentração do antígeno apresentado e, principalmente, do microambiente de citocinas durante a ativação (Seder & Paul, 1994; Macian, 2005).

Vários fatores de transcrição são importantes na diferenciação Th1 e Th2 e, conseqüentemente, no padrão de citocinas que essa célula irá produzir: NFAT e STAT estão envolvidos na diferenciação para os dois tipos de células efetoras; T-bet está relacionado apenas com o fenótipo Th1 (Szabo *et al*., 2002, Murphy & Reiner, 2002) e GATA-3 e c-Maf, apenas com o Th2 (Ho *et al*., 1996; Murphy & Reiner, 2002).

Em relação às citocinas presentes no momento da ativação, se o linfócito T $CD4^+$ entrar em contato com IFN-γ (Interferon-γ), ocorrerá a ativação do fator de transcrição STAT1 e indução da transcrição de T-bet, que promoverá a expressão de IFN-γ e da subunidade β2 do receptor de IL-12, estabelecendo o fenótipo Th1 (Rao & Avni, 2000; Szabo *et al.*, 2003). Linfócitos Th1 também produzem IL-2, TNF-α ("Tumor Necrose Factor") e TNF-β e são fundamentais na imunidade celular contra patógenos intracelulares, pela capacidade de ativarem os macrófagos (Seder & Paul, 1994, Szabo *et al.*, 2003). Por outro lado, se esse linfócito entrar em contato com IL-4, STAT6 será ativada. STAT6 induz a transcrição de GATA-3 e c-Maf, fatores importantes na produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13; e no estabelecimento do fenótipo Th2 (Rao & Avni, 2000), relacionado ao combate de patógenos extracelulares, por serem importantes na ativação de eosinófilos e da imunidade humoral (Seder & Paul, 1994). Respostas excessivas do tipo Th1 são associadas com a destruição tecidual encontrada em doenças autoimunes, enquanto a produção exacerbada de citocinas Th2 leva ao desenvolvimento de asma alérgica (Szabo *et al.*, 2003).

As proteínas NFAT são reguladores centrais da diferenciação de linfócitos T, uma vez que a deficiência dessas proteínas compromete sua diferenciação. Sítios de ligação para as proteínas NFAT foram identificados nos promotores dos genes que codificam citocinas do tipo Th1: IL-2, IFN-γ, e TNF-α e do tipo Th2: IL-4, IL-5 e IL-13 (Jain *et al.*, 1992; Rao *et al.*, 1997; Macian *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 2003).

1.3 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 (ciclinas e CDKs ("Cyclin-Dependent Kinases")), diferenciação (citocinas) e

morte celular (FasL e TNF-α) (Latinis *et al*., 1997; Rao *et al*., 1997; Baksh *et a*l., 2002; Horsley & Pavlath, 2002; Macian, 2005; Carvalho *et al*., 2007; Kaminuma *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 e hoje, a família NFAT é composta por cinco membros, designados pela ordem em que foram identificados. São eles: 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).

1.3.1 Estrutura e Ativação do NFAT

As cinco proteínas da família apresentam o domínio de ligação ao DNA (DBD, "DNA Binding Domain") 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. As proteínas NFAT apresentam uma seqüência 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 (PXIXIT, onde X representa qualquer resíduo de aminoácido); as sequências de localização e de exportação nucleares, denominadas NLS ("Nuclear Localization Signal") e NES ("Nuclear Exportation Signal"), respectivamente e regiões ricas em resíduos de serina e prolina (SRR, "Serine-Rich Region" e SP, "Serine Proline-Repeat Motif). A dinâmica de

fosforilação e desfosforilação 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 da proteína ainda apresentam domínios de transativação (TAD, "Transactivation Domain") (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 transcricionais.

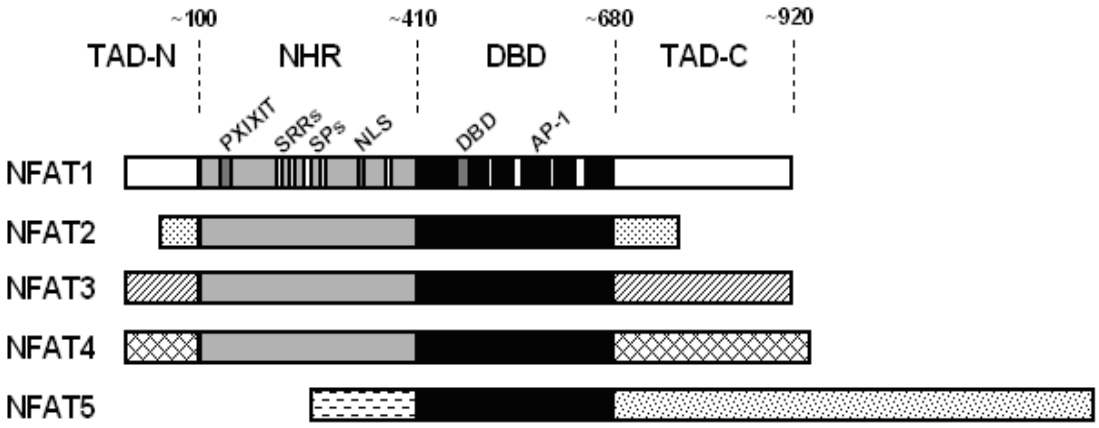


Figura 2 - Representação esquemática das proteínas da família NFAT. Essa família é composta pelos cinco membros representados, os quais apresentam o domínio de ligação ao DNA (DBD, "DNA Binding Domain") altamente conservado, através do qual o NFAT se liga ao promotor dos genes que regula. A região regulatória 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, próprios de cada proteína. Posição de cada região em relação ao NFAT1 (Teixeira, 2006).

As proteínas NFAT são constitutivamente expressas no citoplasma de células não ativadas (Rao *et al*., 1997), na sua forma inativa e fosforilada (Shaw *et al*., 1995). A ativação dessas proteínas ocorre após o estímulo de receptores acoplados à mobilização de Ca^{2+}, como

receptores antigênicos de células B e T, ou receptores Fc presentes em monócitos, mastócitos e NKs (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+} (CRAC, "Ca^{2+} Receptor Activated Channels"). 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 (Rao *et al*., 1997; Macian *et al*., 2001; Hogan *et al*., 2003). Drogas imunosupressoras como a Ciclosporina A (CsA) e o FK506 bloqueiam diretamente a fosfatase calcineurina e, consequentemente, a ativação das proteínas NFAT (Shaw *et al*., 1995; Rao *et al*., 1997; Kiani *et al*., 2000).

Além da regulação pela fosfatase calcineurina, existem quinases que desempenham um papel importante na atividade do NFAT. Algumas aumentam sua capacidade de transativação, como CBP/p300 e 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: GSK-3 ("Glycogen Synthase Kinase-3"), JNK ("JUN N-terminal kinase"), CK-1 ("Casein Kinase 1") e p38 (Beals *et al*., 1997; Macian, 2005).

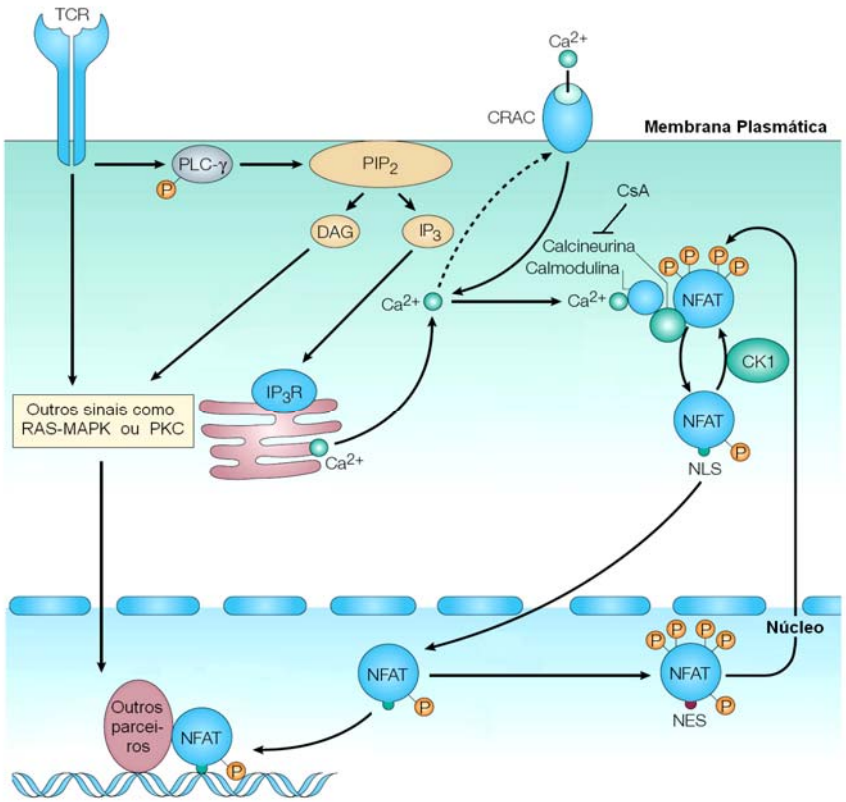


Figura 3 - Ativação das proteínas NFAT. A estimulação do TCR ativa várias vias de sinalização em linfócitos T, dentre elas, a da fosfolipase C (PLC-γ), que leva à hidrólise de fosfatidilinositol-bifosfato (PIP_2) de membrana em inositol-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 é responsável pelo aumento da concentração de Ca^{2+} 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"; Ca^{2+}, Cálcio; CRAC, "Calcium-Release-Activated Calcium Channels"; CsA, Ciclosporina A; NLS "Nuclear Localization Signal"; NES, "Nuclear Exportation Signal". Adaptado de Macian, 2005.

1.3.2 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, 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); NFAT2 também é expresso nos órgãos linfóides periféricos; NFAT3 é o único membro não encontrado em

células do sistema imune (Rao *et al*., 1997; Kiani *et al*., 2000) e 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, que pode explicar a redundância observada em algumas funções reguladas pelo NFAT (Macian, 2005). 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 a NFAT2 são letais durante a embriogênese, por defeitos na formação da válvula cardíaca (Ranger *et al*., 1998a), mas linfócitos deficientes em NFAT2, gerados a partir da reconstituição de blastocistos RAG-/-, apresentam uma proliferação linfocitária diminuída em resposta a um 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). Esses dados sugerem papéis antagônicos para os fatores de transcrição NFAT1 e NFAT2, tanto na regulação da proliferação celular, quanto na diferenciação de

linfócitos Th. Esse fenótipo pode ser explicado pelo desbalanço das proteínas NFAT que podem ocupar um dado promotor, num tempo específico, ou ainda, pela habilidade que cada fator tem de interagir com diferentes co-ativadores, através dos seus domínios N- ou C-terminais, que são menos conservados entre os diferentes membros NFAT (Macian, 2005).

1.3.3 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: G_1, S, G_2 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 G_1 e G_2 ("Gap") são intermediárias e preparatórias para as fases S e M. As células quiescentes, que não se encontram em ciclo, estão em G_0. 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, consequentemente, 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, G_0, para a fase G_1, durante a qual há expressão da ciclina D e 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). O último induz a transcrição de genes envolvidos na transição de G_1/S, como as

ciclinas D, E e A, c-MYC e DNA polimerase (Matsumura *et al*., 2003). No final de G_1, o complexo ciclina E-CDK2 fosforila pRB em sítios adicionais, levando à transição de G_1/S. Em S, a ciclina A se associa com CDK2 e mantém a proteína E2F livre do inibidor pRb, impedindo o regresso à G_1. No final de G_2 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 G_1/S mediada pela sinalização de Ca^{2+} (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, associado a uma expressão aumentada das ciclinas A2, B1, 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 publicado que NFAT1 regula diretamente o promotor de CDK4, inibindo sua expressão e, mais recentemente, o mesmo resultado foi encontrado para ciclina A2, corroborando a hipótese do NFAT1 agir reprimindo o ciclo celular (Baksh *et al.*, 2002, Carvalho *et al*., 2007). Fora do sistema imune, a ausência de NFAT1 também levou ao crescimento e diferenciação descontrolados do tecido conjuntivo e músculo esquelético (Ranger *et al*., 2000; Horsey & Pavlath, 2003). Por outro lado, a proteína NFAT2 regula positivamente o ciclo celular. A superexpressão dessa proteína induz a proliferação de pré-adipócitos em baixas concentrações de soro (Neal & Clipstone, 2003). NFAT3 e NFAT4

também aparecem como reguladores positivos do ciclo celular, promovendo o crescimento de células endoteliais, de musculatura lisa vascular e de músculo esquelético (Horsley & Pavlath, 2002; Viola *et al*., 2005).

As proteínas NFAT têm sido implicadas em vias importantes para o desenvolvimento da tumorigênese, como no processo de formação de novos vasos, importante para a nutrição do tumor. Nesse aspecto, o NFAT foi identificado como um componente crítico da angiogênese induzida por VEGF ("Vascular Endothelial Cell Growth Factor") e ligado à indução de COX-2 ("Cyclooxygenase-2") (Hernandez *et al*., 2001). Especificamente, foi mostrado que NFAT1 (Yiu & Toker, 2006) e NFAT2 (Duque *et al*., 2005) induzem COX-2, mas os outros membros da família não foram avaliados. Zaichuk *et al*. (2004), mostraram que a ativação de NFAT1 induzida pela via de sinalização de VEGF é bloqueada pelo fator PEDF ("Pigment Epithelial-Derived Factor"), um importante inibidor angiogênico, indicando que o desbalanço entre os fatores VEGF e PEDF é que determina a ativação de diferentes fatores de transcrição, como o NFAT e induz ou bloqueia a angiogênese. 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 (Yoli-Lerner *et al*., 2005).

A desregulação da sinalização de NFAT/calcineurina e/ou a expressão anormal de seus componentes tem sido descrita em tumores sólidos de origem epitelial, linfomas e leucemias linfóides. A localização nuclear de NFAT2 foi encontrada em 70% dos casos de linfoma de Burkitt e 30% dos de linfoma de células B grandes difusas (Marafioti *et al*., 2005). A expressão de uma proteína NFAT2 constitutivamente ativa em fibroblastos 3T3L1, foi suficiente para diminuir a diferenciação terminal destas células em adipócitos e para induzir a tranformação celular, o que foi associado com o aumento de expressão de c-MYC e das ciclinas D2 e D3, apesar de não ter sido estabelecido se isto reflete em uma regulação direta. Ainda indiretamente, 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, de alguma forma, bloqueado pela administração da droga Ciclosporina A (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*. Buchholz *et al.* (2006), mostraram que em torno de 70% dos carcinomas pancreáticos apresentam altos níveis de expressão nuclear de NFAT2 quando comparados aos tecidos pancreáticos saudáveis e que essa marcação está relacionada com um aumento de expressão de c-MYC. O mesmo trabalho ainda mostrou que a superexpressão de NFAT2 aumenta a transativação de um vetor contendo o promotor de *c-myc* em uma linhagem celular de câncer de pâncreas, apesar dessa interação não ter sido comprovada *in vivo*. Concordando com o fato do NFAT2 exercer uma função antagônica em relação ao NFAT1 durante a proliferação celular (Ranger *et al*., 1998b), dados não publicados de nosso laboratório mostraram que linfócitos de camundongos NFAT1-/- sensibilizados com ovalbumina, superexpressam c-MYC quando comparados aos linfócitos NFAT1+/+, indicando que o NFAT1 pode estar reprimindo a expressão de c-MYC. Somadas, estas evidências apontam as proteínas da família NFAT como potenciais reguladores da expressão de c-MYC.

As proteínas NFAT cooperam com vários fatores de transcrição no promotor dos genes que regulam, o que deve resultar em ativação ou repressão transcricional em diferentes momentos (Viola *et al*., 2005). Também existem várias isoformas na família, com capacidade de interação com diferentes parceiros, além da variação do microambiente celular. Juntos, todas essas características podem conferir funções específicas a cada membro da família e a função de cada membro pode variar de acordo com o tipo celular.

1.4 O PROTO-ONCOGENE *c-myc*

O isolamento e a caracterização do proto-oncogene *c-myc* ocorreram em 1982. Ele foi descrito como o homólogo celular 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 and Henriksson, 2006). Entretanto, *c-myc* é um gene crítico para a homeostasia normal quando expresso normalmente, tento importantes papéis no crescimento, progressão do ciclo celular, diferenciação e indução da apoptose (Kelly *et al.*, 1983; Marcu *et al*., 1992; Facchini & Penn, 1998).

1.4.1 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 desse 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).

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 *downstrean* 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).

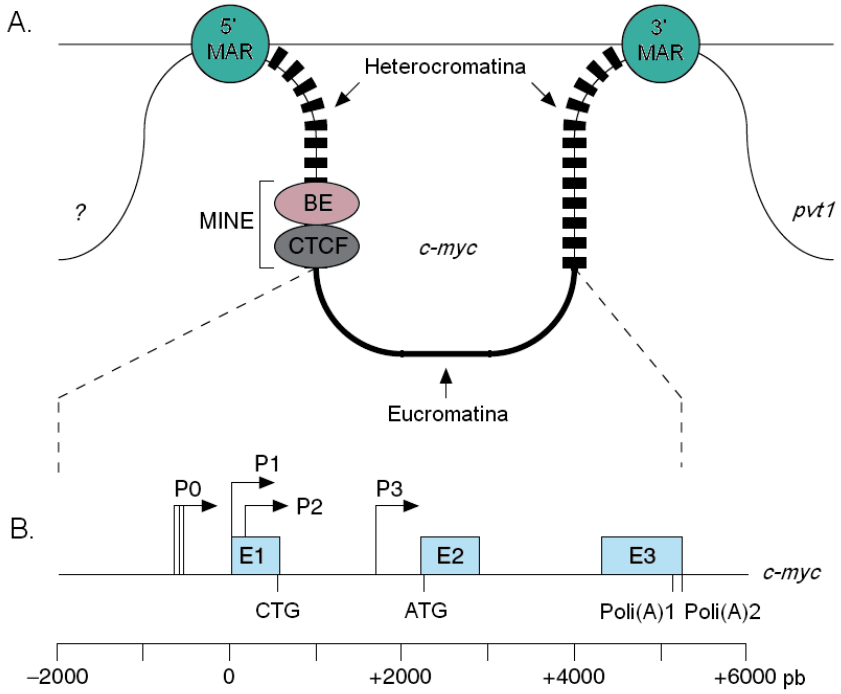


Figura 4 - Estrutura do *locus* de *c-myc* humano. (**A**) As regiões de ligação à matriz, MARs ("Matrix Attachment Region"), localizadas a 80 kb *upstream* e 50 kb *downstream*, definem um domínio que contém hetero e eucromatina e separa esse domíno dos genes vizinhos. A 5', a eu e a heterocromatina 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).

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 (BR, "Basic Region") de α-hélice, envolvida no reconhecimento e ligação à 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). 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 (Einsenman, 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). c-MYC-MAX podem se ligar à sequências que não E-box, por se associarem com outras proteínas, como TR-AP, YY1, TFII-I, AP-2 e MIZ-1 (Facchini *et al*., 1997; Adhikary & Eilers, 2005).

1.4.2 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 G_1 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 pobremente compreendida (Wierstra & Alves, 2008), envolvendo vários

mecanismos, incluindo mudanças na iniciação e elongação da transcrição (Bentley & Groudine, 1986), estabilidade do RNA, reciclagem e tradução da proteína (Mautner, 1995).

Em relação à transcrição, elementos em *cis* positivos e negativos têm sido identificados no promotor (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 simultanea 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 de 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).

Por último, uma análise da região 5' do promotor mostrou que duas regiões (- 1690 a - 1054 e - 718 a - 452 relativos à P1) formam estruturas curvadas, podendo interagir com elementos importantes no promotor basal e influenciar a estrutura da cromatina, por posicionarem os nucleossomos, através da interação com proteínas histonas e outras proteínas cromossomais (Kumar & Leffak, 1989). Exemplificando a importância de regiões longínquas

para a regulação de *c-myc*, um 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 de proliferação (He *et al*., 2000).

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).

1.4.3 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 (Einsenman, 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 (Einsenman, 2001).

1.4.3.1 Apoptose, 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 G_1 e entrarem em S (Eilers *et al*., 1991; Facchini *et al*., 1997). 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 levou 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 Embrionic 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 G_0/G_1 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, o que leva à hipóxia e consequente 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 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), as ciclinas D2 (Coller *et al*., 2000; Einsenman, 2001), E e A (Facchini & Penn, 1998), CDK4 (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). Além disso, reprime ou sequestra CKIs, como $p15^{INK4}$, $p27^{KIPI}$ e $p21^{CIP1}$, cuja expressão leva ao bloqueio do ciclo celular (Coller *et al*., 2000) e ativa enzimas da biossíntese e produção metabólica de poliaminas (ODC), pirimidinas (CAD) e lactato (LDH-A), essenciais para o crescimento e divisão celular (Facchini & Penn, 1998; Coller *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), como sua habilidade em induzir a apoptose (Facchini & Penn, 1998, Pelengaris *et al*., 2002; Nieminem *et al*., 2007), especialmente em células depletadas de fatores de sobrevivência e em estresse e seu mecanismo de auto-regulação negativa (Facchini *et al*., 1997).

A inibição da apoptose pode ocorrer por aumento da expressão de fatores anti-apoptóticos, como BCL-2 e NFκB, cujas funções são normalmente inibidas por c-MYC (Nieminen, *et al*.; 2007), inativação de $p19^{ARF}$ e/ou p53, que são ativados pela proteína c-MYC (Einsenman, 2001), ou inativação de supressores de tumor (Pelengaris *et al*., 2002). c-MYC também induz a apoptose ativando BAK, um pró apoptótico que sensibiliza a mitocôndria para liberar citocromo c (Nieminen, *et al*., 2007).

A desregulação de c-MYC, definida como um aumento inapropriado e não fisiológico em sua atividade, é encontrada em tumores de mama, cólon, carcinomas cervicais, de pulmão, osteosarcomas, glioblastomas e leucemias mielóides (Marcu *et al*., 1992; Facchini & Penn, 1998; Smith *et al*., 2005; Arvanitis & Felsher, 2006; Vita and Henriksson, 2006). Tal desregulação pode ocorrer através de alterações epigenéticas, amplificações, translocações cromossômicas, mutações que rompem um dos muitos mecanismos que controlam sua expressão e mutações em sua própria proteína (Marcu *et al.*, 1992; Facchini & Penn, 1998; Arvanitis & Felsher, 2006), resultando no rompimento da ligação de um regulador negativo ou na alteração da estrutura secundária e aumento da atividade específica do polipeptídeo (Facchini & Penn, 1998). c-MYC contribui para a tumorigênese através da promoção do crescimento celular e da proliferação descontrolados (Einsenman, 2007) 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, já que apesar de conhecidos diversos mecanismos que levam a esse fenótipo, muitas vezes a causa de tal desregulação não é encontrada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

A expressão regulada do proto-oncogene *c-myc* é fundamental para a progressão do ciclo celular, enquanto sua desregulação está associada com a tumorigênese. Sabendo que, em alguns modelos, essa expressão é bloqueada pela Ciclosporina A, uma droga imunossupressora que inibe a atividade das proteínas NFAT e conhecendo o papel do NFAT1 na regulação de genes de ciclo celular, o objetivo principal do presente trabalho foi avaliar se o fator de transcrição NFAT1 regula diretamente a expressão do gene *c-myc*.

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 do gene *c-myc* em modelos *in vitro* e *in vivo.*

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-/- (cedidos pela Dra. Anjana Rao, Harvard University) e C57Bl/6, utilizados conforme indicado em cada experimento. Os animais foram mantidos conforme as normas estabelecidas pelo "Guide for the care and use of laboratory animals" ("National Institute of Health").

3.2 CULTURA DE CÉLULAS

As culturas primárias de linfócitos murinos foram mantidas em meio DMEM (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino, $NaHCO_3$ (40 mM), NaH_2PO_4 (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 μM), HEPES (10 mM), estreptomicina (100 mg/L) e penicilina (100.000 U/L) (todos Invitrogen). A linhagem Jurkat, de células T humanas (Banco de Células do Rio de Janeiro, BCRJ #CR063) foi mantida em meio RPMI (1640, Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino, $NaHCO_3$ (40 mM), L-glutamina (2.0 mM), β-mercaptoetanol (55 μM), estreptomicina (100 mg/L) e penicilina (100.000 U/L) (todos Invitrogen) . As células foram cultivadas em placas ou garrafas de cultura e mantidas a 37°C e 5% de CO_2 em estufa, durante os tempos indicados.

3.3 PURIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T $CD4^+$

Linfonodos totais (inguinais, braquiais, axilares e cervicais superficiais) foram isolados dos animais *naives* (não estimulados) e dissociados em uma suspensão celular. A população de linfócitos T $CD4^+$ foi purificada através do kit de purificação 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 94 %.

3.4 DIFERENCIAÇÃO Th1

Após a purificação das células $CD4^+$, como descrito no subitem 3.3, 5 x 10^6 células/poço iniciais foram mantidas por 7 dias com estímulo *in vitro* de anti-CD3 (2C11, Dr. Geraldo Pereira, Fiocruz – RJ) em placas de 6 poços, pré-tratadas com anti-IgG (0.3 mg/mL, MD Biomedicals) por 1 hora a 37°C e mantidas em 10 μg/mL de anti-IL-4 (11B11, Dr. Ricardo dos Santos, Fiocruz-BA), 5 ng/mL de IL-12 (PeproTech) e 50 μg/mL de IFN-γ (PeproTech). Após 24 h, 20 U/mL de IL-2 (PeproTech) foram adicionadas à cultura. No quarto dia, as células foram transferidas para garrafas de cultura de 75 cm^2, com o estímulo e as citocinas descritas acima. Passado os sete dias, as células foram lavadas e deixadas sem estímulo por 24 h, na presença de IL-2 (20 U/mL).

3.5 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

Os linfócitos T $CD4^+$ (10^6 céls/mL) recém purificados (*naives*) ou diferenciados para Th1, foram estimulados *in vitro* com anti-CD3 (1.0 μg/mL), na ausência ou na presença de

ciclosporina A (1 μM, 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. Nos tempos indicados em cada experimento, o RNA total foi extraído com o reagente TRIzol® (4 poços/ponto) (Invitrogen), conforme indicações do fabricante. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada com a Transcriptase Reversa SuperScript™ III (Invitrogen), como recomendado pelo fabricante. A reação de PCR subseqüente foi realizada a 50ºC por uma hora, seguida de 70ºC por 15 minutos.

3.6 PCR EM TEMPO REAL

A expressão do mRNA de c-MYC 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 (Mm00487803_m1, para a detecção do mRNA de c-MYC), 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 pareia 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: 95º C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 95ºC por 5 segundos, 60ºC por 35 segundos e leitura da placa. Por fim, a curva de desnaturação ("melting") foi criada, nos intervalos de temperatura de 60 a 95ºC

(Termociclador MJ Research PTC-200/BIORAD® e sistema de detecção de Chromo4 Detector - Applied Biosystems).

Os dados foram analisados com o software Opticon Monitor 2.03 System. 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T^{no\ tempo\ de\ indução} - \Delta C_T^{no\ tempo\ de\ referência}$$

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

3.7 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 "acess" e "evaluation account".

3.8 PURIFICAÇÃO DO DBD DA PROTEÍNA NFAT

O domínio de ligação ao DNA (aminoácidos 1-297) da proteína NFAT1 recombinante foi previamente clonado no sistema da QIAexpressionist™ (Qiagen), em bactérias M15 (Qiagen) e cedido pelo laboratório da Dra. Anjana Rao (Harvard University). Estas bactérias foram expandidas e o DBD foi então 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 e submetidas à eletroforese em gel de acrilamida desnaturante 12% (Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1); Bio-Rad) por 4 horas a 25 mA. O gel foi corado por 2 horas com Solução de Coomassie Blue (0,05% Coomassie Blue, 45% Metanol e 10% Ácido Acético Glacial) e descorado por 3 horas com Solução Descorante (40% Metanol (CH3OH) Ácido Acético Glacial (CH3COOH)). As 3 alíquotas originais foram unidas e congeladas a -80ºC em alíquotas menores de 20 µL cada.

3.9 ENSAIO DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA (EMSA)

Os oligonucleotídeos (IDT, Integrated DNA Technologies) foram desenhados a partir da sequência promotora do gene *c-myc* de *Mus musculus* obtida do Ensembl e denominados conforme a posição dos supostos sítios de ligação para o NFAT na referida sequência. Três dessas sondas foram mutadas no núcleo canônico de ligação para o NFAT (GGAAA→ACTCA). Como controle positivo, foi utilizado a sequência consenso de ligação

para o NFAT no promotor de IL-2 (Jain *et al*., 1992). Seguem as sequências das sondas utilizadas:

Sonda consenso de NFAT no promotor de IL-2:

IL-2:	Senso	5' GCC CAA AGA **GGA AAA** TTT GTT TCA TAC AG 3’
	Anti-senso	5' CTG TAT GAA ACA AAT **TTT CC**T CTT TGG GC 3’

Sondas selvagens, desenhadas a partir do promotor de *c-myc* murino:

-2127 pb:	Senso	5’ TGA ACC ATT T**TT TTC** TCT AGT AAT T 3’
	Anti-senso	5’ AAT TAC TAG A**GA AAA** AAA TGG TTC A 3’
-2025 pb:	Senso	5’ CCC AGA ACC T**GG AAA** CCC TGC AGC C 3’
	Anti-senso	5’ GGC TGC AGG G**TT TCC** AGG TTC TGG G 3’
-1880 pb:	Senso	5’ GAG GGG GCG G**GG AAA** GAG TCT CTG C 3’
	Anti-senso	5’ GCA GAG ACT C**TT TCC** CCG CCC CCT C 3’
-1720 pb:	Senso	5’ ATC CTA AAT T**GC AAA** CTC AGT GGC T 3’
	Anti-senso	5’ AGC CAC TGA G**TT TGC** AAT TTA GGA T 3’
-1356 pb:	Senso	5’ AAA GGA AAC TG**G GAA A**TT AAT GTA T 3’
	Anti-senso	5’ ATA CAT TAA **TTT CC**C AGT TTC CTT T 3’
-1217 pb:	Senso	5' TAA TAA AAG G**GG AAA** GCT TGG GTT T 3’
	Anti-senso	5’ AAA CCC AAG C**TT TCC** CCT TTT ATT A 3’

+98 pb:	Senso	5' ACG CTT GGC G**GG AAA** AAG AAG GGA G 3’
	Anti-senso	5' ATC CCT TCT T**TT TCC** CGC CAA GCG T 3’

Sondas mutadas, desenhadas a partir do promotor de *c-myc* murino:

-2025 pb MUT:	Senso	5' CCC AGA ACC T**AC TCA** CCC TGC AGC C 3’
	Anti-senso	5'GGC TGC AGG G**TG AGT** AGG TTC TGG G 3’
-1356 pb MUT:	Senso	5' AAA GGA AAC TG**A CTC A**TT AAT GTA T 3’
	Anti-senso	5' ATA CAT TAA **TGA GT**C AGT TTC CTT T 3’
+98 pb MUT:	Senso	5’ACG CTT GGC G**AC TCA** AAG AAG GGA G 3’
	Anti-senso	5’CTC CCT TCT T**TG AG**T CGC CAA GCG T 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 ressuspendidos em 50 μL de tampão de hibridação (Tris 10 mM pH 7.5 e NaCl 50 mM), desnaturados por 10 minutos a 95°C e resfriados lentamente por 12 horas 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 [γ^{32}P] dATP (Amersham Biosciences) em um volume final de 20 μL, por 1 hora, a 37°C. Após a marcação, a reação foi inativada por 10 minutos a 65°C e as sondas foram purificadas em colunas MicroSpin^{TM} G-25, conforme especificações do fabricante (GE Healthcare).

A reação de EMSA (Eletrophoretic Mobility Shift Assay) foi realizada com quantidades crescentes do DBD da proteína NFAT1 recombinante (Para IL-2: 10 nM, 100nM e 1 μM,

respectivamente e para os oligos de *c-myc*: 100nM, 500 nM e 1 μM, respectivamente). As proteínas foram incubadas com as sondas radioativas indicadas (20.000 CPMs), por 20 minutos à temperatura ambiente, na presença de 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 poliacrilamida 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 hora (pré-corrida). Em seguida, as amostras foram aplicadas e a eletroforese foi realizada a 200 V por mais 1 hora. 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). O papel de filtro foi exposto a um filme de raio-X (Kodak BioMax MS) por 4 horas e revelado por autoradiografia (Kodak X-OMAT 2000 Processor).

3.10 ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA (ChIP)

Após a diferenciação para o fenótipo Th1 (subitem 3.4), os linfócitos foram cultivados por mais por 4 horas 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 minutos 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 4ºC. As células foram lavadas 2 vezes com PBS 1 x 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 minutos a 4°C com agitação. O extrato nuclear foi

ressuspendido e lisado em 1.0 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 1.0 mM). A cromatina foi então sonicada entre 10-15 vezes, por 20 segundos a 4°C, com intervalos de 1 minuto 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 vezes por 5 minutos à velocidade máxima e 4°C) e o sobrenadante foi recuperado depois de cada etapa de centrifugação. Uma alíquota de cada amostra (50 μL) foi retirada, estocada a 4°C e referida como como controle positivo do experimento (INPUT). A cromatina foi incubada com contas de sefarose por 2 horas a 4°C sob agitação, segundo especificações do fabricante (Protein A Sepharose™ CL-4B, Amersham Biosciences). Em seguida, as contas de sefarose foram centrifugadas 2 vezes a 1100 x g por 5 minutos 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 horas a 4°C sob agitação. Os seguintes anticorpos foram utilisados: 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 horas a 4°C sob agitação. O imunoprecipitado foi centrifugado a 3000 x g por 5 minutos 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 minutos a 37°C, seguido de tratamento com proteinase K (0.2 mg/mL; Roche), por 4 horas a 50°C. A cromatina foi separada das contas de sefarose em incubação por 16 horas 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 ressuspendida 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:

-2125 pb:	Senso	5' CCC CAT CCA CAA CTA GGG CTC TG 3'
	Anti-senso	5' AAC GAG GGC GGA GGT CGG ATG G 3'
-1356 pb:	Senso	5' GGA TTG TAC AGA ATG CAC AGC GT 3'
	Anti-senso	5' AGG AGT GAA TTG CCA ACC CAG A 3'
+98 pb:	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 minutos; 28 (-2125 pb e -1356 pb) ou 26 (+98 pb, IFN-γ, IL-4) ciclos de 95°C por 30 segundos, 48ºC (IL-4 e IFN-γ), 55ºC (-1356 pb), 61°C (-2125 pb) ou 62ºC (+98 pb) por 45 segundos, 72°C por 1 minuto; e

extensão final de 72°C por 8 minutos. 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 Eye™ II, Stratagene®).

3.11 PLASMÍDEOS

Os plasmídeos contendo regiões do promotor de *c-myc* humano, fusionados ao gene repórter de luciferase, foram cedidos pelo Dr. Bert Vogelstein (Del-1-Del-4) (He *et al*., 1998), ou adquiridos da Addgene (www.addgene.org) (Del-5 e Del-7) (Chen *et al*., 2001) e estão clonados no vetor pBV-luc. Todas as construções se estendem até +309 pb em relação ao início de transcrição P1.O plasmídeo responsivo à NFAT (3xNFAT) utilizado como controle positivo, foi cedido pela Dra. Anjana Rao (Luo *et al*., 1996). Os plasmídeos foram transformados e amplificados em bactérias XL1-Blue (Stratagene®) e purificados através do kit "Plasmid Maxi Kit" segundo recomendações do fabricante (Qiagen®).

3.12 ENSAIOS DE TRANSATIVAÇÃO

Células Jurkat foram eletroporadas em um volume final de 600 μL de meio RPMI sem soro fetal bovino, com 0,1 μg do vetor de renilla (pRL-TK, Promega) para cada $3x10^6$ células e com diferentes quantidades (3-10 μg) dos vetores de luciferase (vetor de NFAT ou com as construções do promotor de *c-myc* humano), conforme indicado em cada experimento, em cubetas de 0.4 cm (Gene Pulser® Cuvette, Bio-Rad) a 950 μF, 250 V e tempo constante (t=0) (Gene Pulser® II, Bio-Rad). Após a eletroporação, as células foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e depois avolumadas com RPMI suplementado com 10% soro fetal bovino e plaqueadas em placas de 6 poços (10^6 células iniciais/poço). Passadas 24 horas, as células foram mantidas sem estímulo, ou estimuladas com PMA (10 nM) e/ou ionomicina (1

μM) por 6 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas, lavadas com PBS 1 x 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, através de luminômetro (Veritas™ Microplate Luminometer, Turner Biosystems). A leitura de luciferase foi normalizada pela de renilla.

4 RESULTADOS

4.1 A EXPRESSÃO DO mRNA DE c-MYC É DEPENDENTE DA VIA DE Ca^{2+}/CALCINEURINA

4.1.1 Expressão temporal do mRNA de c-MYC em linfócitos T estimulados com anti-CD3

Em diversos modelos, o aumento da expressão do mRNA de c-MYC ocorre em tempos iniciais após a estimulação, tanto em células B quanto em células T (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 do mRNA de c-MYC frente ao estímulo com anti-CD3, linfócitos T $CD4^+$ de camundongos C57BL/6 *naives* foram purificados e as células recém purificadas, ou diferenciadas para o fenótipo Th1, foram estimuladas por diversos períodos de tempo, tendo seu mRNA analisado por PCR em tempo real (Figura 5).

Nos dois tipos celulares, a expressão do mRNA de c-MYC aumentou entre 10-15 vezes pós estimulação, atingindo um pico em 3 (Th1) e 6 h ($CD4^+$), 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 (Rabbits *et al*., 1985; 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 a de 0 h. De fato, depois de 72 h de estimulação, a expressão de c-MYC ainda é 2,5 e 3,5 vezes maior do que a expressão em 0 h, para Th1 e $CD4^+$, respectivamente (dados não mostrados). Assim, o estímulo do TCR com anti-CD3 é um potente indutor da expressão do mRNA de c-MYC tanto nas células T $CD4^+$ *naives*, quanto nas diferenciadas para Th1.

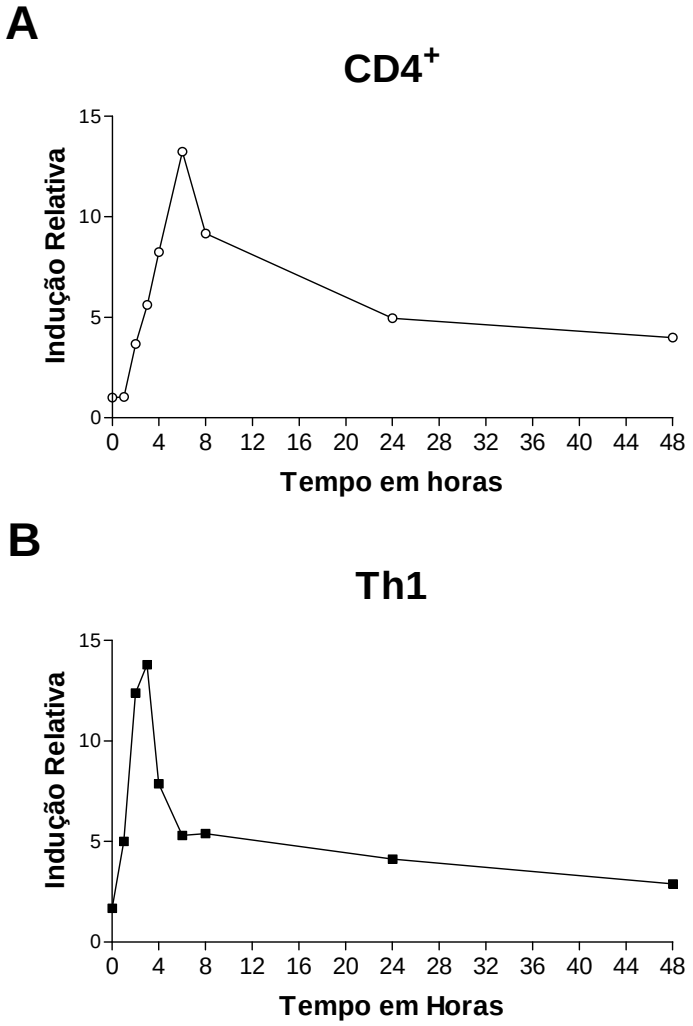


Figura 5 - Cinética de expressão do mRNA de c-MYC. Os linfonodos totais de animais C57BL/6 foram retirados e as células T $CD4^+$ foram purificadas. Estas células recém purificadas (**A**) ou diferenciadas para Th1 (**B**) foram estimuladas *in vitro* com anti-CD3 (1 μg/mL) aderido à placa e o RNA celular total foi extraído em 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24 e 48 h. 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 $CD4^+$ 0 h.

4.1.2 A expressão do mRNA de c-MYC é bloqueada por CsA em linfócitos T CD4$^+$

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). Com o objetivo de avaliar a importância da via de calcineurina durante a expressão de c-MYC, linfócitos T CD4$^+$ purificados de camundongos C57BL/6 *naives* foram mantidos *in vitro* por 6 h sem estimulação, ou foram estimulados com anti-CD3, na presença ou não de ciclosporina A. Como ilustrado na Figura 6, através de análise por PCR em tempo real, a indução de c-MYC provocada pelo estímulo de anti-CD3 foi completamente bloqueada pela ciclosporina A, demonstrado que a via de calcineurina é fundamental para a indução deste gene e sugerindo um possível papel para as proteínas NFAT durante este processo, uma vez que elas são ativadas pela calcineurina.

Concordando com estes dados, outros trabalhos já haviam demonstrado uma inibição parcial ou completa da expressão de c-MYC pela ciclosporina A (Reed *et al.*, 1985; Furue *et al*., 1990; Golay *et al*., 1992). Além disso, o estímulo de ionomicina, que ativa a via de Ca^{2+}/calcineurina/NFAT, se mostrou bem mais potente na indução do mRNA de c-MYC do que o estímulo de PMA, que ativa vias dependentes de PKC e Ras MAPK. (Reed *et al.*, 1985; (Furue *et al*., 1990).

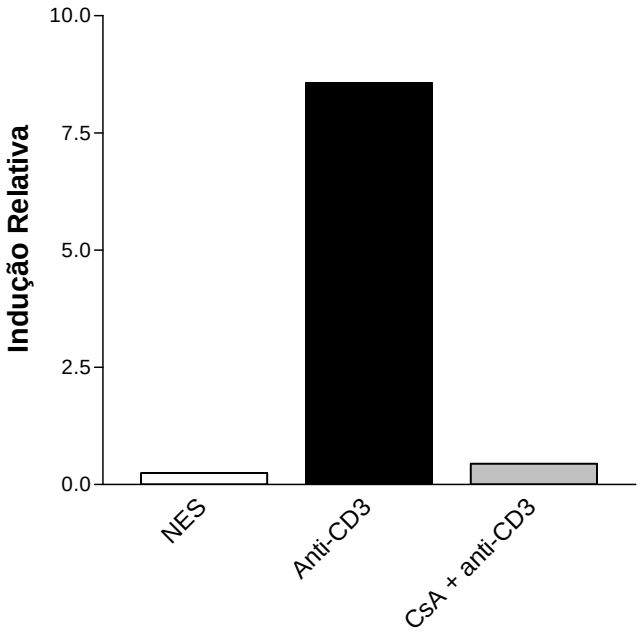


Figura 6 – A expressão do mRNA de c-MYC é bloqueada por ciclosporina A em células T CD4$^+$. Linfonodos totais de animais C57BL/6 foram retirados e as células CD4$^+$ foram purificadas. Estas células foram mantidas *in vitro* sem estimulação por 6 h (NES), ou foram estimuladas com anti-CD3 (1 μg/mL) ligado à placa, na ausência ou na presença de ciclosporina A (CsA, 1 μM). Após este período, o RNA celular total foi extraído. O cDNA foi sintetizado e a expressão do mRNA de c-MYC foi avaliada por PCR em tempo real (TaqMan). A normalização foi feita através da expressão do gene constitutivo HPRT e está representada em relação ao 0 h.

4.1.3 Estimulados ou não, os linfócitos T CD4$^+$ dos camundongos NFAT1-/- expressam mais c-MYC em relação aos NFAT1+/+

Para obter uma evidência mais direta da regulação de *c-myc* pelas proteínas NFAT e conhecendo o fato de NFAT1 ser o membro majoritário da família nos órgãos linfóides periféricos (Kiani *et al*., 2000), linfócitos T CD4$^+$ *naives* ou diferenciados para Th1 de animais selvagens (+/+) ou deficientes para a proteína NFAT1 (-/-) foram avaliados quanto à expressão do mRNA de c-MYC (Figura 7). Surpreendentemente, os linfócitos T CD4$^+$ *naives* dos animais NFAT1-/-, no tempo de 0 h, apresentaram em torno de seis vezes mais c-MYC do que os NFAT1+/+, indicando que *in vivo*, esses linfócitos expressam uma quantidade maior de c-MYC aos linfócitos dos animais selvagens. O mesmo resultado foi encontrado para as células diferenciadas para Th1, porém numa escala menor. A cinética de expressão de c-MYC frente ativação com anti-CD3 se mostrou similar entre os linfócitos NFAT1+/+ e NFAT1-/-, apresentando um aumento nos tempos iniciais e uma redução nos tempos mais tardios, principalmente em 24 h. Entretanto, a amplitude dessa indução foi bem discrepante, com as células NFAT1-/- produzindo níveis muito maiores de c-MYC do que as NFAT1+/+, tanto nos linfócitos T CD4$^+$ *naives* quanto nos diferenciados, sugerindo que o fator de transcrição NFAT1 regula negativamente a expressão de c-MYC.

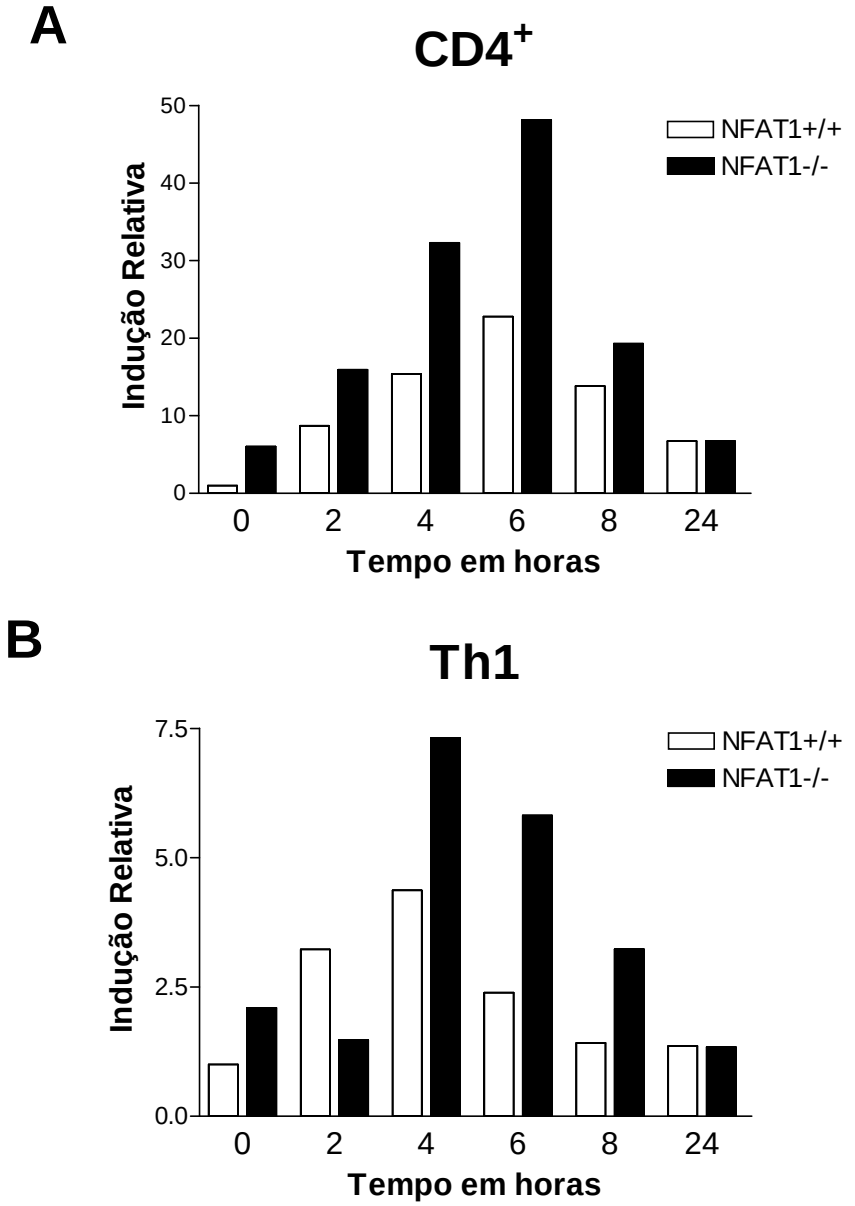


Figura 7 - Cinética de expressão do mRNA de c-MYC em linfócitos de camundongos NFAT1+/+ e NFAT1-/-. Linfonodos totais de animais NFAT1+/+ ou NFAT1-/- foram retirados e as células T $CD4^+$ foram purificadas. Estas células recém purificadas (**A**) ou diferenciadas para Th1 (**B**) foram estimuladas *in vitro* com anti-CD3 (1 μg/mL) aderido à placa e o RNA celular total foi extraído em 0, 2, 4, 6, 8 e 24 h. 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 $CD4^+$ 0 h.

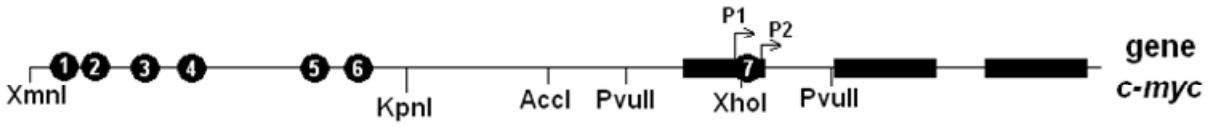
4.2 O FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFAT1 SE LIGA AO PROMOTOR DE *c-myc*.

4.2.1 O promotor do gene c-myc apresenta supostos sítios de ligação para NFAT, que são conservados em humanos e murinos

Os resultados anteriores sugerem que a via que ativa as proteínas NFAT é importante na indução de c-MYC e que o fator de transcrição NFAT1 especificamente, pode agir reprimindo sua expressão. Entretanto, eles não fornecem informações de quão direta é essa relação. O próximo passo foi realizar uma análise de bioinformática no promotor de *c-myc*, procurando por teóricos sítios de ligação para as proteínas NFAT. Os programas de bioinformática buscam esses sítios baseados numa matriz específica para cada fator de transcrição e, geralmente, a quantidade de sítios encontrada pela predição excede os 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 à P1) estão representas na Figura 8, que também mostra o alinhamento dos sítios entre entre humanos e camundongos.

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 2, 3, 5-7, ou, se o

sítio estiver na fita oposta, pelos nucleotídeos CCTTT, encontrados no sítio 1 humano. O sítio 1 murino apresenta uma pequena, mas importante variação (CTTTT), configurando um sítio não ideal de ligação para o NFAT. Da mesma maneira, o sítio 4 contém uma variação de GGAAA para GCAAA, tanto em humanos quanto em camundongos. O sítio proximal (sítio 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* - e, portanto, se tiver alguma função, espera-se que seja em regular P2 exclusivamente. 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 funcionar como *enhancers* ou *silencers* (Lee & Young, 2000).



Sítios	Espécie	Posição	Sequência
	Homo sapiens	-2150	TGAACCACTT**TTTCC**TCCAGTAACT |||||||:|||||:|||:|||||:|
1	*Mus musculus*	-2127	TGAACCATTT**TTTTC**TCTAGTAATT
	Homo sapiens	-2046	TCCTTCCCCCGCT**GGAAA**CCTTGCACCTCGGACGCTCCTGCTC :||:::::|| ||||||||:||||:| |
2	*Mus musculus*	-2025	CCCAGAACC---T**GGAAA**CCCTGCAGC----------C
	Homo sapiens	-1892	GAGGGGGCGGAG**GGAAA**GACGCTTTGC |||||||||| |||||||::||:|||
3	*Mus musculus*	-1880	GAGGGGGCGG--**GGAAA**GAGTCTCTGC
	Homo sapiens	-1731	ACGCTGAGCT**GCAAA**CTCAACGGGT |::||:|::||||||||||::||:|
4	*Mus musculus*	-1720	ATCCTAAATT**GCAAA**CTCAGTGGCT
	Homo sapiens	-1361	AAATTGTGAGTCAGTGAACTA**GGAAA**TTAATGCCT ||| |::||||:||||||||||::|
5	*Mus musculus*	-1356	AAA----------GGAAACTG**GGAAA**TTAATGTAT
	Homo sapiens	-1212	TAATAAAAGG**GGAAA**GAGGACCTGGAAAGGAATTAAACGTCCGGTTT ||||||||||||||| |:||| ||||
6	*Mus musculus*	-1217	TAATAAAAGG**GGAAA**G----CTTGG----------GTTT
	Homo sapiens	+101	AGGCTTGGCG**GGAAA**AAGAACGGA- |:||||||||||||||||||:|||
7	*Mus musculus*	+98	ACGCTTGGCG**GGAAA**AAGAAGGGAG

Figura 8 - Supostos sítios de ligação para NFAT no promotor de *c-myc*. A figura mostra uma 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, estão representados por círculos pretos, os sete supostos sítios de ligação para NFAT, encontrados pela análise de bioinformática. A posição (em relação a P1) e a sequência de cada sítio, alinhados entre humanos e murinos, estão representadas na tabela. Os cinco nucleotídeos em vermelho representam o núcleo canônico de ligação para a proteína NFAT. As sequências dos sítios murinos ilustradas na figura representam os oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de EMSA.

4.2.2 O DBD da proteína NFAT1 recombinante se liga in vitro ao promotor de c-myc.

Apesar de serem conservados nas duas espécies, 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, foi purificado e sua capacidade de se ligar *in vitro* foi testada. Como ilustra a Figura 9A, o processo de purificação do DBD resultou em uma banda única, de tamanho molecular esperado (~ 32,67 KDa). Em seguida, a capacidade de ligação 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 9B). 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.

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 10), representados na Figura 8. Dos sete sítios testados, três deles (- 2025 pb, -1356 pb e + 98 pb) apresentaram a formação de complexos DNA-proteína, também de forma proporcional à quantidade de proteína utilizada. Aparentemente, a ligação aos sítios – 2025 pb e – 1356 pb, ocorre com maior avidez em relação à do sítio + 98 pb, pois com a mesma concentração de proteína, a banda resultante da ligação entre o DBD e o oligo contendo o sítio + 98 pb, tem intensidade menor. 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 11), agora 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 ao sítio estudado. Dessa forma, fica estabelecido que, *in vitro*, o DBD da proteína NFAT pode se ligar a três dos sete supostos sítios encontrados , no promotor de *c*-myc, pela análise de bioinformática.

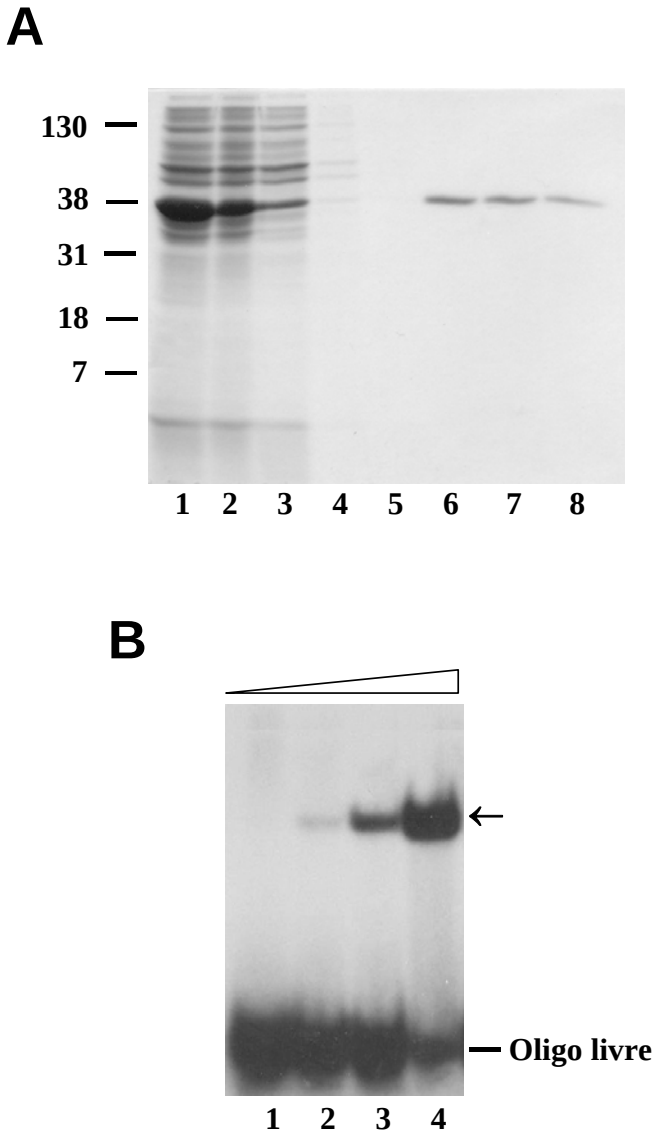


Figura 9 - Purificação e ligação do DBD da proteína NFAT ao sítio distal do promotor de IL-2 humano. O DBD (297 aminoácidos) da proteína NFAT1 recombinante murina foi expresso em bactéria e purificado através de coluna de afinidade a níquel (QIAGEN). (**A**) Gel de poliacrilamida desnaturante 12% corado com coomassie blue, mostrando os passos de purificação do DBD. 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). (**B**) Concentrações crescentes do DBD purificado (1. 1 nM; 2. 10 nM; 3. 100 nM e 4. 1 μM) foram incubados com o oligonucleotídeo contendo o sítio distal de ligação a NFAT do promotor de IL-2 humano, marcado radioativamente ([γ^{32}P] ATP). Os complexos DNA-proteína foram analisados por EMSA e estão indicados pela seta (←).

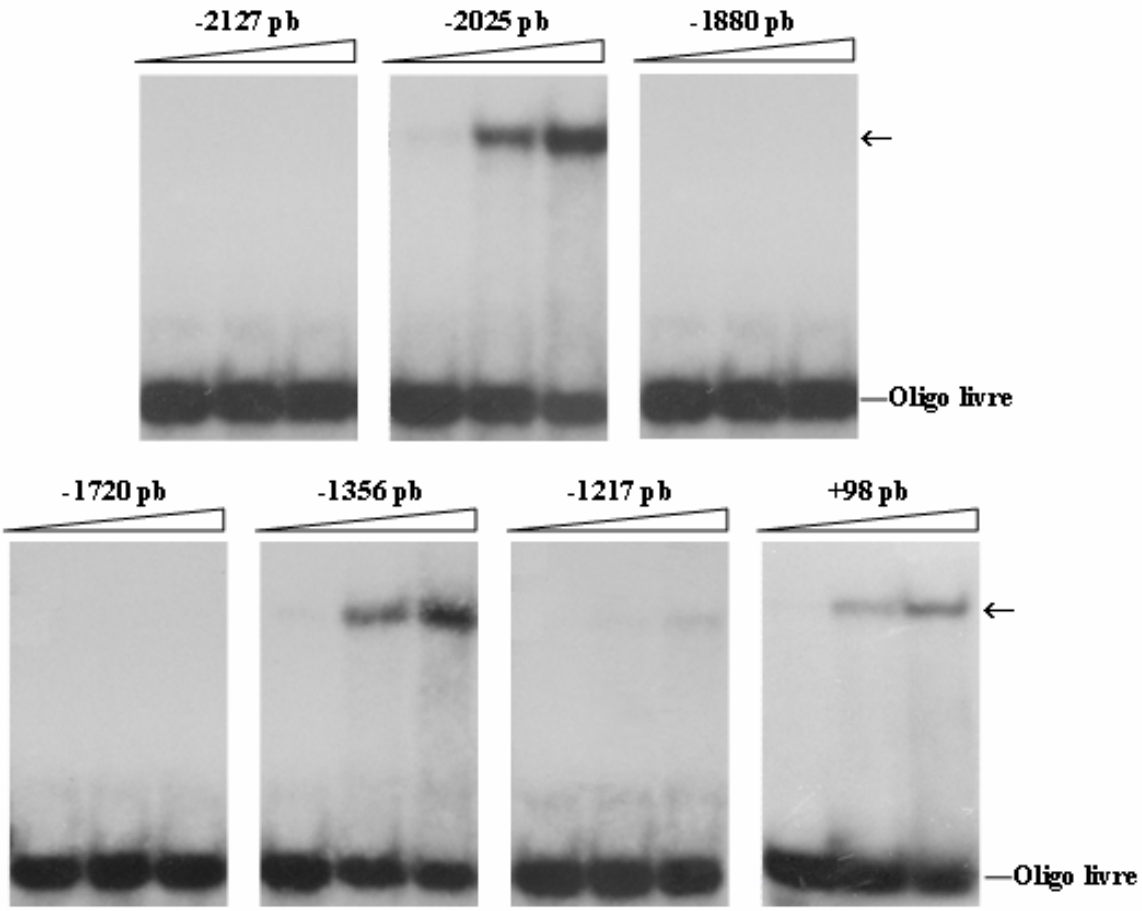


Figura 10 - O DBD do NFAT se liga ao promotor de *c-myc*. Os sete oligonucleotídeos contendo os supostos sítios de ligação para NFAT do promotor de *c-myc* murino (mostrados na Figura 8) foram marcados radioativamente ([γ^{32}P] ATP) e incubados com concentrações crescentes do DBD da proteína NFAT (100 nM, 500 nM e 1μM, respectivamente). Os complexos DNA-proteína foram então analisados por EMSA e estão indicados pela seta (←).

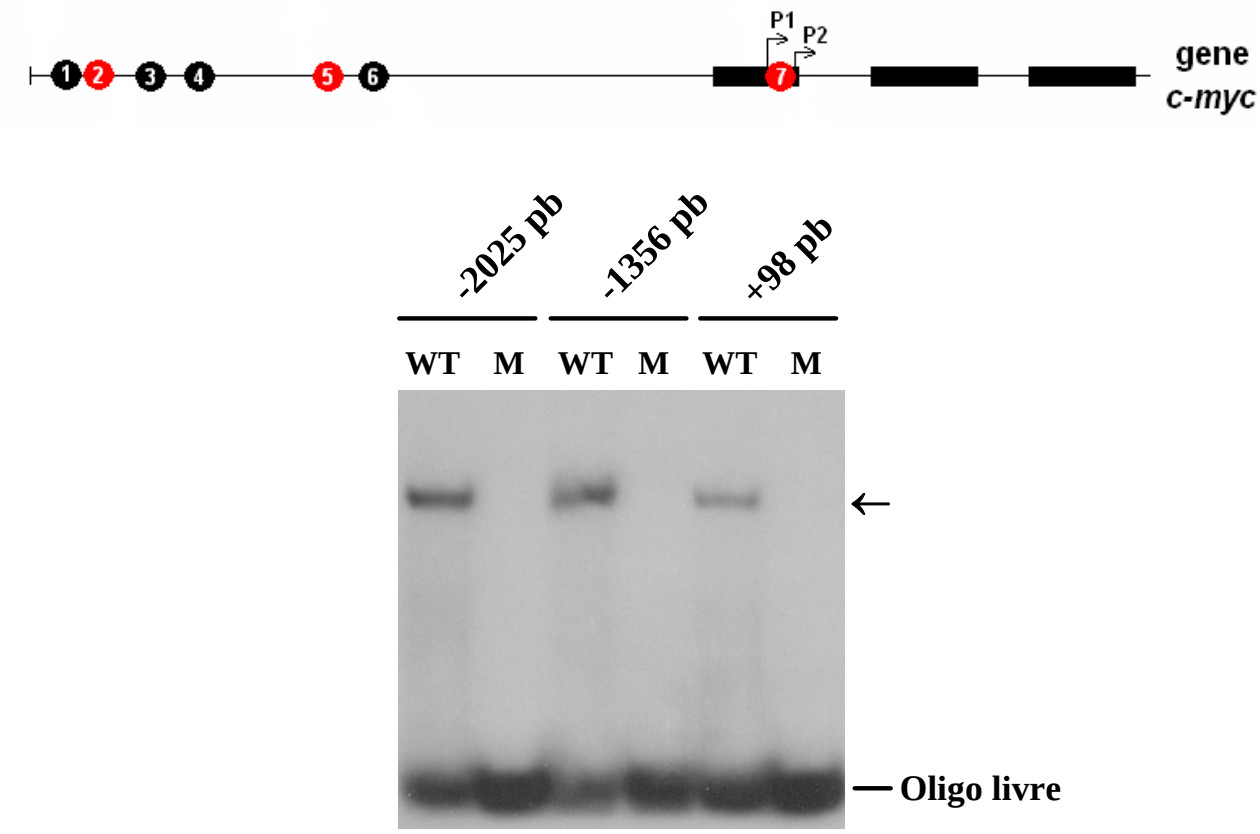


Figura 11 - A ligação do DBD do NFAT ao promotor de *c-myc* é específica. Os três oligonucleotídeos do promotor de *c-myc* que mostraram ligação (Figura 10 e mostrados em vermelho no esquema acima), foram mutados no núcleo canônico de ligação ao NFAT (GGAAA → ACTCA). Os oligos selvagens (WT) e mutados (M) foram marcados radioativamente ([γ^{32}P] ATP) e incubados com 500 nM do DBD da proteína NFAT. Os complexos DNA-proteína foram analisados por EMSA e estão indicados pela seta (←).

4.2.3 O NFAT1 se liga in vivo ao promotor de c-myc

Para demonstrar de forma definitiva 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 por uma semana para o fenótipo Th1 e, depois desse período, foram cultivados por mais 4 h na ausência de estímulo, ou foram estimulados com PMA e ionomicina. As células foram fixadas, para manter as interações DNA-proteína e o DNA foi então imunoprecipitado com os anticorpos anti-NFAT1 e 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 *lócus* de IFN- γ está permissível à transcrição e, portanto, aos fatores que o regulam, ao passo que o lócus de IL-4 se encontra silenciado (Avni *et al*., 2002). Como ilustrado na Figura 12, 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 dos supostos sítios de ligação para NFAT estudados (Figura 13A). 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 – 2127 pb e – 2025 pb e o par 2 amplifica a região que contém os sítios – 1356 pb e – 1217 pb. O par 3 amplifica a região que contém apenas o sítio + 98 pb. 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 bastante similar. Em relação à imunoprecipitação com anti-NFAT1, a ativação dos linfócitos NFAT1+/+ com de PMA e ionomicina induziu a ligação deste fator de transcrição ao sítio – 2025 pb, o que não ocorreu com os linfócitos NFAT1-/-, como esperado. Um resultado semelhante foi encontrado para o sítio – 1356 pb, apesar de já ser notada uma pequena ligação nas células não ativadas. Em contrapartida, a ligação do NFAT1 ao sítio + 98 pb não foi identificada nessas células. 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*.

Apesar dos pares de *primer* 1 e 2 também amplificarem as regiões que contêm os sítios – 2127 pb e – 1217 pb, respectivamente, a ligação identificada pelo ensaio de ChIP deve ser específica aos sítios - 2025 pb e - 1356 pb, já que o DBD do NFAT1 não se ligou aos dois primeiros. Ainda neste sentido, dos três sítios que interagiram com o DBD do NFAT1 nos ensaios *in vitro*, a interação com o sítio + 98 pb mostrou ser a de menor afinidade, justamente a ligação que não foi encontrada *in vivo*.

Este conjunto de resultados demonstra que, em linfócitos T $CD4^+$ diferenciados para Th1, o NFAT1 se liga *in vivo* a dois sítios do promotor de *c-myc*.

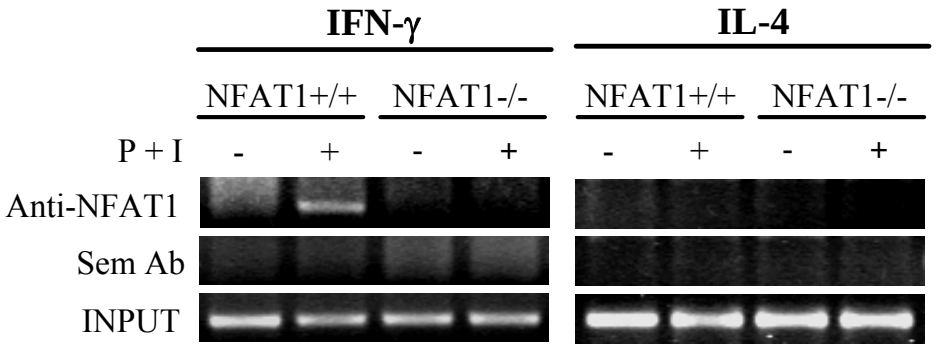


Figura 12 – Ligação do NFAT1 ao promotor de IFN-γ de células T CD4$^+$ diferenciadas para Th1. Linfócitos T CD4$^+$ foram isolados de camundongos NFAT1+/+ ou NFAT1-/- e diferenciados para Th1. Essas células foram mantidas não estimuladas ou estimuladas com PMA (10 nM) e ionomicina (1 mM) por quatro horas (P + I). Após este período, foi realizado um ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) com os extratos nucleares. A cromatina foi imunoprecipitada com anticorpos anti-NFAT1, ou sem anticorpos (SemAb). 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 PCR também foi realizada com o DNA purificado antes da imunoprecipitação (INPUT).

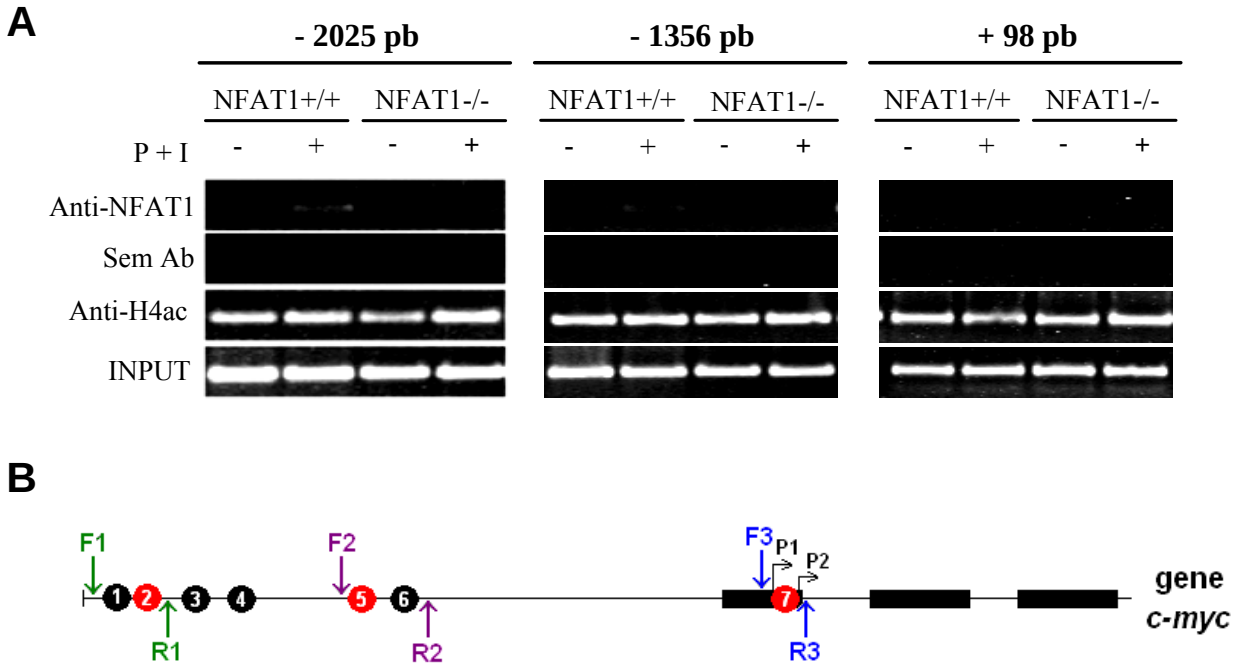


Figura 13 - *In vivo,* o NFAT1 se liga diretamente ao promotor de *c-myc*. Linfócitos T CD4^{+} foram isolados de camundongos NFAT1+/+ ou NFAT1-/- e diferenciados para Th1. Essas células foram mantidas não estimuladas ou estimuladas com PMA (10 nM) e ionomicina (1 mM) por quatro horas (P + I). Após esse período, foi realizado um ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) com os extratos nucleares, que foram imunoprecipitados com anticorpos anti-NFAT1, anti-histona H4 acetilada (anti-H4ac), ou sem anticorpos (SemAb). O DNA foi então purificado e analisado por PCR com *primers* específicos para as regiões do promotor de *c-myc* (**A**) que contêm os sítios de ligação para NFAT detectados pela técnica de EMSA (Figura 11). A PCR também foi realizada com o DNA purificado antes da imunoprecipitação (INPUT). (**B**) Representação do gene *c-myc*, como ilustrado na Figura 8. Em vermelho, os sítios que mostraram ligação pela técnica de EMSA. 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 -2025 pb, -1356 pb e + 98 pb, respectivamente, no ensaio de ChIP.

4.3 ENSAIOS DE TRANSATIVAÇÃO DO PROMOTOR DE *c-myc* HUMANO

Para avaliar a capacidade das proteínas NFAT1 transativarem o promotor de *c-myc* humano, as construções com este promotor, cedidas pelo Dr. Bert Vogelstein (Del-1-Del-4) (He *et al*., 1998), ou adquiridas da Addgene (Del-5 e Del-7) (Chen *et al*., 2001), foram renomeadas de acordo com a posição no promotor, em relação ao início de transcrição de P1 (Figura 14A). As construções foram linearizadas com a enzima de restrição Bgl II após MAXI-prep e o tamanho em quilobases foi verificado por gel de agarose a 0,8% (Figura 14B).

Primeiramente, a maior construção (-2271pb-luc), que contém todos os supostos sítios de NFAT, foi transfectada em células Jurkat e, após 24 h, as células foram mantidas por seis horas sem estímulo, para avaliar a transativação basal desta construção, ou foram estimuladas com PMA (10 nM) e/ou ionomicina (1 μM), para determinar o melhor estímulo a ser usado com as demais construções (Figura 15B). Como controle positivo, foi utilizado o vetor 3xNFAT (Luo *et al*., 1996), que contém três sítios canônicos de ligação para NFAT, clonados no vetor de luciferase pGL2 (Figura 15A). O vetor 3xNFAT praticamente não apresenta transativação nas células não estimuladas, mas essa transativação aumenta em torno de 20 vezes depois da estimulação, indicando que as proteínas NFAT de Jurkat são funcionais e capazes de transativação. Em relação ao promotor de *c-myc*, a construção -2271pb-luc apresentou uma enorme transativação nas células sem estímulo, em torno de 10^5 unidades relativas de luciferase. Em contrapartida, os estímulos utilizados não conferiram um aumento considerável, chegando a apenas 1,5 vezes, com PMA e ionomicina. Por ser o mais significativo, este estímulo foi selecionado para os experimentos com as demais deleções deste promotor.

Em seguida, os vetores com as diferentes deleções do promotor de *c-myc* foram transfectados em células Jurkat. Depois de 24 horas, as células foram estimuladas por 6 h com

a combinação de PMA (10 nM) e ionomicina (1μM) (Figura 16). A transativação da deleção MYC-2271pb-luc foi essencialmente igual a das deleções MYC-1058pb-luc e MYC-608pb-luc, atentando para o fato de que a MYC-1058pb-luc perde os seis sítios distais de NFAT, como pode ser observado na Figura 14A. Um aumento muito discreto, que não chegou a 1,5 vezes, foi obtido com as deleções MYC-350pb-luc e MYC+67pb-luc, enquanto houve uma queda brusca de transativação para a deleção MYC+150pb-luc, que perde o sítio proximal para NFAT. Entretanto, os 83 pb deletados nesta construção, retiram outros vários sítios já identificados, importantes para a transcrição de P2 (Facchini *et al*., 1997; Wierstra & Alves, 2008) e a diferença de transativação não pode ser atríbuída exclusivamente à deleção do sítio NFAT.

Como conclusão, não foram observadas diferenças de transativação entre as construções, que sugerissem alguma importância para os sítios de NFAT estudados, ou mesmo para outros sítios encontrados em regiões distantes do promotor basal de *c-myc*.

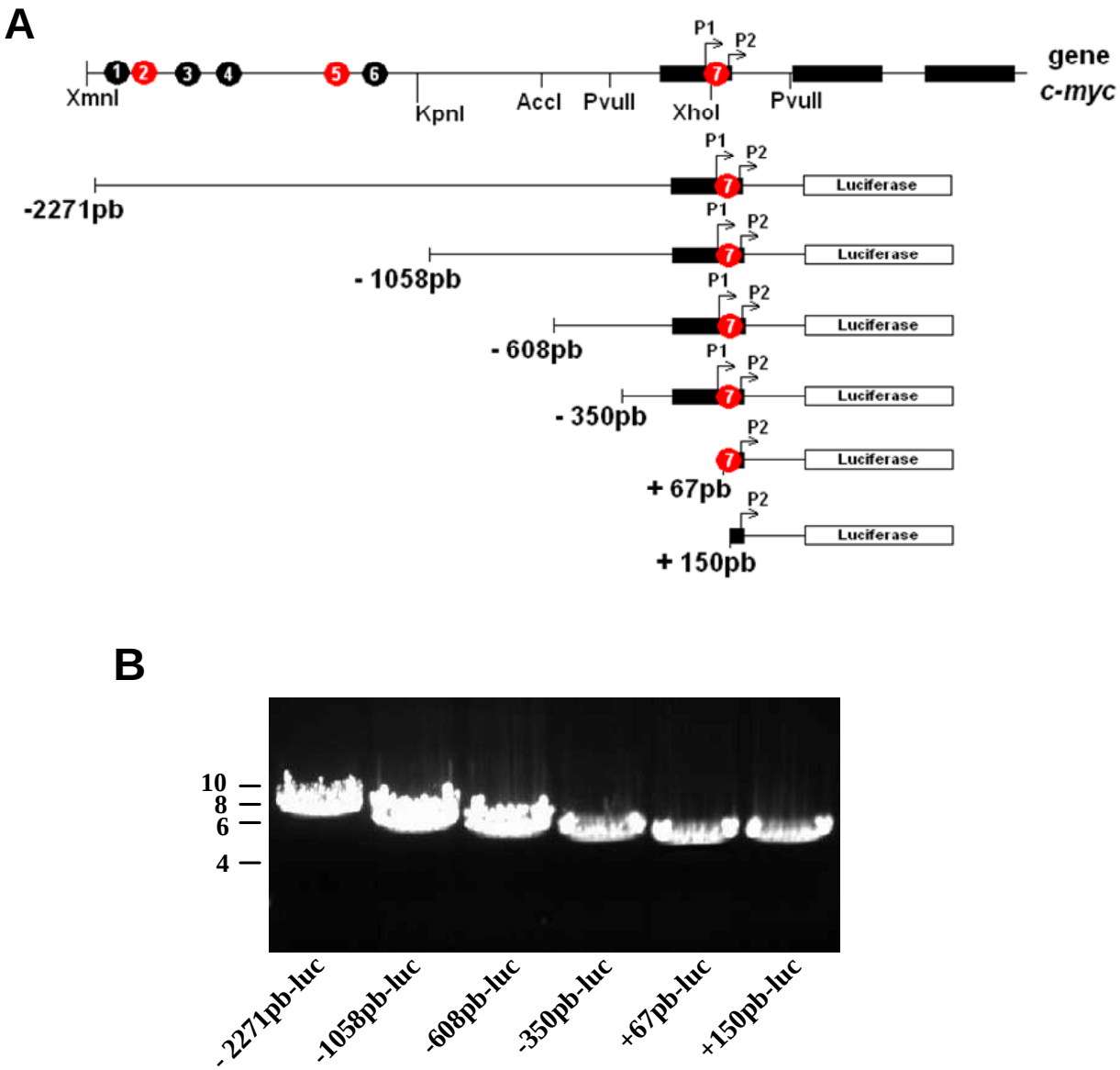


Figura 14 – Representação dos vetores contendo as deleções do promotor de *c-myc* humano. (**A**) Desenho esquemático do gene *c-myc* humano, mostrando os diferentes vetores utilizados, que contêm deleções deste promotor. Os sítios de ligação para NFAT que não apresentaram ligação no ensaio de EMSA estão indicados por círculos pretos e os que apresentaram, por círculos vermelhos. (**B**) Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), mostrando os vetores linearizados. À esquerda do gel, estão representadas as bandas do padrão de peso molecular, em Kbs.

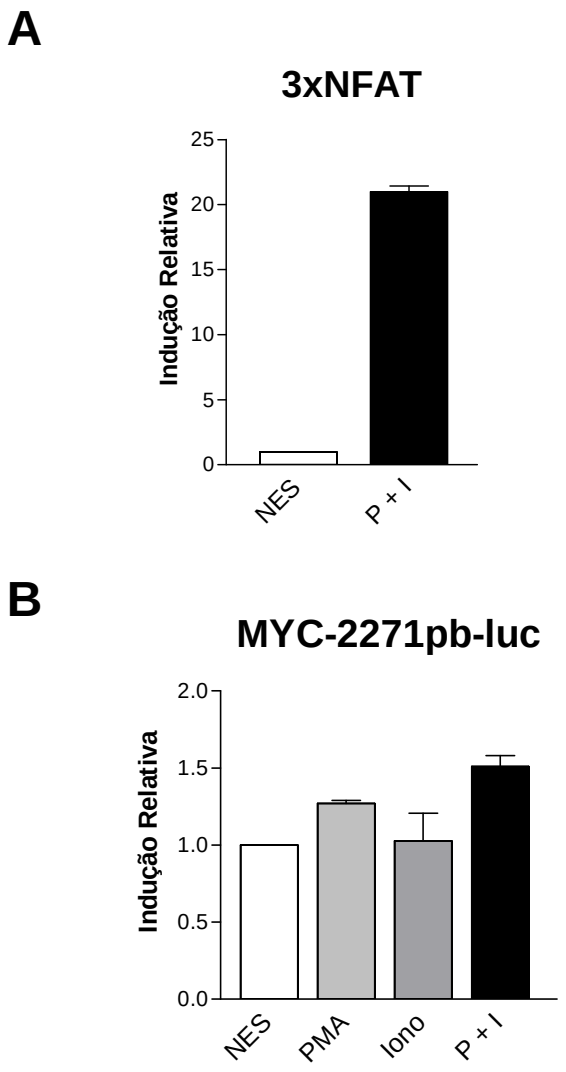


Figura 15 - Transativação do promotor de *c-myc* humano na linhagem celular Jurkat. Células Jurkat foram eletroporadas com 0,1 μg do vetor de renilla, pRL-TK e com o plasmídeo 3xNFAT (**A**), ou com o plasmídeo contendo o promotor completo de *c-myc* humano (MYC-2271pb-luc) (**B**). Depois de 24 h, as células foram mantidas por mais seis horas sem estímulo (NES) ou estimuladas com PMA (10 nM), ionomicina (1 μM) (iono), ou com a combinação dos dois (P + I), conforme indicado. Após este período, as células foram lisadas e o sobrenadante foi utilizado para a leitura de luciferase, que foi normalizada com a leitura de renilla. Os resultados estão expressos em relação ao NES.

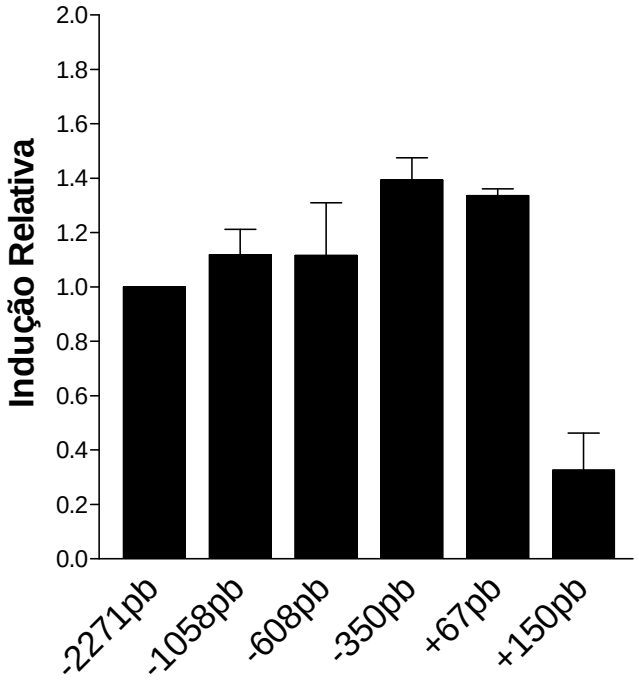


Figura 16 - Transativação das deleções do promotor de *c-myc* humano em células Jurkat. Células Jurkat ($3x10^6$ céls) foram eletroporadas com 5 μg dos vetores de luciferase e 0,1 μg do vetor de renilla, pRL-TK. Após 24 h, as células foram estimuladas com PMA (10 nM) e ionomicina (1 μM) por 6 h. Após esse período, as células foram lisadas e o sobrenadante foi utilizado para a leitura de luciferase, que foi normalizada com a leitura de renilla. Os resultados estão expressos em relação ao vetor - 2271pb-luc.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstra um importante papel regulatório para a via de Ca^{2+}/calcineurina/NFAT1 no controle da expressão do proto-oncogene *c-myc*. Primeiramente, foi mostrado que o mRNA de c-MYC é induzido pela estimulação via TCR em linfócitos T (Figura 5) e que essa indução é bloqueada por Ciclosporina A (Figura 6), fato que levou à sugestão do envolvimento das proteínas da família NFAT neste processo. Três dos quatro membros regulados por Ca^{2+} - NFAT1, NFAT2 e NFAT4 - são encontrados em linfócitos e qualquer um deles pode estar envolvido na regulação de c-MYC. Para avaliar a participação específica do membro NFAT1, linfócitos T provenientes de animais NFAT1+/+ e NFAT1-/- foram estimulados *in vitro* com anti-CD3 (Figura 7). A superexpressão do mRNA de c-MYC encontrada tanto nos linfócitos NFAT1-/- *naives* quanto nos diferenciados, levou à suposição de que NFAT1 está, direta ou indiretamente, reprimindo a expressão de c-MYC.

Linfócitos de camundongos NFAT1-/- apresentam um fenótipo pré-ativado, com aumento dos marcadores de ativação celular ($CD44^+$, $CD69^+$ e $CD62L^{low}$), acompanhado de um acúmulo pronunciado de células T e B na periferia e aumento das respostas imunes secundárias (Schuh *et al*., 1998; Caetano *et al*., 2002). Durante a infecção primária, parece haver uma terminação incompleta da resposta imune, já que não há deleção de células T oito dias após a aplicação do antígeno, o que pode ser a razão para o aumento da resposta secundária (Schuh *et al*., 1998). Linfócitos NFAT1-/- proliferam mais do que os NFAT1+/+ durante o estímulo primário com anti-CD3 (Teixeira, 2006) e durante o estímulo secundário com ovalbumina (Caetano *et al*., 2002), sugerindo haver uma desregulação intrínseca nestas células, que apenas se torna mais pronunciada durante a resposta secundária. A hiperproliferação dos linfócitos NFAT1-/- durante o estímulo secundário, foi acompanhada por um aumento da frequência de células nas fases S-G_2/M e um encurtamento de ciclo

celular, onde, possivelmente, os linfócitos NFAT1-/- saem antes dos NFAT1+/+ da fase G_0 do ciclo (Caetano *et al*., 2002). O fato da expressão de c-MYC estar aumentada nos linfócitos NFAT1-/-, mostrada no presente trabalho, pode pelo menos em parte justificar o descontrole de ciclo apresentado por estes linfócitos. c-MYC é praticamente indetectável em células quiescentes, mas é rapidamente induzido após ativação (Kelly *et al*., 1983; Reed *et al.*, 1985; Dean *et al*., 1986; Levine *et al*., 1986; Golay *et al*., 1992), sendo um importante regulador tanto da transição G_0/G_1 quanto da G_1/S (Facchini *et al*., 1997; Facchini & Penn, 1998; Dominguez-Sola *et al*., 2007). Sua superexpressão é suficiente para que as células quiescentes entrem em ciclo em alguns modelos (Facchini *et al*., 1997; Facchini & Penn, 1998). Os linfócitos de animais NFAT1-/- *naives*, apresentam uma expressão aumentada de c-MYC, sugerindo que, *in vivo*, estes linfócitos já estejam em fase de transição G_0/G_1 ou mesmo em G_1. Não existe diferença de porcentagem de células em fase S entre linfócitos NFAT1+/+ e NFAT1-/- *naives* em até 24 h pós estimulação *in vitro* com anti-CD3 (Teixeira, 2006), o que exclui a possibilidade dos linfócitos NFAT1-/- ultrapassarem o ponto de restrição de G_1 *in vivo* pela simples superexpressão de c-MYC, como pode ocorrer em outros tipos celulares, como em Rat-1A e BALB/c3T3 (Eilers *et al*., 1991). De qualquer forma, a possibilidade desses linfócitos não estarem quiescentes *in vivo*, sem a administração de um antígeno, os deixa mais sensíveis tanto à proliferação quanto à AICD ("Activation Induced Cell Death"), já que o desencadeamento da AICD é dependente da entrada em ciclo celular (Li *et al*., 2000). A expressão constitutiva de c-MYC está relacionada ao encurtamento da fase G_1 do ciclo em fibroblastos murinos (Facchini *et al*., 1997) e, como c-MYC regula vários genes importantes para a transição G_0/G_1, como as ciclinas D2 (Coller *et al*., 2000; Einsenman, 2001), CDK4 (Hermeking *et al*., 2000) e Cdc25 (Galaktionov *et al*., 1996), é provável que ao fornecer um estímulo mitogênico aos linfócitos NFAT1-/-, por já expressarem componentes importantes de fase G_1, estes proliferem mais rápido que os NFAT1+/+, que não os expressam.

A hiperproliferação dos linfócitos NFAT1-/- não deve ser atribuída apenas à desregulação de c-MYC, uma vez NFAT1 inibe diretamente a expressão de CDK4 (Baksh *et al*., 2002) e os linfócitos de camungongos NFAT1-/- desafiados com ovalbumina também superexpressam as ciclinas A2, B1, E e F (Caetano *et al*., 2002). Esses fatores devem agir em conjunto para levar ao descontrole do ciclo observado nos linfócitos NFAT1-/-. É importante notar que todos os dados que correlacionam NFAT1 e ciclo celular apontam esta proteína como um regulador negativo do ciclo. O mecanismo de regulação provido pelo NFAT1, pode servir para regular o grau das respostas imunes e/ou proliferativas e evitar que elas sejam exacerbadas.

Em relação à morte celular, Caetano *et al.* (2002) encontraram um aumento de apoptose nos linfócitos NFAT1-/-, quando comparados com os controles. Essa pode ser uma explicação para os camundongos NFAT1-/- não desenvolverem tumores: apesar da superexpressão de alguns genes de CDKs, ciclinas (Sherr *et al*., 2000, Vermeulen *et al*., 2003; Lindberg *et al*., 2007) e, principalmente, de c-MYC estarem relacionados com o desenvolvimento de tumores em diversos tecidos (Marcu *et al*., 1992; Facchini & Penn, 1998; Smith *et al*., 2005; Arvanitis & Felsher, 2006; Vita and Henriksson, 2006), as células desses camundongos proliferam mais, porém, morrem mais, não conseguindo sustentar o crescimento do tumor. Se a inibição das vias de apoptose for suficiente para o desencadeamento da tumorigênese nos camundongos NFAT1-/-, espera-se que a introdução de um gene anti-apoptótico, como o *bcl-2*, também leve ao surgimento de tumores nesses animais. De fato, a falta de NFAT1 predispõe as células ao desenvolvimento de tumores, uma vez que, quando expostos a carcinógenos como o metilcolantreno, esses camundongos os desenvolvem numa razão maior que os NFAT1+/+ (Robbs *et al*., 2008).

Foram encontrados por uma análise de bioinformática, sete supostos sítios de ligação para NFAT no promotor de *c-myc*, conservados em humanos e camundongos (Figura 8).

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 (- 2025 pb e -1356 pb) em relação ao proximal (+ 98 pb) (Figura 10). A ligação de NFAT1 aos dois sítios distais foi confirmada *in vivo*, por ensaios de imunoprecipitação de cromatina (ChIP), com linfócitos Th1 ativados por 4 horas com PMA e ionomicina (Figura 12). Este resultado 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, provavelmente reprimindo sua expressão, dado que os linfócitos NFAT1-/- expressam mais c-MYC do que os NFAT1+/+ (Figura 7).

O sítio mais distal de NFAT, posicionado a - 2025 pb, fica 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). Os autores sugerem que a proteína CTCF poderia funcionar como uma plataforma, na qual fatores de transcrição ainda não identificados se ligariam para mediar essa repressão (Gombert *et al*., 2003). A ligação de NFAT1 poderia preencher esses quesitos, uma vez que ele regula negativamente o promotor de genes de ciclo celular (Baksh *et al*., 2002; Carvalho *et al*., 2007) e é capaz de recrutar proteínas histona deacetilases (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). Durante a repressão do promotor, a região do CTCF se dobra de forma a se justapor com o início de transcrição de *c-myc* (Liu *et al*., 2006). Da mesma forma, o segundo sítio de ligação

para NFAT1 identificado pela análise de ChIP (- 1356 pb), se encontra entre os nucleotídeos - 1690 e - 1054 pb, em uma região que também forma uma estrutura curvada, de modo que pode se aproximar de elementos importantes da origem de transcrição (Kumar & Leffak 1989). Assim, a ligação da proteína NFAT1 ao promotor de *c-myc* pode interagir de duas maneiras com a maquinaria basal de transcrição para levar à sua repressão.

CDK4, assim como c-MYC, é uma proteína importante na transição de G_0/G_1, o que aponta o NFAT1 como um regulador de genes induzidos muito cedo durante a ativação. Em linfócitos T quiescentes, o NFAT1 corresponde por quase 90% de todo conteúdo de NFAT celular (Kiani *et al*., 2000). Após ativação, o NFAT1 transloca para o núcleo e induz a expressão da isoforma indutível de NFAT2 (Zhou *et al*., 2002). Neste primeiro momento, o NFAT1 se encontra em excesso e pode se ligar tanto ao promotor de *c-myc* quanto ao de CDK4, mas sua ligação pode não ser suficiente para manter a repressão desses genes. Para o promotor de *c-myc*, por exemplo, o somatório dos fatores que agem positiva e negativamente é que determina se o gene será transcrito (Wierstra *et al*., 2008). Assim, a ativação mitogênica deve estimular mais fatores que agem positivamente na regulação de *c-myc*, uma vez que ele pode ser detectado depois de 30 minutos de estimulação. A expressão da isoforma indutível de NFAT2 é detectada após 1 h de ativação (Zhou *et al*., 2002) e esse pode ser o momento em que ocorre uma troca da ocupação dos sítios antes ligados por NFAT1, para ligar NFAT2, uma vez que até o momento não foi mostrado que existe diferença de afinidade pelos sítios de NFAT entre os diferentes membros da família e a escolha de qual NFAT vai se ligar pode depender da disponibilidade. NFAT2 passa a regular positivamente a expressão de genes como *c-myc* e induzir a proliferação celular (Neal & Clipstone, 2003; Buchholz *et al*., 2006). Mecanismos de regulação pós-traducionais, como a sumoilação, podem agir um pouco mais tarde e favorecer a retenção nuclear de NFAT1 em detrimento dos outros membros da família (Terui *et al*., 2004). Neste momento, o NFAT1 pode cooperar com outros fatores, inclusive

com o próprio c-MYC, que regula negativamente seu promotor, e inibir a transcrição de *c-myc*. De fato, o pico de expressão de c-MYC em linfócitos diferenciados para Th1 é entre 2 e 3 h, seguido por um declínio brusco (Figura 5), que é condizente com a ligação de NFAT1 aos dois sítios distais do promotor de *c-myc*, no tempo de estimulação de 4 h (Figura 13).

Por outro lado, os ensaios de ChIP não identificaram a ligação do NFAT1 ao sítio proximal (+ 98 pb) do promotor de *c-myc* (Figura 13). Este resultado sugere que o NFAT1 não se liga a este sítio *in vivo*, provavelmente por ter pouca afinidade a ele, como sugere o ensaio de EMSA. Entretanto, o fato dessa interação não ter sido identificada, não exclui a possibilidade de que ela ocorra em algum outro momento. O sítio + 98 pb se localiza em uma região bem estudada do promotor mínimo, entre os dois principais inícios de transcrição de *c-myc*, onde sabidamente se ligam vários fatores de transcrição com sítios de ligação sobrepostos, como E2F, ETS-1/2, STAT3 e METS (Facchini *et al*., 1997; Wierstra & Alves, 2008). No tempo de 4 h de ativação, este sítio pode estar ocupado por um desses diversos outros fatores. Ainda neste sentido, a interação entre a proteína NFAT2 e o sítio + 98 pb do promotor de *c-myc*, foi identificada em uma linhagem de câncer pancreático, através de ensaios *in vitro* (*pulldown*). Apesar de dados consistentes indicarem que nessas células o NFAT2 está diretamente aumentando a expressão de c-MYC, essa interação também não foi encontrada por ensaios de ChIP (Buchholz *et al*. 2006), permanecendo a dúvida dessa interação ocorrer *in vivo*.

Dados de diferentes trabalhos indicam que, enquanto o fator de transcrição NFAT1 é um repressor da proliferação, o membro NFAT2 acelera a progressão do ciclo celular (Horsley & Pavlath, 2002). A expressão de uma proteína NFAT2 constitutivamente ativa, induz a expressão alterada das ciclinas D1 e D2 e de c-MYC em pré-adipócitos, além da proliferação em baixas concentrações de soro e do crescimento tumoral (Neal & Clipstone, 2003). A desregulação da expressão de c-MYC, também foi relacionada com o aumento da intensidade

de marcação nuclear para NFAT2 em câncer de pâncreas (Buchholz *et al*., 2006). Ainda em câncer, a superexpressão da quinase PIM-1 é associada com aumento da linfoproliferação, assim como da linfomagênese, especialmente em colaboração com c-MYC ou BCL-2. Interessantemente, a quinase PIM-1 pode fosforilar e aumentar a atividade de NFAT2 (Rainio *et al*., 2002). Fazendo uma ligação desses dados com modelos animais, a expressão de NFAT2 é aumentada em esplenócitos de camundongos NFAT1-/-, indicando que o aumento da expressão de NFAT2, encontrado em diferentes tumores, pode estar relacionado com uma diminuição de NFAT1. Como foi sugerido por Zhou *et al.*, (2002), na ausência de NFAT1, outros membros da família podem aumentar a expressão de NFAT2. Evidências claras indicam que os diferentes membros da família NFAT podem ter tanto papéis específicos, como redundantes ou mesmo antagonistas em diversos aspectos do desenvolvimento normal de células T (Macian, 2005). Essa complexidade também existe em outras linhagens celulares, mas em qual extensão essa perturbação contribui para o desenvolvimento do tumor, em diferentes fases da carcinogênese, é desconhecida até agora e, provavelmente, deve ser distinta em diferentes tipos de câncer (Medyouf *et al*., 2008). Dessa maneira, para manter a homeostasia celular, é importante que a expressão das diferentes proteínas da família NFAT seja cuidadosamente regulada.

A possibilidade de ocorrer uma diminuição na função de NFAT1 em tumores nunca foi analisada. A diminuição da expressão de NFAT1, ou mesmo a presença de mutações em sua proteína, poderiam levar tanto à diminuição da repressão do promotor de *c-myc*, quanto ao aumento de NFAT2 e, consequentemente, a uma maior indução de c-MYC e de outras proteínas de ciclo celular, contribuindo para a tumorigênese. Paralelamente, nos linfócitos T de camundongos NFAT1-/-, ocorre um aumento da ligação de E2F-1 e da acetilação de histona H3 no promotor de *cdk4* (Baksh *et al*., 2002). O aumento de expressão de CDK4 em tumores pancreáticos endócrinos foi justificado pela superexpressão de c-MYC, uma vez que

não foram encontradas amplificações ou mutações do gene ou da proteína CDK4 e c-MYC sabidamente regula este promotor (Hermeking *et al*., 2000) e está superexpresso nos tumores avaliados (Lindberg *et al*., 2007). Alternativamente, outra justificativa para o aumento de CDK4, poderia ser a diminuição da função de NFAT1, que inclusive poderia justificar a desregulação de c-MYC em diversos tipos de câncer onde a causa do aumento de sua expressão não é encontrada.

Afim de confirmar que a proteína NFAT1 reprime diretamente a expressão de c-MYC, ensaios de transativação com o promotor de *c-myc* humano foram realizados em células Jurkat. A transativação do vetor 3x NFAT, utilizado como controle positivo, aumentou em torno de 20 vezes com o estímulo de PMA e ionomicina, mostrando que tanto o estímulo, quanto as proteínas NFAT endógenas de Jurkat são funcionais (Figura 15A). Embora o mesmo estímulo tenha aumentado o sinal do promotor completo de *c-myc* (MYC-2271pb-luc) em 1,5 vezes, quando comparado ao não estimulado (Figura 15B), esperava-se que houvesse um aumento muito maior, já que os ensaios de PCR em tempo real (Figuras 5, 6 e 7), assim como a literatura, demonstram que um estímulo mitogênico ativa o promotor *c-myc*. Ainda mais inesperados foram os resultados de transativação com as deleções do promotor (Figura 16), onde apenas a região que engloba o promotor mínimo de P2 se mostrou funcional, uma vez que quando 90% dessa região é deletada (MYC+150pb-luc), a transativação do promotor é praticamente abolida. Em contrapartida, a presença de toda região 5' do promotor se mostrou indiferente. Praticamente não existe diferença de transativação entre as três construções maiores (MYC-2271pb-luc, MYC-1058pb-luc e MYC-608pb-luc), nem entre elas e as construções que retêm a região mínima de P1 e de P2 (MYC-350pb-luc) ou apenas a região mínima de P2 (MYC+67pb-luc). Consistentemente, não encontramos diferença de transativação entre as construções de *c-myc*, quando um plasmídeo que codifica NFAT1 foi co-transfectado em células Jurkat (dados não mostrados).

A região de 1213 pb deletada entre as construções MYC-2271pb-luc e MYC-1058pb-luc, além de retirar os seis sítios distais de ligação de NFAT, deleta sequências definidas como importante reguladoras do promotor de *c-myc*, como o elemento FUSE, onde se liga a proteína FBP, localizada a aproximadamente -1536 pb (ver Apêndice I) (Avigan *et al*., 1990; Duncan *et al*., 1994; He *et al*., 2000). Essa proteína é considerada o regulador *master* de *c-myc* e é aceito que a ausência dela inibe a transcrição tanto de P1 quanto de P2. Assim, independente da regulação pelas proteínas NFAT, o resultado dos ensaios de transativação não condiz com a regulação fisiológica já conhecida do promotor de *c-myc*. Este não é um achado isolado, dado que várias outras tentativas de reconstituir a regulação deste promotor em linhagens celulares transfectadas também não foram bem sucedidas (Pullner *et al*., 1996; Liu & Levens, 2006). Existe uma enorme diferença na regulação deste promotor entre células primárias e linhagens celulares. Nas últimas, c-MYC é expresso constantemente e em pequena quantidade durante todo o ciclo (Rabbits *et al*., 1985). Aparentemente, existe um controle positivo permanente, que pode ser conferido pelo soro encontrado no meio de cultura, suficiente para induzir a expressão do promotor e a proliferação celular. Por outro lado, precisa haver um controle negativo, que ocorre provavelmente pelo mecanismo de auto-regulação negativa, para manter os níveis de c-MYC sempre baixos. Assim, se estabelece um *feedback*, onde um aumento da transcrição é compensado por um aumento da repressão do promotor (Wierstra & Alves, 2008), já que o mecanismo de auto-regulação é dependente da quantidade de proteína c-MYC (Penn *et al*., 1990), enquanto uma diminuição de sua transcrição é contrabalanceada pela diminuição da repressão. Nesse modelo, a flutuação na ativação do promotor pelos vários transativadores não parece importar, porque a auto-supressão opera para limitar a transcrição a um nível baixo (Wierstra & Alves, 2008). Como consequência, o gene transfectado muitas vezes se torna reprimido e não indutível por

estímulos que fortemente induziriam a transcrição de *c-myc* endógeno (Pullner *et al*., 1996; Liu & Levens, 2006).

A regulação do promotor de *c-myc* é complexa e ainda pouco compreendida (Marcu *et al.*, 1992; Liu & Levens, 2006). Muitas vias de sinalização, fatores de transcrição e elementos regulatórios em *cis* podem regular sua expressão positiva ou negativamente, mas não existe um modelo que possa explicar como todos estes fatores são integrados e processados (Wierstra *et al*., 2008). Neste trabalho, foi mostrado pela primeira vez, que o fator de transcrição NFAT1 se liga *in vitro* e *in vivo* ao promotor de *c-myc*. Embora os dados aqui apresentados indiquem que essa interação leve à repressão do promotor de *c-myc*, experimentos futuros serão necessários para provar como ela ocorre fisiologicamente. A sinalização das proteínas NFAT tem emergido como um mecanismo regulatório potente e multifuncional, governando o crescimento, a sobrevivência e a homeostasia de células normais e transformadas. Consequentemente, a desregulação ou a ativação ectópica da vias de sinalização do NFAT, estão começando a ser reconhecidas como importante contribuidores da transformação oncogênica, em diversas malignidades humanas (Buchholz & Ellenrieder, 2007).

6 CONCLUSÕES

- A via de Ca^{2+}/calcineurina/NFAT é essencial para a indução do mRNA de c-MYC em linfócitos T $CD4^+$ ativados pelo TCR. Os linfócitos T $CD4^+$ *naives*, assim como os diferenciados para Th1 de animais NFAT1-/-, expressam níveis aumentados de c-MYC quando comparados aos linfócitos NFAT1+/+ e isso ocorre independente da presença de estímulo;

- Através de uma análise de bioinformática com o promotor de *c-myc*, foram encontrados sete supostos sítios de ligação para o fator de transcrição NFAT, conservados em humanos e camundongos;

- Em ensaios *in vitro*, o NFAT se liga especificamente a três destes sítios, enquanto ensaios de imunoprecipitação de cromatina com linfócitos T $CD4^+$ diferenciados para Th1 mostraram que *in vivo*, o NFAT1 se liga a pelo menos dois deles.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adhikary, S.; Eilers, M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**:635-46, 2005.

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.

Avigan, M.I.; Strober, B.; Levens, D. A far upstream element stimulates *c-myc* expression in undifferentiated leukemia cells. *J Biol Chem*, **265**(30):18538-45, 1990.

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.

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.

Battey, 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.

Buchholz, M.; Schatz, A.; Wagner, M.; Micl, 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 Ca^{2+}/calcineurin/NFAT signaling in cancerogenesis. *Cell Cycle*, **6**(1):16-9, 2007.

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.

Cappellen, D.; Schlange, T.; Bauer, M.; Maurer, F.; Hynes, N.E. Novel c-MYC target genes mediate differential effects on cell proliferation and migration. *EMBO Rep*., **8**(1):70-6, 2007.

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.

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.

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.

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

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. Regulatin of c-myc transcription and mRNA abundance by serum growth factors and cell contact, *J Biol Chem*., **261**(20):9161-66, 1986.

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.

Duncan, R.; Bazar, L.; Michelotti, G.; Tomonaga, T.; Krutzsch, H.; Aviagan, M. Levens, D. A sequence-specific, single-strand binding protein activates the far upstream element of *c-myc* and defines a new DNA-binding motif. *Genes Dev.*, **8**:465-80, 1994.

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.

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

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

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. *Moll 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.; Lobanenkov, 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.

Furue 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.

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

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.

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

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.

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 Targe 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.; Volgelstein, B.; Kinzler, K. Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *PNAS*, **97**(5):2229-34, 2000.

Hernández, 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. Hyperploriferation 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.

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.

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.

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.; Poulsom, 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.

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.

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.

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 posttranscriptional control of *c-myc* gene expression in WEHI 231 cells. *Mol Cell Biol.*, **6**:4112-16, 1986.

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.

Lindberg D, Hessman O, Akerström G, Westin G. Cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) expression in pancreatic endocrine tumors. *Neuroendocrinology*, **86**(2):112-8, 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, 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.

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

Murphy, K.M.; Reiner, S.L. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol.*, **2**:933-944, 2002.

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.

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

Ohler, U. Niemann, H. Identification and analysis of eukaryotic promoters: recent computational approaches. *Trends Genet*, 17:56-60, 2001.

Okamura, H.; Aramburu, J.; García-Rodríguez, C.; Viola, J.P.B.; Raghavan, A.; Tahiliani, 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.

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.

Pelengaris S.; Khan, M.; Evan, G.I. Supression 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.

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.; Gravallese, 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.; Gravallese, 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.; Gravallese, 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.

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.

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, 2008, submetido.

Roeder, R. G. 1991. The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biochem Sci*, **16**:402-408.

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

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.

Schuh, K.; Kneitz, B.; Heyer, J.; Bommhardt, U.; Jankevics, E.; Berberich-Siebelt, F.; Pfeffer, K.; Muller-Hermelink, H.K.; Schimpl, A.; Serfling, E. Retarded thymic involution and

massive germinal center formation in NF-ATp-deficient mice. *Eur J Immunol.,* **28**:2456-66, 1998.

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.

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.

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

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 G_2/M transition. *Biochim Biophys Acta*, **1519**:1-12, 2001.

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.; Sullivan, B.M.; Stemmann, C.; Satoskar, A.R.; Sleckman, B.P.; Glimcher, L.H. Distinct effects of T-bet in T_H1 lineage commitment and IFN-γ production in CD4 and CD8 T cells. *Science*, **295**:338-42, 2002.

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.

Terui, Y.; Saad, N.; Jia, S.; McKeon, F.; Yuan, J. Dual role of sumoylation in the nuclear localization and transcriptional activation of NFAT1. *J Biol Chem.*, **279**(27):28257-65, 2004.

Teixeira, L.A.K. Partiipação 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 fibroblastas. *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.

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 cycley: a reviw of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolfi.*, **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*, [Epub ahead of print] 1-11, 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, 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.

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.

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.

Zawel, L. & Reinberg, D. 1995. Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes. *Annu Rev Biochem*, **64**:533-561.

Zhou, B.; Cron, R.Q.; Wu, B.; Genin, A.; Wang, Z.; Liu, S.; Robson, P.; Baldwin, H.S. Regulation of the murine Nfatc1 gene by NFATc2. *J Biol Chem.*, **277**(12):10704-11, 2002.

APÊNDICE I - REGIÃO PROMOTORA DO GENE *c-myc*

As seqüências genômicas do promotor de *c-myc* de humanos e camundongos foram obtidas do banco de dados do Ensembl, como descrito no item 3.7 e estão numeradas em relação a P1 (destacada em preto). Em vermelho, estão representados os supostos sítios de ligação para o fator de transcrição NFAT, encontrados pela análise de bioinformática; em cinza, a região onde se liga CTCF (Gombert *et al*., 2003); em azul, a região do FUSE (Duncan *et al*., 1994, He *et al*., 2000) e em amarelo, a região onde se liga FPB (Avigan *et al*., 1990). O TATA Box de P1 e P2 estão destacados em roxo.

>*Homo sapiens*

```
-2219 AGCAGTGGTGATAGGTTAATTTTCACCATCTCTTATGCGGTTGAATAGTCACCTCTGAAC -2160
-2159 CACTTTTTCCTCCAGTAACTCCTCTTTCTTCGGACCTTCTGCAGCCAACCTGAAAGAATA -2100
-2099 ACAAGGAGGTGGCTGGAAACTTGTTTTAAGGAACCGCCTGTCCTTCCCCCGCTGGAAACC -2040
-2039 TTGCACCTCGGACGCTCCTGCTCCTGCCCCCACCTGACCCCCGCCCTCGTTGACATCCAG -1980
-1979 GCGCGATGATCTCTGCTGCCAGTAGAGGGCACACTTACTTTACTTTCGCAAACCTGAACG -1920
-1919 CGGGTGCTGCCCAGAGAGGGGGCGGAGGGAAAGACGCTTTGCAGCAAAATCCAGCATAGC -1860
-1859 GATTGGTTGCTCCCCGCGTTTGCGGCAAAGGCCTGGAGGCAGGAGTAATTTGCAATCCTT -1800
-1799 AAAGCTGAATTGTGCAGTGCATCGGATTTGGAAGCTACTATATTCACTTAACACTTGAAC -1740
-1739 GCTGAGCTGCAAACTCAACGGGTAATAACCCATCTTGAACAGCGTACATGCTATACACGC -1680
-1679 ACCCCTTTCCCCCGAATTGTTTTCTCTTTTGGAGGTGGTGGAGGGAGAGAAAAGTTTACT -1620
-1619 TAAAATGCCTTTGGGTGAGGGACCAAGGATGAGAAGAATGTTTTTTGTTTTTCATGCCGT -1560
-1559 GGAATAACACAAAATAAAAAATCCCGAGGGAATATACATTATATATTAAATATAGATCAT -1500
-1499 TTCAGGGAGCAAACAAATCATGTGTGGGGCTGGGCAACTAGCTAAGTCGAAGCGTAAATA -1440
-1439 AAATGTGAATACACGTTTGCGGGTTACATACAGTGCACTTTCACTAGTATTCAGAAAAAA -1380
-1379 TTGTGAGTCAGTGAACTAGGAAATTAATGCCTGGAAGGCAGCCAAATTTTAATTAGCTCA -1320
-1319 AGACTCCCCCCCCCCCAAAAAAAGGCACGGAAGTAATACTCCTCTCCTCTTCTTTGATCA -1260
-1259 GAATCGATGCATTTTTTGTGCATGACCGCATTTCCAATAATAAAAGGGGAAAGAGGACCT -1200
-1199 GGAAAGGAATTAAACGTCCGGTTTGTCCGGGGAGGAAAGAGTTAACGGTTTTTTTCACAA -1140
-1139 GGGTCTCTGCTGACTCCCCCGGCTCGGTCCACAAGCTCTCCACTTGCCCCTTTTAGGAAG -1080
-1079 TCCGGTCCCGCGGTTCGGGTACCCCCTGCCCCTCCCATATTCTCCCGTCTAGCACCTTTG -1020
-1019 ATTTCTCCCAAACCCGGCAGCCCGAGACTGTTGCAAACCGGCGCCACAGGGCGCAAAGGG  -960
 -959 GATTTGTCTCTTCTGAAACCTGGCTGAGAAATTGGGAACTCCGTGTGGGAGGCGTGGGGG  -900
 -899 TGGGACGGTGGGGTACAGACTGGCAGAGAGCAGGCAACCTCCCTCTCGCCCTAGCCCAGC  -840
 -839 TCTGGAACAGGCAGACACATCTCAGGGCTAAACAGACGCCTCCCGCACGGGGCCCCACGG  -780
```

```
-779 AAGCCTGAGCAGGCGGGGCAGGAGGGGCGGTATCTGCTGCTTTGGCAGCAAATTGGGGGA  -720
-719 CTCAGTCTGGGTGGAAGGTATCCAATCCAGATAGCTGTGCATACATAATGCATAATACAT  -660
-659 GACTCCCCCCAACAAATGCAATGGGAGTTTATTCATAACGCGCTCTCCAAGTATACGTGG  -600
-599 CAATGCGTTGCTGGGTTATTTTAATCATTCTAGGCATCGTTTTCCTCCTTATGCCTCTAT  -540
-539 CATTCCTCCCTATCTACACTAACATCCCACGCTCTGAACGCGCGCCCATTAATACCCTTC  -480
-479 TTTCCTCCACTCTCCCTGGGACTCTTGATCAAAGCGCGGCCCTTTCCCCAGCCTTAGCGA  -420
-419 GGCGCCCTGCAGCCTGGTACGCGCGTGGCGTGGCGGTGGGCGCGCAGTGCGTTCTCGGTG  -360
-359 TGGAGGGCAGCTGTTCCGCCTGCGATGATTTATACTCACAGGACAAGGATGCGGTTTGTC  -300
-299 AAACAGTACTGCTACGGAGGAGCAGCAGAGAAAGGGAGAGGGTTTGAGAGGGAGCAAAAG  -240
-239 AAAATGGTAGGCGCGCGTAGTTAATTCATGCGGCTCTCTTACTCTGTTTACATCCTAGAG  -180
-179 CTAGAGTGCTCGGCTGCCCGGCTGAGTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCACCCTC  -120
-119 CCCATAAGCGCCCCTCCCGGGTTCCCAAAGCAGAGGGCGTGGGGGAAAAGAAAAAAGATC   -60
 -59 CTCTCTCGCTAATCTCCGCCCACCGGCCCTTTATAATGCGAGGGTCTGGACGGCTGAGGA     1
   2 CCCCCGAGCTGTGCTGCTCGCGGCCGCCACCGCCGGGCCCCGGCCGTCCCTGGCTCCCCT    61
  62 CCTGCCTCGAGAAGGGCAGGGCTTCTCAGAGGCTTGGCGGGAAAAAGAACGGAGGGAGGG   121
 122 ATCGCGCTGAGTATAAAAGCCGGTTTTCGGGGCTTTATCTAACTCGCTGTAGTAATTCCA   181
 182 GCGAGAGGCAGAGGGAGCGAGCGGGCGGCCGGCTAGGGTGGAAGAGCCGGGCGAGCAGAG   241
```

>*Mus musculus*

```
-2219 GGGCTCTGTTTTGGGTGACTGTCAGAAAGTAGGGATGGGTTCATCTACTCCCCCTCTTTG -2160
-2159 CAACTGAATAGCCACCTCTGAACCATTTTTTTCTCTAGTAATTTCTCTTCCTTTGCCTCC -2100
-2099 TTTGCAGCCTAAAAGAGTCATTTAAAGGATGACCGGAAGCTTGTCTTAGGCAAGGAAGCA -2040
-2039 TCTTCCCAGAACCTGGAAACCCTGCAGCCCTGCCCCCATCCGACCTCCGCCCTCGTTGGC -1980
-1979 TTCGCAACGCTGTGGTCTCTGTGGCCAGTAGAGGGCACACTTACTTTACTTTCACAAATC -1920
-1919 CGAGAGCCACAACCCGGGTGGTGGGGGGTGAGGGGGCGGGGAAAGAGTCTCTGCAGCAAA -1860
-1859 ACGCAGACTAGGGATTGGTGGCTCTTGGTGTTTGAGGCAAAATCCTAGAGGCTGTAGTCA -1800
-1799 TTTTGCAATCCTTAAAGCTGAATTGTGCAATGAGCTCGATGAAGGAAGATACTATCATTC -1740
-1739 AACAGCTGAATCCTAAATTGCAAACTCAGTGGCTAATAACAACTTTGAACAATGAGCACC -1680
-1679 TTATACACGCTACTGTATTTTCTTTTCTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAACC -1620
-1619 GGGTAGCAGTGAGAGAGGTTTCTTTAAGTGCCTTGGGGCGAGGAGTCCGGAATAAGAAGA -1560
-1559 CTTCTTTGGGTTTTAAAGTGTAGGATAAGCAAATCCCGAGGGAATATGCATTATATAATA -1500
-1499 AATCTAGAACCAATGCACAGAGCAAAAGACTCATGTTTCTGGTTGGTTAATAAGCTAGAT -1440
-1439 TATCGTGTATATATAAAGTGTGTATGTATACGTTTGGGGATTGTACAGAATGCACAGCGT -1380
-1379 AGTATTCAGGAAAAAGGAAACTGGGAAATTAATGTATAAATTAAAATCAGCTTTTAATTA -1320
-1319 GCTTAACACACACATACGAAGGCAAAAATGTAACGTTACTTTGATCTGATCAGGGCCGAC -1260
-1259 TTTTTTTTTTAAGTGCATAATTACGATTCCAGTAATAAAAGGGGAAAGCTTGGGTTTGTC -1200
-1199 CTGGGAGGAAGGGGTTAACGGTTTTCTTTATTCTAGGGTCTCTGCAGGCTCCCCAGATCT -1140
-1139 GGGTTGGCAATTCACTCCTCCCCCTTTCTGGGAAGTCCGGGTTTTCCCCAACCCCCCAAT -1080
-1079 TCATGGCATATTCTCGCGTCTAGCGCCTTGATTTTCCCCACCCCAGCTCCTAAACCAGAG -1020
-1019 TCTGCTGCAAACTGGCTCCACAGGGGCAAAGAGGATTTGCCTCTTGTGAAAACCGACTGT  -960
 -959 GGCCCTGGAACTGTGTGGAGGTGTATGGGGTGTAGACCGGCAGAGACTCCTCCCGGAGGA  -900
 -899 GCCGGGTAGAGCGCACCCGCCGCCACTTTACTGGACTGCGCAGGGAGACCTACAGGGGAA  -840
```

```
-839 AGAGCCGCCTCCACACCACCCGCCGGGTGGAAGTCCGAACCGGAGGTGCTGGAGTGTGTG  -780
-779 TGTGGGGGGGGGGGGAATCTGCCTTTTGGCAGCAAATTGGGGGGGGGGTCGTTCTGGA  -720
-719 AAGAATGTGCCCAGTCAACATAACTGTACGACCAAAGGCAAAATACACAATGCCTTCCCC  -660
-659 GCGAGATGGAGTGGCTGTTTATCCCTAAGTGGCTCTCCAAGTATACGTGGCAGTGAGTTG  -600
-599 CTGAGCAATTTTAATAAAATTCCAGACATCGTTTTTCCTGCATAGACCTCATCTGCGGTT  -540
-539 GATCACCCTCTATCACTCCACACACTGAGCGGGGGCTCCTAGATAACTCATTCGTTCGTC  -480
-479 CTTCCCCCTTTCTAAATTCTGTTTTCCCCAGCCTTAGAGAGACGCCTGGCCGCCCGGGAC  -420
-419 GTGCGTGACGCGGTCCAGGGTACATGGCGTATTGTGTGGAGCGAGGCAGCTGTTCCACCT  -360
-359 GCGGTGACTGATATACGCAGGGCAAGAACACAGTTCAGCCGAGCGCTGCGCCCGAACAAC  -300
-299 CGTACAGAAAGGGAAAGGACTAGCGCGCGAGCAAGAGAAAATGGTCGGGCGCGCAGTTAA  -240
-239 TTCATGCTGCGCTATTACTGTTTACACCCCGGAGCCGGAGTACTGGGCTGCGGGGCTGAG  -180
-179 GCTCCTCCTCCTCTTTCCCCGGCTCCCCACTAGCCCCCCTCCCGAGTTCCCAAAGCAGAG  -120
-119 GGCGGGGAAGCGAGAGGAGGAAAAAAAAATAGAGAGAGGTGGGGAAGGGAGAAAGAGAGA   -60
 -59 TTCTCTGGCTAATCCCCGCCCACCCGCCCTTTATATTCCGGGGGTCTGCGCGGCCGAGGA     1
   2 CCCCTGGGCTGCGCTGCTCTCAGCTGCCGGGTCCGACTCGCCTCACTCAGCTCCCCTCCT    61
  62 GCCTCCTGAAGGGCAGGGCTTCGCCGACGCTTGGCGGGAAAAAGAAGGGAGGGGAGGGAT   121
 122 CCTGAGTCGCAGTATAAAAGAAGCTTTTCGGGCGTTTTTTTCTGACTCGCTGTAGTAATT   181
 182 CCAGCGAGAGACAGAGGGAGTGAGCGGACGGTTGGAAGAGCCGTGTGTGCAGAGCCGCGC   241
```

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo