

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE
Rasgef1b E AVALIAÇÃO DE COMPONENTES DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE
RECEPTORES DO TIPO TOLL (TLRs) SOBRE SUA REGULAÇÃO**

FELIPE BATISTA LEÃO

ORIENTADOR: PROF. ARISTÓBOLO MENDES DA SILVA

BELO HORIZONTE
FEVEREIRO DE 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE
Rasgef1b E AVALIAÇÃO DE COMPONENTES DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE
RECEPTORES DO TIPO TOLL (TLRs) SOBRE SUA REGULAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título
de Mestre em Biologia Celular.

BELO HORIZONTE
FEVEREIRO DE 2016



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

FELIPE BATISTA LEÃO

273/2016
entrada
2º/2014
2014719637

Às **nove horas** do dia **19 de fevereiro de 2016**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RASGEF1B E AVALIAÇÃO DE COMPONENTES DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE RECEPTORES DO TIPO TOLL (TLPS) SOBRE SUA REGULÇÃO**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Aristóboło Mendes da Silva**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Aristóboło Mendes da Silva	UFMG	Aprovado
Dr. Enrrico Bloise	UFMG	Aprovado
Dra. Élıda Mara Leite Rabelo	UFMG	Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado: Aprovado

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 19 de fevereiro de 2016.**

Dr. Aristóboło Mendes da Silva (Orientador) Aristóboło Mendes da Silva

Dr. Enrrico Bloise Enrrico Bloise

Dra. Élıda Mara Leite Rabelo Élıda Mara Leite Rabelo

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Profa. Cristina Guatimozim Fonseca
Coordenadora do Programa de Pós Graduação
em Biologia Celular ICB / UFMG

Cristina Guatimozim Fonseca

*Dedico essa obra em memória
de Eliane Batista de Paulo,
outra mãe que a vida me deu.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à minha família pelo amor incondicional, pela confiança, pelo carinho, pela torcida e por todo o apoio que sempre me foi dado em todas as minhas escolhas. Principalmente ao meu pai e à minha mãe por serem minha base e meu exemplo de vida. Todas as minhas conquistas eu devo a vocês.

Agradeço ao professor Aristóbolo pela confiança, paciência, por todo o conhecimento transmitido com boa vontade e entusiasmo, e por orientar meus passos pelo caminho da ciência durante todos esses anos, sendo fundamental em minha formação profissional como pesquisador.

A todos os colegas e amigos que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Genes Inflamatórios, Heliana, Brener, Fernanda, Grazi, Mari, Isadora, Igor, Kathleen e Josy, pelo companheirismo, boa vontade em ajudar, e por proporcionarem um ambiente de trabalho amigável, colaborativo e respeitoso. Em especial ao Brener e Grazi que contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos amigos de Belo Horizonte, aos velhos amigos de Formiga e aos grandes amigos e antigos companheiros da República Niniquiana por compartilharem e proporcionarem alguns dos melhores momentos da vida. Tenho o privilégio de possuir tantos amigos, que não conseguiria citar o nome de cada um. Quem é, sabe. Obrigado por tornarem essa viagem mais leve e prazerosa.

À Mery pelo amor, carinho, dedicação, amizade e companheirismo. Obrigado pela paciência e pelo apoio fundamental para que eu conseguisse não só concluir esse trabalho, mas também para buscar e superar tantos outros desafios.

A todos os companheiros músicos com os quais tive o prazer e o privilégio de compartilhar dessa paixão que é fazer música. Obrigado aos grandes amigos, atuais e antigos companheiros de banda, pela paciência e compreensão nos momentos em que não pude estar presente e por dividirem cada momento de êxtase que a música nos proporciona.

Obrigado Eliane e Helinho, por me estenderem a mão com tanto carinho e boa vontade. Serei eternamente grato à família que me acolheu como a um filho no momento em que precisei. Vocês fazem parte das minhas conquistas e serão sempre sinônimo de bondade e alegria para mim.

Enfim, agradeço a todos que fizeram e que fazem a diferença em meu desenvolvimento pessoal e profissional.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	1
LISTA DE TABELAS.....	2
LISTA DE FIGURAS.....	3
RESUMO	5
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUÇÃO	8
1.1 O sistema imune inato e a sinalização celular via receptores do tipo Toll (TLRs).....	8
1.2 A família NF- κ B de fatores de transcrição.....	16
1.3 Ras-GTPases	19
1.4 Os fatores de troca de nucleotídeos guanina das proteínas Ras (RasGEFs) e o membro RasGEF1b.....	21
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4. METODOLOGIA.....	27
4.1 Animais.....	27
4.2 Cultura de células imortalizadas	27
4.3 Obtenção de sobrenadante rico em M-CSF	28
4.4 Obtenção e cultivo de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs)	29
4.5 Detecção de contaminação por <i>Mycoplasma ssp</i>	29
4.6 Tratamentos e extração do RNA total.....	30
4.7 Obtenção da primeira fita de cDNA	31
4.8 PCR em tempo real (RT-qPCR).....	31
4.9 <i>Nested</i> RT-PCR.....	32
4.10 Oligonucleotídeos e condições termocíclicas	33
4.11 Análises <i>in silico</i>	35
4.12 Amplificação e clonagem do promotor putativo de <i>Rasgef1b</i>	35
4.13 Geração de mutantes por deleção e síntese de DNA	37
4.14 Transformação bacteriana	37
4.15 Obtenção de DNA plasmidiano em pequena e média escala (midiprep)	38
4.16 Digestão com enzimas de restrição	38

4.17 Sequenciamento nucleotídico dos fragmentos	39
4.18 Transfecção e ensaio de gene repórter.....	39
4.19 Obtenção do extrato celular e ensaio de gene repórter.....	40
4.20 Plasmídeos	41
5. RESULTADOS	44
5.1 Análise dos níveis do mRNA de RasGEF1a, RasGEF1b e RasGEF1c em macrófagos murinos derivados de medula óssea (BMDMs)	44
5.2 Identificação de elementos regulatórios presentes na sequência do promotor putativo de <i>Rasgef1b</i> através de análises <i>in silico</i>	46
5.2 Determinação da provável localização do sítio de início da transcrição de <i>Rasgef1b</i>	52
5.4 Amplificação, clonagem e geração de mutantes por deleção da região promotora putativa de <i>Rasgef1b</i>	55
5.5 Análise da atividade da região promotora putativa de <i>Rasgef1b</i>	61
DISCUSSÃO	69
CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS.....	77
ENDEREÇOS ELETRÔNICOS.....	84

ABREVIATURAS

AP-1 – Proteína ativadora 1 (do inglês, *activator protein 1*)

BMDMs – Macrófagos derivados de medula óssea (do inglês *bone marrow derived macrophages*)

C/EBP – Proteínas de ligação ao *enhancer* CCAAT (do inglês *CCAAT/enhancer binding protein*)

cDNA – DNA complementar (do inglês, *complementary DNA*)

GAPs - Proteínas ativadoras de GTPases (do inglês *GTPase-activating proteins*)

GEFs – Fatores de troca de nucleotídeos guanina (do inglês *guanine exchange factors*)

GTP – Guanosina trifosfato (do inglês, *guanosine triphosphate*)

I κ B – Inibidor de kappa B (do inglês, *inhibitor of κ B*)

LPS – Lipopolissacarídeo (do inglês, *lipopolysaccharide*)

MyD88 – Proteína de resposta primária de diferenciação mieloide (do inglês *myeloid differentiation factor 88*)

NF- κ B – Fator nuclear KappaB (do inglês *nuclear factor kappaB*)

PBS – Salina tamponada em fosfato (do inglês *phosphate-buffered saline*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*)

PRRs – Receptores de reconhecimento padrão (PPR, do inglês *pattern recognition receptors*)

Ras – Sarcoma de rato (do inglês, *rat sarcoma*)

RasGEF - Fatores de troca de nucleotídeos guanina das proteínas Ras (do inglês *ras associated GEFs*)

Sp1 – Proteína de especificidade 1 (do inglês, *specificity protein 1*)

TAK – Cinase ativada por TGF- β (do inglês *TGF- β activated kinase*)

TIR – domínio receptor Toll/IL-1 (TIR – do inglês *intracelular Toll- Interleukin1 (IL-1) receptor*)

TIRAP - Proteína adaptadora contendo o domínio TIR (TIRAP – do inglês *TIR domain containing adaptor protein*)

TLRs – Receptores do tipo *Toll* (do inglês *toll-like receptors*)

TRIF – Proteína adaptadora contendo o domínio TIR indutora de interferon- β (do inglês *TIR domain containing adaptor protein inducing interferon*)

TSS – Sítio de início da transcrição (do inglês *transcription start site*)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Localização celular de TLRs e seus principais ligantes	11
Tabela 2: Listagem dos genes alvos, dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sua sequência, e das condições termocíclicas utilizadas em cada reação.	34
Tabela 3: Listagem dos oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento da região promotora putativa de <i>Rasgef1b</i> clonada no vetor pGL3-Basic.....	39
Tabela 4: Listagem e descrição dos plasmídeos utilizados para transfecção.	42
Tabela 5: Principais elementos regulatórios associados à resposta imune identificados na sequência da região promotora putativa de <i>Rasgef1b</i>	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática dos receptores IL-1R e TLRs.....	10
Figura 2: Representação esquemática das vias de sinalizações de TLR4.	15
Figura 3: Representação esquemática da estrutura dos membros das famílias NF- κ B/Rel e I κ B..	18
Figura 4: Representação esquemática da regulação da atividade de Ras-GTPases.	20
Figura 5: Representação esquemática da estrutura de diferentes RasGEFs.....	22
Figura 6: Análise dos níveis do mRNA de RasGEF1a, RasGEF1b e RasGEF1c por RT-qPCR.....	45
Figura 7: Representação esquemática da região circunvizinha ao TSS de <i>Rasgef1b</i> murino e humano.	48
Figura 8: Esquema gráfico do alinhamento entre as sequências de <i>Rasgef1b</i> de espécies diferentes.	51
Figura 9: Representação esquemática da região promotora de <i>Rasgef1b</i> de acordo com diferentes anotações.....	52
Figura 10: Determinação da provável localização do TSS de <i>Rasgef1b</i> através de nested RT-PCR.	54
Figura 11: Amplificação do segmento de 3 kb da região promotora putativa de <i>Rasgef1b</i>	55
Figura 12: Análise da clonagem e representação esquemática do plasmídeo pGL3-2.8 kb. A).....	57
Figura 13: Análise da geração das construções pGL3-2.8 kb, pGL3-1.7 kb, pGL3-0.8 kb e pGL3- Δ 492.	59

Figura 14: Representação esquemática das construções contendo parte da região promotora de <i>Rasgef1b</i>	60
Figura 15: Ensaio de gene repórter - atividade constitutiva (vetor) e induzida por Mal/TIRAP dos repórteres da região promotora putativa de <i>Rasgef1b</i>	62
Figura 16: Análise da atividade do segmento de 0.302 kb em macrófagos Raw264.7 tratados ou não com LPS.	64
Figura 17: Ensaio de gene repórter - atividade constitutiva e induzida por p65 ou c-Rel, dos repórteres da região promotora putativa de <i>Rasgef1b</i>	66
Figura 18: Análise comparativa do efeito da superexpressão de diferentes moléculas sob a atividade dos segmentos de 0.302 kb e 2.8 kb.....	67
Figura 19: Análise dos níveis do mRNA de RasGEF1b em BMDMs WT e p65 ^{-/-} tratados ou não com LPS.....	68
Figura 20: Representação esquemática de elementos de ligação a GTFs comumente encontrados no promotor mínimo de genes eucarióticos.	71

RESUMO

O fator de troca de nucleotídeos guanina, RasGEF1b, é codificado por um gene de expressão induzida em células do sistema imune inato em resposta à ativação de receptores do tipo Toll (TLRs). Um aumento em sua transcrição ocorre em macrófagos humanos e murinos estimulados com diferentes agonistas de TLRs, assim como em camundongos infectados com protozoários parasitas. Para melhor compreender seu papel durante esse processo, é importante que se investigue cada aspecto da regulação e funcionamento desse GEF. Atualmente, no entanto, os mecanismos moleculares responsáveis por sua regulação transcricional são ainda desconhecidos. Portanto, nesse trabalho caracterizamos uma região regulatória localizada a montante da sequência codificadora do gene *Rasgef1b* murino. Nossas análises *in silico* indicam que a região investigada abriga sítios de ligação para fatores de transcrição críticos na resposta imune como AP-1, C/EBP, Sp1, STAT1 e NF- κ B. Para investigar funcionalmente essa região, utilizamos DNA genômico obtido de camundongo C57BL/6 para amplificar e clonar no plasmídeo repórter da luciferase pGL3-basic um segmento de 2.886 pb, gerando a construção pGL3-2.8 kb. Esse segmento compreende 119 nucleotídeos a jusante e 2.747 nucleotídeos a montante do sítio de início da transcrição (TSS) putativo de *Rasgef1b* (-2.747/+119). A construção pGL3-2.8 kb, assim como mutantes gerados por deleção, foram transfectados em células humanas HEK293 e em macrófagos murinos Raw264.7 para avaliação, por ensaios de gene repórter, de sua atividade constitutiva e induzida após ativação das vias disparadas por TLRs e fatores de transcrição da família NF- κ B. Nossos resultados indicam que os segmentos analisados, exceto aquele com deleção da região que abriga o TSS putativo (pGL3- Δ 492), apresentam atividade constitutiva elevada quando comparada ao vetor pGL3-basic. Ademais, a ativação das vias de TLRs resultou em um aumento significativo dessa atividade tanto em células HEK293 quanto em macrófagos Raw264.7. Além disso, em estudos de superexpressão conduzidos em células HEK293, as subunidades de NF- κ B, p65(RelA) ou c-Rel foram suficientes para induzir um aumento significativo da atividade dos segmentos analisados. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a região analisada corresponde à região promotora de *Rasgef1b* e ainda que os fatores da família de transcrição NF- κ B parecem exercer um papel na indução da expressão desse gene. Adicionalmente, fornecemos evidências experimentais confirmando a presença do TSS putativo no gene *Rasgef1b* através de *nested* RT-PCR, e, por PCR em tempo real, demonstramos que os níveis do mRNA de RasGEF1b em

macrófagos murinos derivados de medula óssea (BMDMs) são dominantes em relação aos outros membros RasGEF1a e RasGEF1c.

ABSTRACT

The guanine nucleotide exchange factor RasGEF1b is encoded by a gene whose expression is induced in innate immune cells in response to the activation of Toll-like receptors (TLRs). RasGEF1b mRNA levels are increased in human and murine macrophages upon stimulation with different TLRs agonists as well as in mice infected with protozoan parasites. However, the molecular mechanisms responsible for its transcriptional regulation are still unknown. Here we have characterized a regulatory region located upstream to the coding sequence of the murine *Rasgef1b* gene. Our *in silico* analysis indicates that the investigated region harbors putative binding sites for transcription factors that are critical in the immune response, such as AP-1, C/EBP, Sp1, STAT1 and NF- κ B. To functionally investigate this region, we used genomic DNA obtained from a C57BL/6 mouse to amplify and clone, within luciferase reporter plasmid pGL3-basic, a DNA segment of 2.886 bp, generating the construction pGL3-2.8 kb. This segment comprises 119 nucleotides upstream and 2.747 nucleotides downstream *Rasgef1b* putative transcription start site (TSS) (-2.747 /+119). The pGL3-2.8 kb construction and the mutants generated by deletion were transfected into human HEK293 cells and murine RAW264.7 macrophages to evaluate, by gene reporter assays, their constitutive and induced activity upon the activation of TLRs pathways and NF- κ B transcription factors. Our results indicate that the analyzed segments, except the one with the deletion of the region that harbors the putative TSS (pGL3- Δ 492), present an increased activity compared to pGL3-basic vector. Furthermore, activation of TLR pathways resulted in a significant increase in their activity both in HEK293 cells and Raw264.7 macrophages. Moreover, in overexpression studies carried out in HEK293 cells, the NF- κ B subunits p65 (RelA) or c-Rel were sufficient to induce a significant increase in the activity of the analyzed segments. Taken together, our results suggest that the analyzed region corresponds to the *Rasgef1b* promoter and that NF- κ B family of transcription factors appear to play a role in the induced expression of this gene. Additionally, we provide experimental evidence confirming the presence of the putative TSS in the *Rasgef1b* gene by nested RT-PCR, and, by real time PCR, we demonstrated that mRNA levels of RasGEF1b in murine bone marrow derived macrophages (BMDMs) are dominant when compared to RasGEF1a and RasGEF1c.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O sistema imune inato e a sinalização celular via receptores do tipo Toll (TLRs)

O sistema imune inato desempenha um papel essencial na homeostase e na proteção do organismo contra patógenos. É um sistema ancestral de reconhecimento microbiano, evolutivamente conservado na maioria dos organismos multicelulares, encontrado em animais invertebrados e vertebrados, assim como em plantas (Albiger et al., 2007; Dempsey et al., 2003). É a primeira linha de defesa contra a infecção por parasitas, essencial para a proteção do organismo contra patógenos (Kawai and Akira, 2006).

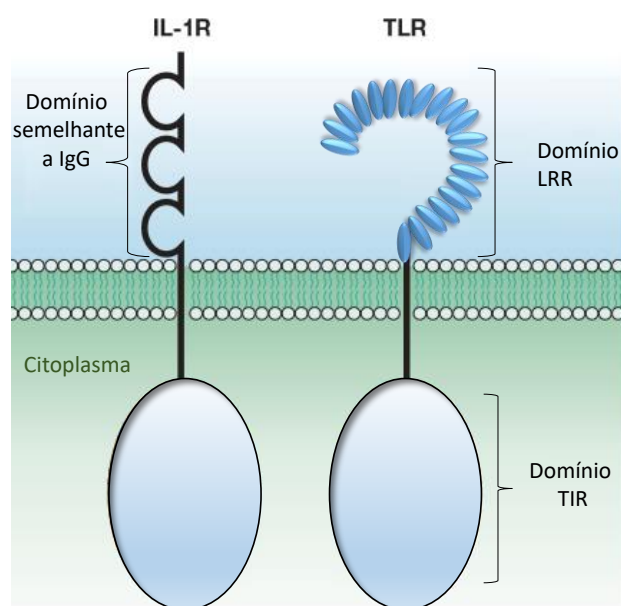
Até recentemente, a imunidade inata era considerada uma resposta imune inespecífica mediada por células fagocíticas, tais como macrófagos e neutrófilos, que englobam e lisam patógenos microbianos (Akira et al., 2006). No entanto, estudos sobre o reconhecimento imunológico inato mostraram que esse sistema depende de um conjunto diversificado de receptores, os receptores de reconhecimento padrão (PPR, do inglês *Pattern recognition receptors*). Os PRRs reconhecem classes de estruturas moleculares comuns a vários grupos de microorganismos, em conjunto conhecidas como PAMPs (do inglês *pathogen-associated molecular patterns*), assim como estruturas moleculares endógenas derivadas de células danificadas, conhecidas como DAMPs (do inglês, *damage associated molecular patterns*) (Janeway and Medzhitov, 2002). Os PRRs são expressos em células do sistema imune inato, tais como células dendríticas, macrófagos e neutrófilos. O reconhecimento dos ligantes por esses receptores dispara uma rápida ativação de vias de sinalização intracelular que vai culminar na indução da resposta imune através da síntese e produção de citocinas, quimiocinas, proteínas reguladoras de ação intracelular e outros mediadores inflamatórios. Esse processo desencadeia não só a ativação de respostas imediatas do hospedeiro, como a inflamação, mas também auxilia na montagem e orquestração da resposta imune adaptativa (Kawasaki and Kawai, 2014). Entre as classes caracterizadas de PRRs estão os receptores do tipo Toll (TLRs - do inglês *Toll like receptors*), receptores do tipo RIG-I (RLRs - do inglês *RIG-I-like receptors*), receptores do tipo NOD (NLRs - do inglês *NOD-like receptors*), receptores do tipo AIM2 (ALRs - do inglês *AIM2-like receptors*), receptores do tipo lectina C (CLRs - do inglês *C-type lectin receptors*) e sensores citosólicos de DNA

(Kawasaki and Kawai, 2014). A combinação específica do receptor envolvido pode transmitir informações básicas sobre o tipo de patógeno invasor (Kanzler et al., 2007).

A proteína Toll foi identificada inicialmente em um estudo da embriogênese em drosófilas, onde se mostrava essencial na regulação da polaridade dorsoventral do embrião (Anderson et al., 1985). Posteriormente, (Lemaitre et al., 1996) forneceram a primeira evidência de que a proteína Toll estaria envolvida no processo da resposta imune, pois demonstraram que mutantes de drosófilas que apresentavam a perda da função em Toll eram altamente susceptíveis à infecção por fungo e apresentavam a indução defeituosa de um peptídeo antifúngico. Esses resultados forneceram as primeiras evidências de que essa proteína deveria ser responsável pela detecção e mediação de respostas à infecção causada por fungo em drosófila. Em seguida, Medzhitov e colaboradores identificaram um homólogo humano para a proteína Toll de drosófila - o que cunhou o termo “receptor do tipo Toll” (TLRs). Eles mostraram que um mutante constitutivo ativo do homólogo humano de Toll era capaz de induzir a ativação de NF- κ B (do inglês, *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) e consequentemente a expressão de genes regulados por esse fator de transcrição, como citocinas inflamatórias e moléculas co-estimulatórias, quando transfectado em células humanas (Medzhitov et al., 1997). A partir daí o campo da imunobiologia dos TLRs se expandiu rapidamente, e atualmente essa é uma das classes mais estudadas entre os PRRs.

É notório hoje que os TLRs são cruciais para a indução do sistema imune no combate a microorganismos patogênicos. Esses receptores estão presentes em células residentes e imunes das superfícies corporais de interface hospedeiro-patógeno, como na pele e em mucosas dos tratos respiratório, gastrointestinal e urogenital (Anwar et al., 2013; Mifsud et al., 2014). Atualmente, são descritos 10 membros da família dos TLRs em humanos (TLR1-TLR10) e 12 em camundongos (TLR1-TLR9, TLR11-TLR13) (Kawai and Akira, 2010). Os TLRs são glicoproteínas transmembrana do tipo I caracterizados por um domínio extracelular (ou luminal para os TLRs presentes em endossomos) contendo repetições ricas em leucina (LRR, do inglês *Leucine rich repeats*), responsável pelo reconhecimento de diversos PAMPs provenientes de bactérias, protozoários, fungos e vírus, assim como de alguns DAMPs, e um domínio intracelular ou citoplasmático homólogo ao receptor de interleucina-1 (IL-1R, do inglês *Interleukin-1 receptor*) nomeado domínio receptor Toll/IL-1 (TIR – do inglês *Intracellular Toll-Interleukin1 (IL-1) receptor*), responsável pela ativação de vias de sinalização intracelular (Albiger et al., 2007). A homologia entre TLRs e o receptor IL-1 (IL1R) está restrita aos

seus domínios citoplasmáticos, enquanto que seus domínios extracelulares são notavelmente diferentes. Os receptores de IL-1 possuem um domínio extracelular semelhante à imunoglobulina, enquanto que os TLRs possuem repetições ricas em leucinas que formam uma estrutura em “forma de ferradura” (**Figura 1**). Apesar de apresentarem uma conservação entre os domínios ricos em leucina, o domínio extracelular dos TLRs pode reconhecer uma variedade de ligantes não relacionados estruturalmente devido à sua composição variada de aminoácidos (Akira et al., 2006; Albiger et al., 2007; Kawai and Akira, 2010; Takagi, 2011).



Baseado em Akira & Takeda (2004) e Albiger et al (2007)

Figura 1: Representação esquemática dos receptores IL-1R e TLRs. Os receptores de interleucina 1 (IL-1R) e os receptores do tipo Toll (TLRs) apresentam um domínio intracelular ou citoplasmático semelhante denominado TIR. No entanto, o domínio extracelular desses dois receptores é diferente. Os receptores de IL-1R possuem três domínios semelhantes à imunoglobulina e os TLRs possuem repetições ricas em leucina (LRR) em uma estrutura característica que se assemelha a forma de uma ferradura.

Diferentes subgrupos celulares podem expressar diferentes TLRs, o que faz com que as células sejam capazes de desenvolver padrões específicos de resposta imune a diferentes patógenos. Por exemplo, células dendríticas plasmacitóides expressam predominantemente TLR7 e TLR9. Células dendríticas mielóides, por sua vez, expressam os demais TLRs, permitindo que essas células sejam ativadas por diferentes tipos de agonistas (Akira et al., 2001). Os TLRs são expressos tanto na superfície celular quanto

associados a vesículas intracelulares (Kawai and Akira, 2010). Segundo Kawasaki (2014), TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10 estão localizados na superfície celular e reconhecem uma ampla gama de componentes de membrana derivados de agentes microbianos como lipídeos, lipoproteínas e proteínas, enquanto que TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 e TLR13 estão localizados em endossomos e reconhecem principalmente moléculas de ácidos nucléicos (Kawasaki and Kawai, 2014; Raetz et al., 2015). Ademais, alguns TLRs como TLR2 e TLR4, podem ser removidos da superfície celular após o reconhecimento de moléculas ligantes e recrutados para o fagossomo (Anwar et al., 2013). A **Tabela 1** sumariza alguns dos mais importantes ligantes de cada TLR e sua localização celular.

Tabela 1: Localização celular de TLRs e seus principais ligantes

Receptor do tipo Toll	Localização celular	Ligantes
TLR1/2, TLR2/6	Superfície Celular	<ul style="list-style-type: none"> - Lipoproteínas - Ácido Lipoteóico (LTA) - Peptídioglicano derivado de bactérias Gram-positivas - Lipoarabidomanana - Glicosilfosfatidilinositol mucina - Zymozan - Mannan
TLR3	Endossomo	<ul style="list-style-type: none"> - dsRNA viral - siRNA - RNA <i>self</i> derivado de células danificadas
TLR4	Superfície Celular	<ul style="list-style-type: none"> - Lipopolissacarídeo (LPS) - Proteínas estruturais de vírus - Manose
TLR5	Superfície Celular	<ul style="list-style-type: none"> - Flagelina
TLR7	Endolisossomo	<ul style="list-style-type: none"> - ssRNA viral - RNA de streptococcus B
TLR8	Endolisossomo	<ul style="list-style-type: none"> - RNA viral e bacteriano

TLR9	Endolisossomo	- CpG DNA viral e bacteriano - Hemozoína
TLR10/12	Superfície Celular	- Listeria
TLR11	Endolisossomo	- Componentes protéicos de de bactérias uropatogênicas - Moléculas do tipo profilina de <i>Toxoplasma gondii</i>
TLR12	Endolisossomo	- Moléculas do tipo profilina de <i>Toxoplasma gondii</i>
TLR13	Endossomo	- rRNA bacteriano 23S - Componentes virais de vírus da estomatite vesicular

Baseado em (Kumar et al., 2011) e (Kawasaki and Kawai, 2014).

A sinalização celular disparada pela ativação dos TLRs se inicia quando um ligante se liga à porção extracelular (ou luminal) do receptor. Esse receptor se dimeriza e recruta moléculas adaptadoras através de seu domínio citossólico, TIR. Esse processo vai disparar vias de sinalização intracelular que culminarão na ativação de fatores de transcrição centrais na resposta imune, como NF- κ B, AP-1 (do inglês, *activator protein 1*) e IRFs (do inglês *Interferon regulatory factor*). Uma vez ativados, esses fatores são translocados para o núcleo onde se ligam à região promotora e regulam a transcrição de genes inflamatórios que codificam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, interferons do tipo I, entre outras várias moléculas, incluindo proteínas reguladoras intracelulares (Kahana and Cleveland, 1999; Kumar et al., 2011; Takagi, 2011).

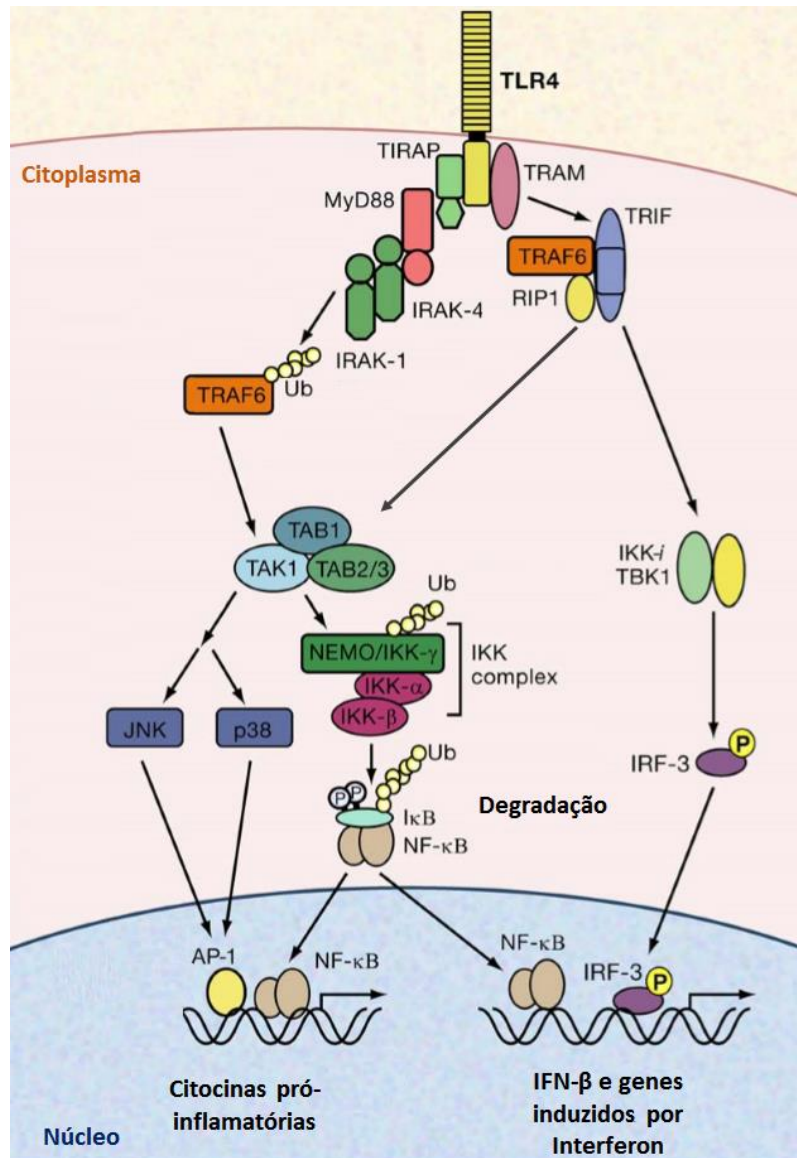
Como mencionado, após o reconhecimento dos PAMPs ou DAMPs, a sinalização disparada por TLRs é primariamente mediada via recrutamento de moléculas adaptadoras pelo domínio TIR. Dependendo do receptor ativado, diferentes moléculas adaptadoras serão recrutadas, e devido à complexidade dessa via, a sinalização dos TLRs é categorizada em vias MyD88-dependente e TRIF-dependente (Wang et al., 2010)

(Figura 2). A via MyD88-dependente é utilizada por todos os TLRs, exceto por TLR3. A via TRIF-dependente se dá apenas por TLR3 e TLR4, sendo que TLR4 recruta TRIF através da molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM - do inglês *TRIF-related adaptor molecule*) (Kanzler et al., 2007; Kumar et al., 2011).

Na via MyD88-dependente, a primeira proteína adaptadora a ser recrutada é a proteína de resposta primária de diferenciação mielóide 88 (MyD88, do inglês *Myeloid differentiation primary response protein 88*), a qual contém um domínio TIR que se liga ao domínio TIR do TLR. Após sua ligação, MyD88 recruta as cinases IRAK4 (do inglês *IL-1R-associated kinase 4*) e IRAK1 (do inglês *IL-1R-associated kinase 1*). Com a formação desse complexo, IRAK4 fosforila inicialmente IRAK1, o que induz à sua atividade cinase e intensa autofosforilação em múltiplos resíduos de serina e treonina, resultando em sua dissociação de MyD88. Em seguida, IRAK-1 fosforila as proteínas Pellino (PELI-1, -2 e -3), um evento crítico para promover a poliubiquitinação de IRAK-1 mediada pelas proteínas Pellino. Uma vez poliubiquitinada, IRAK-1 liga-se a várias outras proteínas, incluindo o fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6, do inglês *TNF receptor-associated factor 6*). Em seguida, a atividade ubiquitina ligase de TRAF6 é ativada, resultando na ativação da cinase TAK1 (do inglês, *transforming growth factor-beta activated protein Kinase 1*) que faz parte de um complexo formado pelas proteínas ligadas à TAK1, TAB1, TAB2, TAB3 (do inglês, *TAK1-binding protein*). Esse complexo então fosforila IKK β , componente do complexo IKK (do inglês, *I κ B kinase*) formado também por IKK α e NEMO (IKK γ). O complexo IKK promove então a fosforilação do inibidor citosólico de NF- κ B, o I κ B (do inglês, *inhibitor of κ B*) que será então marcado por ubiquitinação e degradado pelo proteassomo, liberando por fim o fator de transcrição NF- κ B, que será translocado para o núcleo para promover a transcrição de citocinas pró-inflamatórias e outros genes essenciais na resposta imune. Paralelamente à ativação de NF- κ B, o complexo TAK1 ativa ainda membros da família das MAP cinase (MAPK, do inglês *Mitogen-activated protein kinases*) como ERK1/2 (do inglês, *extracellular-signal-regulated kinases*) p38 e JNK (do inglês, *c-Jun N-terminal kinases*) que medeiam a ativação e translocação do fator de transcrição AP-1 para o núcleo (Kawasaki and Kawai, 2014; Lu et al., 2008; O'Neill and Bowie, 2007). Nos casos de TLR2 e TLR4, a sinalização ainda requer outro adaptador, a proteína adaptadora contendo o domínio TIR (TIRAP – do inglês *TIR domain containing adaptor protein*) que é importante para o recrutamento de MyD88 ao domínio TIR do receptor **(Figura 2)**

A ativação dos receptores TLR3 ou TLR4 ativa a via TRIF-dependente. A proteína adaptadora contendo um domínio TIR e indutora do IFN- β (TRIF – do inglês *TIR domain containing adaptor protein inducing interferon IFN- β*) interage tanto com TRAF6 quanto TRAF3. TRAF6 recruta a cinase RIP-1 (do inglês, *Receptor-interacting protein 1*) que vai levar a ativação do complexo TAK1 promovendo a ativação de NF- κ B e MAPKs, como já descrito (Kawasaki and Kawai, 2014). Já a interação de TRIF com TRAF3, culmina no recrutamento de TBK1 (do inglês, *TANK binding kinase 1*) e IKK-epsilon que juntas promoverão a fosforilação, e subsequentemente a dimerização e translocação nuclear de IRF3, que vai regular a transcrição de IFN- β e de genes responsivos a interferon (Hayden and Ghosh, 2012; Kawasaki and Kawai, 2014; Kumar et al., 2011) (**Figura 2**).

Todo esse processo é essencial para a indução da resposta imune inata do hospedeiro, assim como pode auxiliar na montagem e orquestração da resposta imune adaptativa (Kawasaki and Kawai, 2014). Nesse sentido, os receptores do tipo Toll desempenham um papel essencial na manutenção da homeostase do organismo, e, portanto, é fundamental o estudo das respostas celulares mediadas por esses receptores.



Modificado de Akira et al. (2006)

Figura 2: Representação esquemática das vias de sinalizações de TLR4. O TLR4 esquematiza, de um modo geral, a sinalização dos TLRs, uma vez que ativa tanto a via MyD88-dependente quanto TRIF-dependente e utiliza todos os quatro adaptadores (TIRAP/MyD88 e TRAM/TRIF). A ativação da via MyD88-dependente leva ao recrutamento de TIRAP e MyD88, que vai recrutar IRAK-4 e IRAK-1. IRAK-1 sofre fosforilação e recruta TRAF6, o que, por sua vez, vai ativar o complexo TAK1, TAB1, TAB2/3. Esse complexo então fosforila a IKKβ promovendo a ativação do complexo IKK. O complexo IKK ativo irá fosforilar o IκB, que é então ubiquitinado e degradado, liberando NF-κB que se transloca para o núcleo. Simultaneamente o complexo TAK1 ativa membros da família das MAP cinases, ERK1/2, p38 e JNK que vão mediar a ativação e translocação do fator de transcrição AP-1 para o núcleo. Na via TRIF-dependente, TRIF interage com TRAF6 que recruta a cinase RIP-1 levando à ativação do complexo TAK1, o que promove a ativação NF-κB e MAPKs. A interação de TRIF com TRAF3, culmina no recrutamento de TBK1 e IKK-epsilon que juntas promoverão a fosforilação, e subsequentemente a dimerização e translocação nuclear de IRF3, que vai regular a transcrição de IFN-β e de genes responsivos a interferon.

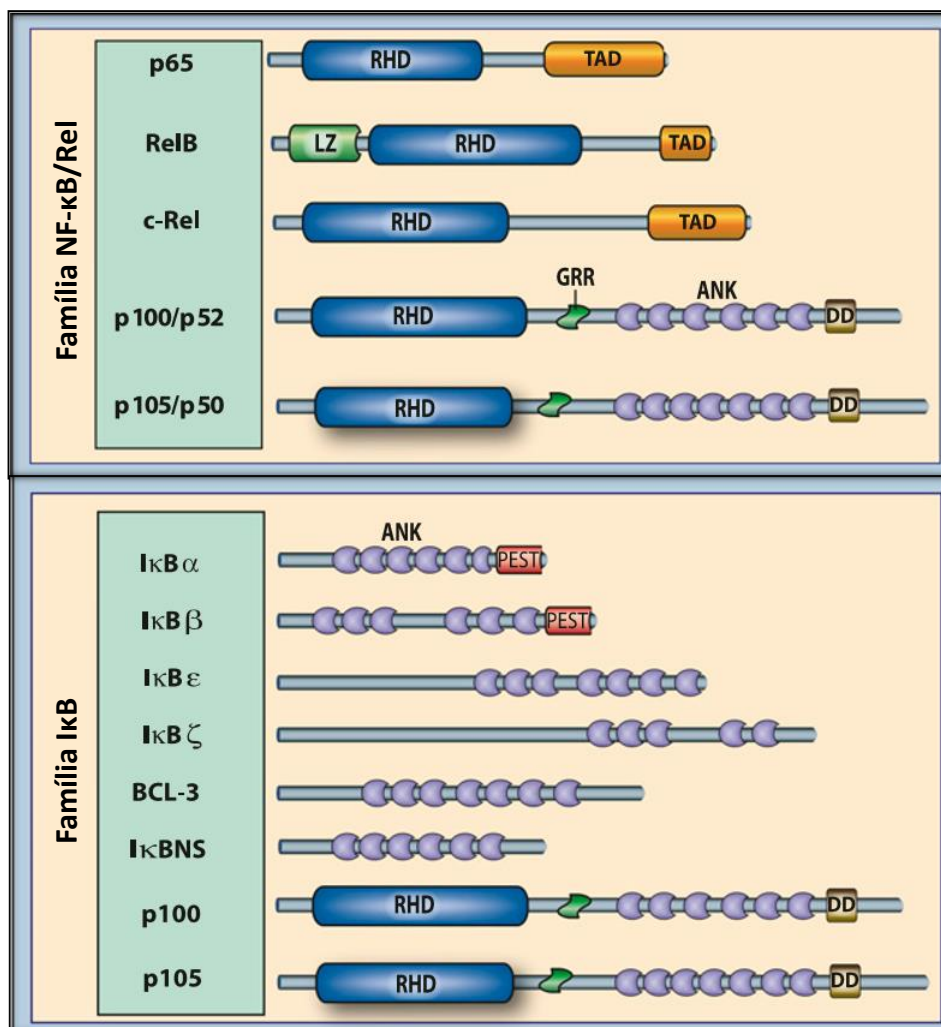
1.2 A família NF- κ B de fatores de transcrição

O fator de transcrição nuclear NF- κ B foi descrito em 1986 por Rajan Sen e David Baltimore como um fator de transcrição nuclear que se ligava a uma região reguladora do gene da cadeia leve kappa (sítio κ B) em células B (Sen and Baltimore, 1986). Desde sua descrição, o NF- κ B se tornou um dos mais estudados fatores de transcrição devido ao seu papel crítico e complexo na sinalização intracelular (Ghosh and Karin, 2002), na regulação na imunidade inata e adaptativa (Vallabhapurapu and Karin, 2009), e na hematopoiese (Grossmann et al., 1999). Como mencionado, seu papel na imunidade inata e adaptativa inclui a regulação de genes que codificam para citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão celular, substâncias antimicrobianas, proteínas importantes na diferenciação celular, entre outros processos (Baker et al., 2011; Doyle and O'Neill, 2006; Hayden and Ghosh, 2012).

A família Rel/NF- κ B é composta por cinco membros, sendo eles, RelA (p65), RelB, c-Rel, as proteínas precursoras NF- κ B1 (p105) e NF κ B2 (p100), que são processadas em p50 e p52, respectivamente (Gerondakis et al., 1999). Os membros se combinam de forma homo ou heterodimérica, e então podem se ligar a um conjunto de elementos específicos de DNA conhecidos como sítios κ B, presentes em *enhancers* e/ou promotores de uma série de genes alvos, regulando sua transcrição (Wang et al., 2012). Muitos desses genes regulados por NF- κ B estão envolvidos na resposta imune inata e adaptativa (Vallabhapurapu and Karin, 2009). A habilidade de ligação ao DNA deve-se ao domínio N-terminal altamente conservado de aproximadamente 300 aminoácidos chamado de domínio de homologia a Rel (RHD, do inglês *Rel-homology domain*) (Gerondakis et al., 1999; Wang et al., 2012). Esse domínio, compartilhado entre todas as subunidades, é o responsável pela dimerização, ligação ao DNA e interação com a proteína inibitória de NF- κ B (I κ B, do inglês *inhibitor of kappa B*) (Hoffmann et al., 2003). No entanto, apenas as subunidades p65, c-Rel e RelB possuem os domínios C-terminais de transativação (TADs, do inglês *transactivation domains*), que conferem a habilidade de induzir a transcrição (**Figura 3**). Embora as subunidades p50 e p52 não possuam os domínios TAD, elas podem regular a transcrição quando se combinam na forma de dímeros com outras subunidades de NF- κ B ou com proteínas não relacionadas que possuam a capacidade de transativação. Alternativamente, homodímeros de p50 e p52 regulam negativamente a transcrição ao competir pelos sítios κ B do DNA com os dímeros que contêm TADs (Hayden and Ghosh, 2012). Portanto, o NF- κ B pode tanto induzir

quanto reprimir a transcrição, e a composição do dímero confere, em partes, as propriedades do potencial de transativação e da especificidade de ligação ao DNA. Entre os possíveis heterodímeros, o mais freqüente é formado pelos monômeros p65 (RelA) e p50, que possui a capacidade de regulação transcricional de uma ampla gama de genes (Hayden and Ghosh, 2004).

Como mencionado, em células não estimuladas, os dímeros de NF- κ B são encontrados associados a proteínas inibitórias da família I κ B, sendo I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ as principais a desempenhar esse papel (Hayden and Ghosh, 2004). As proteínas I κ B interagem com o domínio RHD de NF- κ B mascarando parcialmente a sua sequência de localização nuclear e impedindo o seu transporte ao núcleo e consequente ligação ao DNA (Bonizzi and Karin, 2004). Além dos I κ Bs clássicos, há um grupo de proteínas atípicas que também fazem parte da família dos inibidores de NF- κ B. São elas, BCL3 (do inglês *B cell CLL/lymphoma 3*), I κ B ζ , I κ BNS e ainda os monômeros não-processados de NF- κ B, p105 e p100 (Hayden and Ghosh, 2012; Vallabhapurapu and Karin, 2009) (**Figura 3**). Os I κ Bs são caracterizados pela presença de cinco a sete motivos de anquirina que medeiam a ligação ao domínio de dimerização de NF- κ B (Hatada et al., 1992). As proteínas I κ B interagem com RHD de NF- κ B mascarando a sua sequência de localização nuclear, inibindo, portanto, o seu transporte ao núcleo e a ligação de NF- κ B ao DNA (Bonizzi and Karin, 2004). Em particular, estruturas cristalográficas de I κ B α e I κ B β ligado aos dímeros p65/p50, revelaram que o I κ B mascara somente a sequência de localização nuclear de p65, enquanto p50 permanece acessível (Huxford et al., 1998; Jacobs and Harrison, 1998; Malek et al., 2003).



Modificado de Hayden & Gosh (2012)

Figura 3: Representação esquemática da estrutura dos membros das famílias NF-κB/Rel e IκB.

A família dos fatores de transcrição NF-κB/Rel consiste em cinco membros: p65 (RelA), RelB, c-Rel (Rel), e nas proteínas precursoras p100 (NF-κB2) and p105 (NF-κB1), que dão origem a p52 e p50, respectivamente. Todos os membros possuem o domínio RHD, o que caracteriza a família. A família IκB consiste de oito membros, IκBα, IκBβ, IκBε, IκBζ, BCL3, IκBNS, p100 e p105. Essa família é caracterizada pela presença de múltiplos domínios de repetições de anquirina. Os domínios que caracterizam cada família, assim como domínios específicos de alguns membros estão indicados. (ANK) Domínios de Anquirina; (DD) Domínio de morte (death domain); (RHD) Domínio de homologia a Rel; (TAD) Domínio de transativação; (LZ) Domínio de zíper de leucina; (GRR) Região rica em glicina.

Para que o NF- κ B possa regular a transcrição gênica é necessário que haja a degradação do I κ B. A ativação de NF- κ B pode se dar através de diversos estímulos que vão levar a ativação de vias de sinalização distintas. Essas vias podem ser classificadas em canônica e não-canônica. A via canônica, ou clássica, pode se iniciar por meio de estímulos reconhecidos por diferentes receptores, como os receptores de TNF (TNFR, TNF receptors), de IL-1 (IL-1R, IL-1 receptor), receptores de antígenos, ou PRRs, como os já mencionados TLRs. Nessa via, o complexo IKK é necessário e suficiente para a fosforilação de I κ B (Hayden and Ghosh, 2004). Esse processo vai levar à degradação do I κ B possibilitando a translocação dos dímeros de NF- κ B normalmente formados pelas subunidades RelA, c-Rel e p50 (Rothwarf and Karin, 1999). A via não-canônica, ou alternativa, é induzida por membros específicos da família de TNF, como CD40L, LT $\alpha\beta$, RANKL, BAFF, e tem um mecanismo de regulação diferente. Em contraste com a via clássica, a via alternativa é independente de NEMO (IKK γ) e medeia a ativação persistente de dímeros de NF- κ B formados por RelB/p52 (Hayden and Ghosh, 2012). Tal via está envolvida com a formação dos órgãos linfóides e com o desenvolvimento e sobrevivência das células B (Karin and Ben-Neriah, 2000; Sun, 2011).

1.3 Ras-GTPases

A superfamília Ras de pequenas proteínas ligadas ao nucleotídeo guanina (do inglês, *small guanine nucleotide-binding G proteins*), compreende mais de 150 membros identificados em humanos, e com base nas funções e similaridade de sequência, são divididas em cinco subfamílias principais: Ras, Rho, Rab, Arf e Ran. São proteínas monoméricas, GTPases de baixo peso molecular (20 a 25 kDa), evolutivamente conservadas, que regulam diversos processos celulares (Bos et al., 2007; Vigil et al., 2010). As proteínas da subfamília Rho desempenham um papel na organização do citoesqueleto, atuando na formação dos filamentos de actina e na reorganização destes filamentos em resposta a estímulos por fatores de crescimento (Ridley and Hall, 1992). Os membros da subfamília Rab e Arf regulam o tráfego entre membranas citoplasmáticas e o tráfego de vesículas, respectivamente (Novick et al., 1980). As proteínas da subfamília Ran regulam o tráfego nucleoplasmático e a organização de microtúbulos (Kahana and Cleveland, 1999). A subfamília Ras compreende 36 membros em mamíferos e é dividida em três grupos principais: Ras, Ral e Rap (Cherfils and Zeghouf, 2013). Essas proteínas estão envolvidas no controle da proliferação, diferenciação, forma e morte celular, sendo

H-Ras, K-Ras e N-Ras os membros melhor caracterizados em humanos (Bar-Sagi and Feramisco, 1985; Coleman et al., 2004; Kauffmann-Zeh et al., 1997; Whitman and Melton, 1992). Por regular essas funções críticas, os genes *Ras* são alvo de intensa pesquisa, pois são considerados proto-oncogenes, estando frequentemente associados à oncogênese em humanos (Repasky et al., 2004).

As GTPases de baixo peso molecular funcionam como “interruptores moleculares”, ciclando entre um estado inativo, quando ligadas à guanosina difosfato (GDP), e ativo, ligadas à guanosina trifosfato (GTP). A conversão entre as formas ativa e inativa é estritamente regulada por dois tipos de proteínas: fatores de troca de nucleotídeos guanina (GEFs – do inglês *Guanine nucleotide exchange factors*) que possibilitam a ativação das GTPases por promover a transição do estado inativo ligado a GDP ao estado ativo ligado a GTP; e as proteínas ativadoras de GTPases (GAPs – do inglês *GTPase-Activating Proteins*), que estimulam a hidrólise de GTP, fazendo com que retornem ao seu estado inativo ligado a GDP (Downward et al., 1990; Wolfman and Macara, 1990). Existe ainda um terceiro componente na regulação das GTPases, os inibidores da dissociação de guanina (GDI, do inglês *guanine nucleotide dissociation inhibitor*), que podem inibir ou bloquear as ações das GAPs e dos GEFs (**Figura 4**) (Campbell et al., 1998). Embora todas as proteínas da superfamília Ras apresentem o mesmo mecanismo de regulação, cada subfamília está associada ao seu próprio grupo de GEFs e GAPs (Bos et al., 2007; Cherfils and Zeghouf, 2013; Takai et al., 2001; van Dam et al.; Wolfman and Macara, 1990).

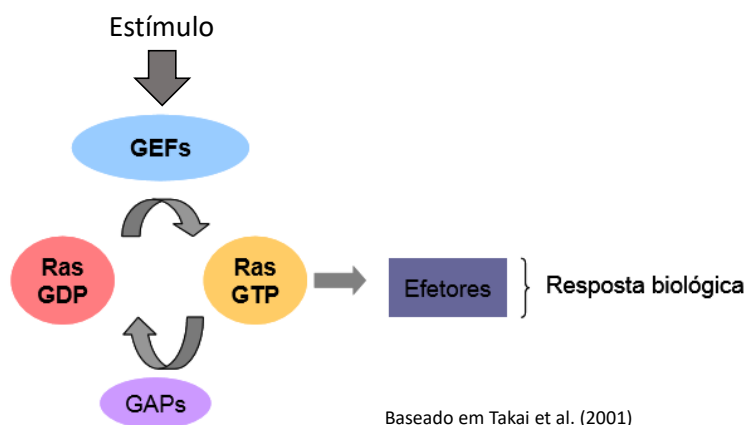


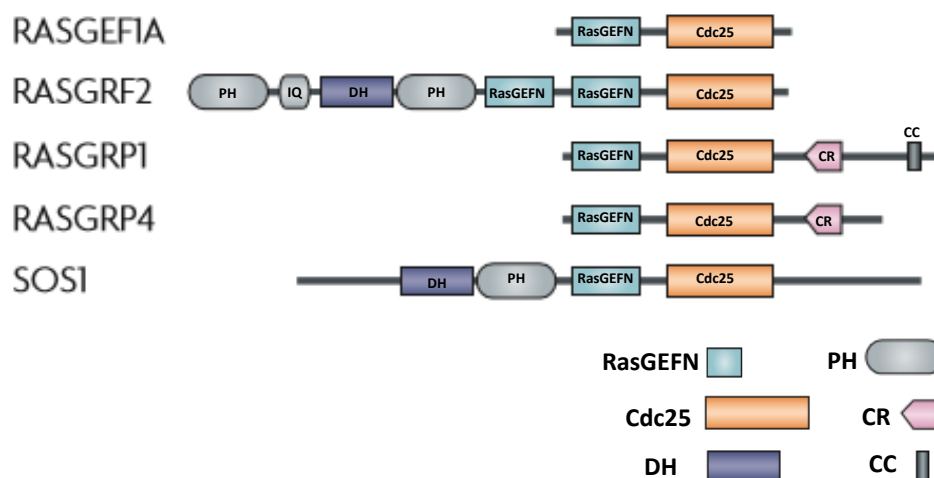
Figura 4: Representação esquemática da regulação da atividade de Ras-GTPases. Diferentes estímulos modulam a atividade dos RasGEFs e RasGAPs que, por sua vez, promovem a alteração entre o estado ativo e inativo das Ras-GTPases através da troca de GDP/GTP. As proteínas Ras ativadas são capazes de interagir com vários efetores, desencadeando diversas respostas biológicas como, por exemplo, proliferação celular e rearranjo de citoesqueleto

1.4 Os fatores de troca de nucleotídeos guanina das proteínas Ras (RasGEFs) e o membro RasGEF1b

Os fatores de troca de nucleotídeo guanina (GEFs) são classificados em famílias de acordo com a similaridade da sequência de aminoácidos que apresentam em sua estrutura, e de acordo com o tipo de proteína ligadora de GTP que eles ativam (Zheng and Quilliam, 2003). A relevância dos estudos relacionados aos GEFs se deve ao fato de essas proteínas serem capazes de ativar proteínas G, por exemplo Ras, e modular importantes vias de sinalização reguladas por diversos efetores, tais como proteínas cinases (Vigil et al.).

Os RasGEFs (RasGEFs, do inglês *Ras associated GEFs*) têm em comum um domínio catalítico carboxi-terminal de aproximadamente 250 aminoácidos, denominado CDC25 (do inglês, *cell division cycle 25 homology domain* - também chamado domínio RasGEF), e um domínio estrutural adjacente, amino-terminal, de aproximadamente 50 aminoácidos, chamado de domínio RasGEFN (Quilliam et al., 2002). Os GEFs que possuem o domínio CDC25 regulam exclusivamente a família Ras (RasGEFs) (Broek et al., 1987; Robinson et al., 1987). Além do domínio catalítico CDC25, alguns RasGEFs possuem ainda outros domínios importantes e funcionais. Por exemplo, o RasGRF1, o Sos1 e o Sos2 possuem os domínios de homologia DH (DH - do inglês *DbI homology*) e PH (PH - do inglês *pleckstrin homology*), que estão arranjados em conjunto. O domínio DH parece promover a troca de guaninas em GTPases da subfamília Rho, enquanto o domínio PH participa nas interações proteína-proteína ou proteínalipídios (**Figura 5**) (Lemmon et al., 1996; Quilliam et al., 1995).

Ras GEFs



Modificado de Vigil et al. (2010)

Figura 5: Representação esquemática da estrutura de diferentes RasGEFs. Os membros da família RasGEF apresentam o domínio estrutural N-terminal RasGEFN e o domínio catalítico C-terminal, Cdc25, que caracterizam a família. Diferentes RasGEFs podem apresentar ainda outros domínios específicos que desempenham variadas funções, representados na figura: (RasGEFN) Domínio RasGEFN; (Cdc25) Domínio cell division cycle 25 homology; (DH) Domínio de homologia a Dbl; (PH) Domínio de homologia de plecstrina; (CR) Domínio rico em cisteína; (CC) Domínio hélice-espira-espiralada.

Embora os mecanismos de ativação de Ras ocasionada pela troca GDP/GTP sejam semelhantes, a modulação dos diferentes RasGEFs é regulada por sinais diversificados. Tal sinalização inclui, por exemplo, a fosforilação de proteínas e lipídios, o fluxo de cálcio e a geração de segundos mensageiros, como diacilglicerol (DAG). Por exemplo, Fleming e colaboradores (1999) demonstraram que o RhoGEF Tiam 1 é fosforilada em sítios distintos pela quinase II dependente de cálcio/calmodulina, pela proteína cinase C (PKC, do inglês *protein kinase C*) e pela cinase Src (do inglês *proto-oncogenic tyrosine kinase*), resultando em efeitos distintos em sua atividade (Fleming et al., 1999; Servitja et al., 2003). Um outro exemplo é RasGRF1, um fator de troca de nucleotídeo guanina regulado por cálcio que possui um motivo de ligação à calmodulina. Tal motivo parece ser crucial para a ativação desse GEF em resposta ao cálcio (Farnsworth et al., 1995; Shou et al., 1992).

Como mencionado, em células não estimuladas, as proteínas Ras encontram-se predominantemente em sua forma inativa associada ao GDP. Mediante estímulos específicos, os RasGEFs promovem a dissociação do GDP da proteína Ras, tornando-a

acessível ao GTP que está em excesso molar no citoplasma. Associada ao GTP, Ras adquire sua conformação estrutural ativa, e pode iniciar a cascata de sinalização através da ativação de outras proteínas, que culmina na ativação da transcrição de vários genes ligados à proliferação, diferenciação e morte celular (Boguski and McCormick, 1993). Dessa forma, estes sistemas compostos de GTPases, GAPs e GEFs permitem grande versatilidade na construção de vias de sinalização. Os sinais podem ser amplificados (um GEF pode ativar várias GTPases), integrados (várias vias ativam os mesmos GEF e GAPs) ou divididos (uma GTPase induz vários efeitos) (Wilkins and Insall, 2001). Essa versatilidade permite que, indiretamente, os GEFs mediem diferentes funções biológicas na célula.

Vários GEFs associados aos membros da subfamília Ras foram isolados e caracterizados em células de mamíferos, como Sos, RasGRF, RasGRF2, RasGRP, C3Gm, Vav, entre outros (Bowtell et al., 1992; Gulbins et al., 1994). Muitas funções biológicas essenciais dependem do funcionamento adequado de RasGEFs, como por exemplo, a ativação de Ras através RasGEF-CDC25 em *S. cerevisiae* é essencial para a proliferação e germinação de esporos (Broek et al., 1987). Em *Dictyostelium*, uma espécie amebóide, o desenvolvimento embrionário é regulado por RasGEFM, um GEF caracterizado nessa espécie (Arigoni et al., 2005). O GEF Sos, ao ativar Ras em *Drosófila*, estabelece a diferenciação de fotoreceptores (Simon et al., 1991).

A família RasGEF1 compreende os membros RasGEF1a, RasGEF1b e RasGEF1c. Assim como os outros RasGEFs, essas proteínas apresentam o domínio com uma potencial função estrutural, denominado GEF-N, e o domínio carboxi-terminal, que se assemelha ao domínio catalítico CDC-25. Os estudos com os membros dessa família, sobretudo RasGEF1a e RasGEF1c, ainda são bastante escassos, no entanto, encontra-se na literatura algum material disponível a respeito de RasGEF1b. Essa proteína é expressa em vários organismos, em diferentes tecidos, e em condições fisiológicas normais e patológicas. Por exemplo, em Zebrafish, a expressão de RasGEF1b ocorre durante o desenvolvimento embrionário, e parece ser fortemente regulada pelas vias de sinalização Nodal, de FGF e TGF- β (Epting et al., 2007). Noutro relato, Chen e colaboradores (2007) mostraram que a expressão de RasGEF1b é aumentada em hepatócitos de camundongos que apresentam lesão hepática induzida por Leigongteng, uma planta da medicina chinesa tradicionalmente utilizada para tratar doenças auto-imunes como artrite reumatóide, além de dermatoses (Chen et al., 2007). Entretanto, esses dados apenas sugerem uma

correlação da expressão de RasGEF1b ao fenótipo *in vitro* ou *in vivo* observado por esses estudos.

Em concordância com a grande variedade de funções biológicas reguladas pela ação dos RasGEFs, evidências vem sendo demonstradas desde a última década sobre a participação desses fatores na resposta imune. Nesse sentido, o RasGEF1b, inicialmente denominado GPIy4, foi identificado por Ferreira e colaboradores (2002), e descrito como um GEF cuja expressão é fortemente induzida durante a resposta imune inata mediada por receptores do tipo Toll (Ferreira et al., 2002). Eles mostraram que em macrófagos murinos estimulados com agonistas TLR2 e TLR4, assim como em órgãos como timo, baço, rim, fígado e coração de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*, os níveis de mRNA de RasGEF1b são robustamente elevados. O mesmo ocorre em macrófagos humanos estimulados com GPI-mucina de *T. cruzi* ou lipopolissacarídeo (LPS) (Ferreira et al., 2002). Andrade e colaboradores (2010) demonstraram ainda que, *in vivo*, a expressão de RasGEF1b induzida durante a infecção por *T. cruzi* ou *Plasmodium chabaudi* em camundongos é dependente de MyD88, TRIF, assim como de IFN-gama (Andrade et al., 2010). Além disso, estudos funcionais preliminares (não publicados) conduzidos em nosso laboratório têm sugerido um papel duplo de RasGEF1b na regulação da expressão de genes associados à resposta imune mediada por TLRs. Nesses estudos, observamos que em camundongos deficientes de RasGEF1b a transcrição de genes que codificam para citocinas, receptores e outros mediadores inflamatórios encontra-se alterada. Para alguns deles, a expressão do mRNA parece depender de RasGEF1b, enquanto que para outros, RasGEF1b parece atuar como inibidor parcial da transcrição. Sobretudo, estudos de ganho-de-função realizados em nosso laboratório apontam que RasGEF1b inibe a ativação de NF- κ B induzida por TLRs, o que, em parte, poderia explicar o aumento da transcrição de alguns genes observado em macrófagos RasGEF1b *-/-* estimulados por agonistas inflamatórios de TLRs (manuscrito em preparação). Além disso, foi observado que o silenciamento de RasGEF1B através de siRNA leva a um aumento na atividade de NF- κ B em macrófagos murinos Raw264.7 estimulados com Pam3CSK4 ou LPS (manuscrito em preparação). Em conjunto essas evidências sugerem que RasGEF1b deve desempenhar um papel importante durante a resposta imune inata mediada por receptores do tipo Toll. Portanto, é importante que se investigue cada aspecto da regulação e funcionamento desse GEF, de modo a melhor entender o seu papel na célula.

2. JUSTIFICATIVA

Os trabalhos voltados para a análise da expressão e função de RasGEF1b acumulam evidências sugerindo que esse GEF está intimamente associado à resposta imune inata mediada por receptores do tipo-Toll. Ferreira et al. (2002) e Andrade et al. (2010) mostraram que *Rasgef1b* tem sua expressão aumentada tanto *in vitro* quanto *in vivo* durante a resposta imune inata mediada por TLRs. Estudos conduzidos em nosso laboratório têm sugerido um papel importante de RasGEF1b como regulador da expressão de genes associados à resposta imune mediada por TLRs, com possível papel na regulação da ativação do fator de transcrição NF- κ B (Lima, 2012; Rocha, 2014; Valverde, 2011). Uma vez que, em conjunto, esses dados sugerem que RasGEF1b seja um importante modulador da resposta imune, é essencial que se investigue cada aspecto da regulação de sua expressão, de modo a fornecer subsídios para a investigação da dinâmica de seu papel em diferentes tipos celulares. No entanto, os mecanismos moleculares responsáveis pela regulação transcricional do gene *Rasgef1b* são ainda desconhecidos. Portanto, é de grande importância a investigação da região genômica regulatória envolvida nessa função, assim como dos fatores de transcrição que se ligam a ela, de forma a melhor compreender quais são e como funcionam os elementos que orquestram a regulação da expressão desse gene, além de contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos básicos da regulação gênica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar funcionalmente a região promotora putativa que regula a expressão do gene *Rasgef1b* na resposta imune mediada por receptores do tipo Toll (TLRs).

3.2 Objetivos específicos

1- Avaliar os níveis do mRNA de RasGEF1a, RasGEF1b e RasGEF1c em macrófagos murinos derivados de medula óssea (BMDMs) após ativação de TLR4.

2- Conduzir análises *in silico* da região genômica a montante da sequência codificadora de *Rasgef1b* para a identificação de elementos regulatórios de ligação a fatores gerais de transcrição (GTFs, do inglês *general transcription factors*) e fatores de transcrição específicos envolvidos com a resposta imune inata.

3- Determinar a localização do provável sítio de início da transcrição de *Rasgef1b* através de *nested* RT-PCR.

4- Avaliar, através de ensaios de gene repórter, a atividade dos segmentos da região promotora putativa de *Rasgef1b* em macrófagos Raw264.7 tratados com agonistas de TLRs.

5- Avaliar, através de ensaios de gene repórter, o efeito de moléculas da via de sinalização dos TLRs e de fatores de transcrição associados à resposta imune sobre a atividade dos segmentos da região promotora putativa de *Rasgef1b*.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Camundongos C57BL/6 eram mantidos em gaiolas, em ambiente com luminosidade e temperatura controlada (22 a 25°C), recebendo água e ração *ad libitum* e constantemente monitorados para identificação de possíveis infecções e zoonoses no biotério de criação do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), Fiocruz. Para a extração das células da medula óssea apenas machos foram utilizados, com idade entre 8 a 12 semanas e peso médio de 20 gramas aproximadamente. O uso desses animais esteve de acordo com resolução do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFMG) – Protocolo N° 69/2014.

4.2 Cultura de células imortalizadas

Foram utilizadas nesse trabalho as linhagens imortalizadas de células de embrião de rim humano HEK293 (cedido por Dr. Oscar B. Romero, ICB/UFMG), fibroblastos murinos L929 (cedidos pelo Laboratório de Vírus, ICB/UFMG) e macrófagos murinos Raw264.7 (gentilmente cedido por Dr. Bryan Williams, The Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, USA). Para o cultivo de HEK293 e L929, as células eram retiradas do estoque armazenado em nitrogênio líquido, descongeladas imediatamente em banho de água a 37°C e transferidas para garrafas de superfície tratada para cultura de células (TPP, 25 cm²) contendo 5 mL de meio DMEM (Meio Eagle Modificado Dulbecco's, LGC), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco - USA) e antibiótico (100ug/mL estreptomicina / 100 U/mL penicilina – Gibco - USA). As células eram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera a 5% de CO₂ e após 4 horas o meio de cultura era renovado para eliminação de *debris* celulares e DMSO proveniente do meio de congelamento. Entre 24 e 48h após esse procedimento, ao atingirem entre 80-90% de confluência, era realizada a passagem das células para uma garrafa de maior área (TPP, 75 cm²) para a manutenção da cultura. Para a realização das passagens, a cada 48 horas o meio era desprezado e a monocamada de células era lavada com PBS 1X (do inglês *Phosphate buffered saline* - NaCl 140mM; Na₂HPO₄ 10mM; KH₂PO₄ 1mM; KCl 2mM). Em seguida, 1,5mL de Tripsina (0,5%) – EDTA (Gibco) era adicionado, e a garrafa era incubada a 37°C por 1 minuto. Posteriormente, 4,5 mL de meio DMEM completo fresco era adicionado e as células eram ressuspensas em um volume total de 6

mL. Parte da suspensão era desprezada e o restante era ressuspensão em um volume final de 18 mL.

Para o cultivo das células Raw264.7 o procedimento era semelhante ao descrito para as células HEK e L929, com a exceção que o soro fetal bovino utilizado era proveniente da Cultilab (Brasil), as garrafas estéreis para cultura de células utilizadas eram de superfície não-tratada da marca NUNC (USA) e o meio de cultura não era suplementado com antibióticos.

Para a manutenção da viabilidade das linhagens o estoque era constantemente renovado através do congelamento das culturas. Ao atingirem entre 80 a 90% de confluência, as células eram lavadas com PBS e tripsinizadas como já descrito, e então ressuspensas em meio de congelamento contendo 90% de soro fetal bovino e 10% de DMSO (Hybri-Max, Sigma). Um mililitro dessa suspensão era adicionado em tubo de congelamento (TPP) e transferido para um freezer a -80°C. Após 24 horas, os tubos eram transferidos para botijão de nitrogênio líquido a -196°C.

4.3 Obtenção de sobrenadante rico em M-CSF

Fibroblastos murinos da linhagem imortalizada L929 foram cultivados para a obtenção do sobrenadante rico em Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos (M-CSF, do inglês *Macrophage-Colony Stimulating Factor*), utilizado no preparo do meio de diferenciação dos BMDMs. A cultura era mantida, como descrito no tópico 4.2. Para a expansão da cultura, o meio era desprezado e a monocamada de células era lavada com PBS 1X (do inglês *Phosphate buffered saline* - NaCl 140mM; Na₂HPO₄ 10mM; KH₂PO₄ 1mM; KCl 2mM). Em seguida, 1,5 mL de Tripsina (0,5%) - EDTA era adicionado, e a garrafa era incubada a 37°C por 1 minuto. Posteriormente, 4,5 mL de meio DMEM completo fresco era adicionado e as células eram ressuspensas no volume total de 6 mL. Esse volume era então dividido para três novas garrafas (TPP, 75cm²) contendo 15 mL de meio DMEM completo até atingirem entre 80-90% de confluência. Esse procedimento era repetido até que fossem geradas 15 garrafas. Feito isso, as células eram mantidas por 10 dias em cultura em um volume final de 30 mL de meio DMEM completo. Ao final desse período o sobrenadante era coletado, centrifugado a 400 x g, 4°C por 10 minutos, filtrado em filtro de 0.22 µm, distribuído em alíquotas de 50 mL em tubos tipo Falcon (BD Biosciences - USA), e armazenado a -80°C.

4.4 Obtenção e cultivo de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs)

As células precursoras de macrófagos foram obtidas da medula óssea de camundongos C57BL/6. Os animais eram eutanasiados e os fêmures e tíbias eram cuidadosamente extraídos e adicionados a um tubo de polipropileno contendo PBS estéril e, posteriormente, deixados em etanol 70% por 1 minuto. Utilizando-se meio RPMI 1640 (HyClone, LGC Biotecnologia,) e uma seringa com agulha 0,70 x 25 mm, as células da medula eram removidas e transferidas a um tubo de polipropileno estéril. Para a diferenciação dos macrófagos derivados da medula óssea, as células eram ressuspensas em meio de diferenciação contendo 10 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 20% soro fetal bovino (Gibco - USA), 2 mM de glutamina (Gibco), 25 mM de HEPES pH 7,2, 100 unidades/mL de penicilina G potássica (Gibco) e 30% de sobrenadante de cultura de células L929. O sobrenadante de células L-929 contém quantidade significativa de M-CSF que é um fator de crescimento essencial na diferenciação de células progenitoras a macrófagos. A suspensão de células era plaqueada em placas de superfície não tratada (placas de Petri 100x15mm, Prolab) e incubadas a 37°C/5% CO₂ por 7 dias. No quarto dia o meio de diferenciação era renovado. Ao sétimo dia em cultura, o sobrenadante era descartado e a cultura era lavada com 5 mL de PBS estéril para eliminação dos *debris* e das células não aderentes. Posteriormente, eram adicionados 10 mL de PBS à cultura na placa, seguido de incubação no gelo por 10 minutos. As células aderidas na placa, já diferenciadas como macrófagos derivados da medula óssea (BMDM, do inglês *Bone marrow derived macrophages*), eram removidas por raspagem com “Cell scraper” (Corning, USA) ou então por ressuspensão do PBS e de meio sobre a cultura de células, e transferidas para tubo de polipropileno estéril. Os BMDMs eram centrifugados a 200 x g / 5 min a 4 °C e ressuspensos em meio de manutenção contendo 5 mL de meio RPMI 1640, 10% SBF, 2 mM de glutamina, 25 mM de HEPES pH 7,2, 100 unidades/mL de penicilina G potássica e 5% de sobrenadante de cultura de células L929.

4.5 Detecção de contaminação por *Mycoplasma ssp.*

Cada lote de células utilizado era previamente submetido a testes para a detecção de contaminação por *Mycoplasma ssp.* através de PCR para amplificação do rRNA 16s conservado entre as espécies de *Mycoplasma* (van Kuppeveld et al., 1994). Para isso, as células eram cultivadas, como descrito no item 4.2, em meio livre de antibióticos por no mínimo 48 horas. Após esse período o meio era desprezado, a cultura era lavada com PBS

e tripsinizada como descrito, e uma alíquota de 500 µL da suspensão era coletada. Essa alíquota era incubada em banho seco a 100°C por 10 minutos para o rompimento celular e extravasamento de DNA. As amostras eram brevemente centrifugadas e as reações eram preparadas com uma mistura de 2µL da amostra, 0,125 µL da enzima Taq DNA polimerase (5U/µL, Phoneutria), 2,5 µL de Tampão IO 10X (Phoneutria), 0,75 µL de MgCl₂ 50mM (Phoneutria), 0,5 µL de uma mistura de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a 10mM (Invitrogen), 16,625 µL de H₂O Milli-Q autoclavada, e 1,25 µL a 10µM dos oligonucleotídeos *forward* GPO-3 e *reverse* MGSO (**Tabela 2**). As condições termocíclicas eram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C durante 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos, e um último ciclo de extensão a 72°C durante 5 minutos. As amostras eram então fracionadas em gel de agarose 1,5 % preparado em solução tampão TAE 1X (0,04M Tris-acetato, 0,001M EDTA) contendo brometo de etídeo (0,5µg/mL). A eletroforese era realizada a 100 V, e ao final da corrida, o gel era visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UV) e as imagens capturadas através de câmera acoplada a sistema de fotodocumentação UV (MultiDoc-It™, UVP).

4.6 Tratamentos e extração do RNA total

Macrófagos murinos derivados de medula óssea (BMDMs) e células Raw264.7 foram tratados com LPS para obtenção do RNA total. Os BMDMs eram plaqueados em placas de superfície tratada para cultura de células de 6 poços (JET BIOFIL) a uma densidade de 2 x 10⁶ células/poço. Após 24 horas de plaqueamento era feito o tratamento com 100 ng/mL de LPS (O55:B5 – Sigma-Aldrich, EUA) durante os tempos de 0, 4 e 8 horas. Após os tratamentos, o meio de cultura era desprezado e imediatamente era adicionado 1 mL do reagente TRIzol (Invitrogen) aos poços, seguido de homogeneização por 15 minutos em shaker orbital. Em seguida o conteúdo era coletado e transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL (Axygen Scientific). As amostras eram então congeladas a -80°C ou procedia-se a extração do RNA total pelo método do TRIzol seguindo-se o procedimento descrito pelo fabricante. Ao final o RNA era solubilizado em água DEPC (do inglês *Diethylpyrocarbonate* - Invitrogen) com o auxílio de uma micropipeta. Em seguida as amostras eram incubadas a 55°C durante 10 minutos e posteriormente estocadas a -80°C. Para a quantificação do RNA total, 2 µL de cada amostra era lida em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific - EUA). Posteriormente era realizada a síntese da primeira fita de cDNA a partir do RNA total

obtido, que por sua vez era utilizado como molde para reações de RT-qPCR para análises de expressão gênica.

As células Raw264.7 eram plaqueadas em placas de cultura de células de 24 poços (JET BIOFIL) a uma densidade de 3×10^5 células por poço. Após 24 horas de plaqueamento as células eram tratadas com 1 μg de LPS (O55:B5 – Sigma-Aldrich, EUA) durante os tempos de 0 e 3 horas. Em seguida o meio de cultura era desprezado, imediatamente era adicionado 500 μL do reagente TRIzol (Invitrogen) aos poços, e o RNA total era extraído, da mesma forma como descrito para os BMDMs, para posterior obtenção do cDNA utilizado como molde para as reações de *nested* RT-PCR.

4.7 Obtenção da primeira fita de cDNA

Um micrograma de RNA total de cada amostra era adicionado a uma solução contendo: 0,5 μg de oligo-dT (Prodimol), uma mistura de dNTPs (dATP; dCTP; dGTP; dTTP) (Invitrogen) 10 mM e água Milli-Q. Após incubação a 65°C durante 5 minutos e 2 minutos em gelo, eram adicionados 7 μL de um mix contendo 4 μL de tampão *First strand buffer* (Invitrogen), 2 μL de DTT 0.1 M (Invitrogen), e 1 μL (200U) da enzima transcriptase reversa MMLV-RT (Invitrogen). Esta mistura era incubada a 37°C por 50 minutos para obtenção do cDNA e posteriormente a 70°C durante 15 minutos para inativação da MMLV-RT. Alternativamente, devido à sua maior eficiência e fidelidade, 1 μL (200U) da enzima Superscript II (Invitrogen) foi adicionado e a reação incubada a 42°C por 50 minutos para a geração do cDNA que foi utilizado como molde nas reações de *nested* RT-PCR.

4.8 PCR em tempo real (RT-qPCR)

Para análise dos níveis de mRNA de RasGEF1a, RasGEF1b e RasGEF1c, assim como do gene referência utilizado com normalizador, Rpl32, 1,5 μL de uma diluição 1:10 da reação da primeira fita de cDNA era utilizado como DNA molde para a reação de RT-qPCR. A reação era preparada em um volume final de 5 μL de solução contendo 2,5 μL de 2X SYBR Green Master Mix (Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, Thermo Scientific) e 0,5 μL de cada iniciador a 10 μM (*forward* e *reverse*) específicos do gene alvo a ser amplificado (**Tabela 2**). A reação era montada em placa de 384 poços (MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate with Barcode, AppliedBiosystems), que era então selada, vortexada e brevemente centrifugada por 1 minuto a 1000 x g antes de

ser transferida para termociclador de tempo real (Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System). As condições termocíclicas eram programadas de acordo com o protocolo de ciclagem de dois passos recomendado pelo fabricante do kit (Thermo Scientific): desnaturação inicial a 95°C durante 10 minutos seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento e extensão a 60°C por 60 segundos. Ao final dos ciclos, era incluído um passo adicional para determinar as curvas de dissociação. Os resultados eram salvos em formato Microsoft Excel para análise da abundância relativa do mRNA através da equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de Livak (Livak and Schmittgen, 2001). Os valores obtidos eram transferidos para o programa GraphPadPrism 5 para plotagem gráfica e análises estatísticas.

4.9 *Nested* RT-PCR

Para fornecer evidências sobre a localização do sítio de início da transcrição (TSS, do inglês *transcription start site*) putativo de *Rasgef1b*, foram realizadas reações de *nested* RT-PCR a partir do cDNA de células Raw264.7 tratadas ou não com LPS. Uma primeira RT-PCR foi realizada utilizando-se uma mistura de 2 µL da reação da primeira fita de cDNA como molde, 0,125 µL da enzima Taq DNA polimerase (5U/µL, Phoneutria), 2,5 µL de Tampão IO 10X (Phoneutria), 0,75 µL de MgCl₂ 50mM (Phoneutria), 0,5 µL de uma mistura de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a 10mM (Invitrogen), 16,625 µL de H₂O Milli-Q autoclavada, e 1,25 µL a 10 µM dos oligonucleotídeos *forward* TSS +1 e *reverse* “ECO501R” (**Tabela 2**). As condições termocíclicas foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 4 minutos seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C durante 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e 45 segundos, e um último ciclo de extensão a 72°C durante 5 minutos. Parte do produto dessa reação foi purificado utilizando-se o kit “QIAquick PCR purification kit” (QIAGEN) e uma segunda reação de RT-PCR (*nested* RT-PCR) foi realizada a partir do produto purificado utilizando-se os oligonucleotídeos *forward* Nested +22 e *reverse* qRT-REV4 (**Tabela 2**) que se alinham internamente aos oligonucleotídeos utilizados na primeira reação. As condições termocíclicas foram similares, com exceção que a temperatura de anelamento utilizada foi 55°C. Uma terceira reação foi realizada, nas mesmas condições da primeira reação, também a partir do produto purificado da primeira RT-PCR utilizando-se os oligonucleotídeos *forward* Nested +73, mais interno ao Nested +22, e *reverse* qRT-REV4 (**Tabela 2**). Ao final, os amplicons eram submetidos à eletroforese em gel de agarose para visualização dos

resultados. Brevemente, após a adição de tampão Loading Buffer 1X (Tris-HCl 10mM pH 7.5, EDTA 50mM pH 8.0, glicerol 10%, Bromophenol blue 0,25% e Xylenecyanol 0,25%) a uma alíquota da reação de PCR, os amplicons eram fracionados em gel de agarose 1,5 % preparado em solução tampão TAE 1X (0,04M Tris-acetato, 0,001M EDTA) contendo brometo de etídeo (0,5µg/mL). A eletroforese foi realizada a 100 V, e ao final da corrida, o gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UV) e as imagens eram capturadas através de câmera acoplada a sistema de fotodocumentação UV (MultiDoc-It™, UVP).

4.10 Oligonucleotídeos e condições termocíclicas

Os oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho assim como as condições termocíclicas utilizadas em suas respectivas reações estão listadas na **Tabela 2**:

Tabela 2: Listagem dos genes alvos, dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sua sequência, e das condições termocíclicas utilizadas em cada reação.

Alvo/Reação	Iniciadores	Sequência 5' → 3'	Condições termocíclicas
rRNA 16s	GPO-3 fwd	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT	94°C/5'
	PCR	MGSO rev	TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC 72°C/30'' (35 ciclos) 72°C/5'
Rasgef1a (murino)	qRT-mRGF1a (fwd)	GTCACCCGTTGTGGACAAAG	
RT-qPCR	qRT-mRGF1a (rev)	TTGACCCGTTCCAGTTCAATG	
Rasgef1b (murino)	qRT-mRGF1b EX7_8 (fwd3)	GCTACAGCGAACGGAAGAA	95°C/10'
RT-qPCR	qRT-mRGF1b EX7_8 (rev3)	CTTCACAGGCATGCAGATTTTC	95°C/15'' (40 ciclos) 60°C/60''
Rasgef1c (murino)	qRT-mRGF1c (fwd2)	GCTGGAGCGACTAAGGCAC	
RT-qPCR	qRT-mRGF1c (rev2)	CTGTTGAACCACTTCACGTAGG	
Rpl32 (murino)	qRT-RPL32 (fwd)	GCTGCCATCTGTTTTACGG	
RT-qPCR	qRT-RPL32 (rev)	TGACTGGTGCCTGATGAACT	
Rasgef1b (murino)	TSS+1 (fwd)	GGCGGGCGGGGGCGTGGCCTG	94°C/4'
RT-PCR	ECO501R (rev)	GGAATTCAGAGGGCGGCGAGTTTTTC	94°C/30'' 60°C/30'' (30 ciclos) 72°C/1'45'' 72°C/5'
Rasgef1b (murino)	Nested+22 (fwd)	CGGCAGGAGGCGGGCATTTC	94°C/4'
RT-PCR (nested)	QRT-Rev4 (rev)	CCAAGTGTGGATAAAGGGCTTC	94°C/30'' 55°C/30'' (30 ciclos) 72°C/1'45'' 72°C/5'
Rasgef1b (murino)	Nested+73 (fwd)	AGTTTCAGTATAAACAAGGAC	94°C/4'
RT-PCR (nested)	QRT-Rev4 (rev)	CCAAGTGTGGATAAAGGGCTTC	94°C/30'' 60°C/30'' (30 ciclos) 72°C/1'45'' 72°C/5'
Rasgef1b (murino)	<u>Xho</u> -P-mFWD1	CCG <u>CTCGAG</u> TTTAAACATCCTTCGCAAAC	94°C/3'
PCR	<u>Xho</u> -PD1	CCG <u>CTCGAG</u> CGGGAAAACCCGCCGATC	94°C/15'' 52°C/30'' (35 ciclos) 68°C/4' 68°C/10'

4.11 Análises *in silico*

A sequência genômica a montante da sequência codificadora de *Rasgef1b* foi recuperada a partir do banco de dados de sequências nucleotídicas do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Número de acesso: NC_000071.6). Para análise dos elementos regulatórios putativos presentes na sequência foram utilizados os programas TFsearch versão 1.3 (atualmente fora de serviço - www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html), TFBIND (<http://tfbind.hgc.jp/>) e rVISTA (Regulatory VISTA - <http://genome.lbl.gov/vista/rvista/submit.shtml>). Os elementos identificados com *score* inferior a 85 foram ignorados (*cutoff* \geq 85).

Para análises da presença de ilhas CpG foram utilizados os programas MethPrimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>), EMBOSS-Cpgplot (http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpgplot/) e EMBOSS-Newcpgreport (http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_newcpgreport/).

Para o alinhamento e identificação do grau de conservação entre as sequências de espécies diferentes, utilizamos os programas BLASTn (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool - blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) e mVISTA (<http://genome.lbl.gov/vista/mvista/submit.shtml>).

As sequências de aminoácidos das proteínas RasGEF1a, RasGEF1b e RasGEF1c foram recuperadas a partir do banco de dados UniProtKB (<http://www.uniprot.org/> - números de acesso E9Q1N6, Q8JZL7 e Q9D300, respectivamente). Para o alinhamento das sequências de aminoácidos foi utilizado o programa Clustal Omega versão 1.2.1 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo).

4.12 Amplificação e clonagem do promotor putativo de *Rasgef1b*

Para a construção dos plasmídeos contendo parte da região regulatória de *Rasgef1b*, um segmento de 3.000 pares de bases (-2881 a +119, onde a posição +1 corresponde ao TSS putativo de *Rasgef1b*) foi amplificado a partir de DNA genômico de macrófagos peritoniais de camundongos C57BL/6. As reações eram preparadas em um volume final de 25 μ L de solução contendo 2,5 μ L do tampão *Pfx* Amplification Buffer 10X (Invitrogen), 0,75 μ L de mistura de dNTPs 10 mM (Invitrogen), 0,5 μ L de MgSO₄ 50 mM (Phoneutria), 2,5 μ L de PCRx Enhancer Solution 10X (Invitrogen), 0,5 μ L da Platinum *Pfx* DNA polimerase (Invitrogen); 0,75 μ L (20 μ M) dos oligonucleotídeos *foward* XHO-P-mFWD1 e *reverse* XHO-PD1 (**Tabela 2**), 2 μ L de DNA genômico

murino (diluído em água Milli-Q nas proporções 1:100 e 1:1000). As condições da reação foram as seguintes: primeiro ciclo de 94°C/3 minutos, 35 ciclos de 94°C/15 segundos, 52°C/30 segundos, 68°C/4 minutos, e um último ciclo de 68°C/10 minutos. Ao final da reação, foram adicionados 0,5 µL de dATP 10mM e 0,33 µL Taq DNA polimerase 5 U/µL (Phoneutria), seguidos de incubação a 72°C por 15 minutos.

O amplicon foi clonado inicialmente no plasmídeo pGEM-T-Easy® (Promega). Para isso foram misturados 5 µL do tampão Rapid ligation 2X - T4 DNA ligase (Promega), 1 µL plasmídeo pGEM-T-Easy, 3 µL do amplicon e 1 µL de T4 DNA ligase (Promega), totalizando 10 µL, e a reação foi incubada por 16 horas a 4°C. O produto da reação foi então transformado em bactérias quimiocompetentes XL1-Blue, para replicação do plasmídeo e obtenção do inserto em maior quantidade, como descrito nos **tópicos 4.14 e 4.15**. Aliquotas do plasmídeo gerado (pGEM-T - 3kb) foram digeridas com as enzimas *XhoI* (10 U/µL - Promega) e *XmnI* (10 U/µL -Promega) por 90 minutos a 37°C para obtenção o inserto e em seguida fracionado em gel de agarose 1% contendo Brometo de Etídio. O segmento de 3 kb foi recuperado e purificado utilizando-se o Kit “QIAquick Gel Extraction Kit” da QIAGEN.

Em seguida procedeu-se a clonagem desse segmento no repórter de expressão da luciferase pGL3-Basic (Promega). A fim de viabilizar a clonagem unidirecional do inserto, procedeu-se uma reação de digestão com a enzima *KpnI* (10 U/µL - Promega) por 90 minutos a 37°C. O vetor pGL3-basic foi preparado para a clonagem através da digestão com as enzimas *XhoI* e *KpnI* durante 90 minutos a 37°C e posteriormente incubado com a enzima CIAP 1/µL (do inglês *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* – Promega) seguindo-se o protocolo do fabricante. Para a ligação do inserto foram preparadas reações contendo 4 µL (150 ng) de pGL3-Basic, 4 µL de Ligation Buffer 5x (Invitrogen) 1 µL de T4 DNA Ligase (1 U/µL – Invitrogen), e inserto nas proporções molares 3:1, 2:1 e 1:1 (inserto:vetor). A reação era completada com água Milli-Q para um volume final de 20 µL e incubadas por 60 minutos a 25°C. O inserto foi clonado no sítio múltiplo de clonagem (MCS – do inglês *multiple cloning site*) do plasmídeo pGL3-Basic entre os sítios de *KpnI* e *XhoI*. Procedeu-se então a transformação do plasmídeo pGL3-2.8kb em bactérias XL1-Blue e a obtenção do plasmídeo pGL3-2.8kb em média escala como descrito nos **tópicos 4.14 e 4.15**.

4.13 Geração de mutantes por deleção e síntese de DNA

Para a construção de mutantes por deleção, o plasmídeo pGL3-2.8 kb foi submetido a reações de digestão com diferentes enzimas de restrição. Para gerar a construção pGL3- Δ 492 (-2.747/-374) o plasmídeo pGL3-2.8kb foi digerido com a enzima *Bgl*III (10 U/ μ L - Promega) a 37°C por 90 minutos. As amostras foram fracionadas em gel de agarose 1% e os fragmentos recuperados foram purificados utilizando-se o kit “QIAquick Gel Extraction Kit” da QIAGEN. O plasmídeo foi religado através de incubação com 1 μ L de T4 DNA Ligase (1 U/ μ L – Invitrogen) por 60 minutos a 25°C. Para gerar a construção pGL3-1.7 kb (-1621/+119), foi realizada uma digestão dupla com as enzimas *Eco*RI (10 U/ μ L - Promega) e *Kpn*I (10 U/ μ L - Promega) por 90 minutos a 37°C. Para a construção do pGL3-0.8 kb (-706/+119), foi realizada uma digestão dupla com as enzimas *Mlu*I (10 U/ μ L - Promega) e *Kpn*I (10 U/ μ L - Promega) por 90 minutos a 37°C. As amostras foram fracionadas em gel de agarose 1% e os fragmentos recuperados foram purificados utilizando-se o kit “QIAquick Gel Extraction Kit” da QIAGEN. Uma vez que essas digestões geraram extremidades coesivas, mas não complementares, as amostras foram submetidas ao tratamento com T4 DNA Polimerase. Para isso, 10 μ L de cada amostra foi incubado com 5 unidades de T4 DNA polimerase (Invitrogen), 0,6 μ L de dNTPs 10mM (Invitrogen), 12 μ L de 5x T4 DNA Polymerase Buffer (Invitrogen) e 6 μ L de BSA 10x (Invitrogen) em um volume final de 60 μ L completado com água Milli-Q, por 15 minutos a 11°C, 5 minutos a 37°C e finalmente por 10 minutos a 75°C para inativação da enzima. Os plasmídeos foram religados através de incubação com 1 μ L de T4 DNA Ligase (1 U/ μ L – Invitrogen) por 60 minutos a 25°C. A construção pGL3-0.302kb (-183/+119) foi gerada através de síntese de DNA pela empresa Genescript (USA). As construções geradas eram transformadas em bactérias quimiocompetentes XL1-Blue e obtidas em pequena e média escala como descrito nos tópicos 4.14 e 4.15

4.14 Transformação bacteriana

Os plasmídeos utilizados nesse trabalho eram transformados em bactérias quimiocompetentes XL1-Blue para replicação e posterior obtenção dos mesmos em pequena e média escala. Para isso, as bactérias XL1-Blue quimiocompetentes eram retiradas do botijão de nitrogênio líquido e deixadas em gelo para descongelamento. Três microlitros de plasmídeo – com concentração entre 0,2 e 0,5 μ g/ μ L – eram misturados a

100 µL da suspensão de bactérias. A amostra era incubada durante 30 minutos em gelo, seguido de choque térmico em banho de água a 37°C por 45 segundos e 2 minutos em gelo. Em seguida, 900 µL de meio Luria Bertani (LB) sem antibiótico era adicionado e a amostra era incubada por 1 hora em Shaker Orbital (MA410 – Marconi) a 220rpm. Após incubação, a amostra era centrifugada a 8.000 x g por 1 minuto, o sobrenadante era descartado, o sedimento era ressuspenso em 100µl de LB líquido e esse volume era plaqueado em placas de petri contendo ágar a 1,5% preparado em meio LB com 100µg/µL de Ampicilina (Sigma-Aldrich). As placas eram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas.

4.15 Obtenção de DNA plasmidiano em pequena e média escala (midiprep)

Colônias eram selecionadas das placas de transformação e individualmente inoculadas em tubos de polipropileno (15mL) contendo 4 mL de meio LB com Ampicilina a 100 µg/mL. Os tubos eram incubados sob agitação a 37°C por 16 horas. Para a extração dos plasmídeos em pequena escala o “Kit QIA prep Miniprep” (QIAGEN) era utilizado de acordo com o protocolo do fabricante. Para a obtenção dos plasmídeos em média escala eram utilizados os kits “GenElute™ HP Plasmid Midiprep” (Sigma-Aldrich) e “GenElute Endotoxin-free Plasmid Midiprep” (Sigma-Aldrich) – para obtenção de DNA plasmidiano livre de endotoxinas para os experimentos realizados em células Raw264.7 – de acordo com o protocolo do fabricante.

4.16 Digestão com enzimas de restrição

Alíquotas de 10 µL de plasmídeo – concentração entre 0,2 e 0,5 µg/µL – eram adicionadas às soluções contendo o tampão padrão de cada enzima a 1X (fornecido pelo fabricante), 1 unidade da enzima de restrição, BSA a 1X e água Milli-Q para um volume final de 20 µL. As reações eram incubadas a 37°C por 90 minutos em banho de água. Para digestões duplas em que as enzimas não compartilhavam do mesmo tampão padrão, a primeira digestão era realizada com a enzima cujo tampão padrão contém a menor quantidade de sal. Em seguida era realizada a inativação da enzima a 65° C por 15 minutos e, então, era adicionada à amostra a outra enzima de restrição, seu tampão padrão a 1X, BSA a 1X e o volume era completado com água Milli-Q para 30µL final.

4.17 Sequenciamento nucleotídico dos fragmentos

Os segmentos de DNA da região promotora putativa de *Rasgef1b* clonados no vetor pGL3-Basic (Promega, USA) foram sequenciados utilizando-se os oligonucleotídeos RVprimer3 e GLprimer2 (Promega), assim como 8(oito) oligonucleotídeos desenhados manualmente, descritos na **Tabela 3**, por eletroforese capilar em aparelho ABI3130, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1 pela empresa Myleus Biotechnology (www.myleus.com). As sequências nucleotídicas foram comparadas a sequências existentes no banco de dados GenBank através do programa “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) contido no “National Center of Biotechnology Information” (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabela 3: Listagem dos oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento da região promotora putativa de *Rasgef1b* clonada no vetor pGL3-Basic.

Iniciadores	Sequência 5' → 3'
RVprimer3 fwd (Promega)	CTAGCAAATAGGCTGTCCC
SEQ- 2.8kb-FWD2	TGTATGTTGGGTCACCATGA
SEQ- 2.8kb-FWD3	CACTTTTGCACGCCTGAGTA
SEQ- 2.8kb-FWD4	TGGAGCTAGAAGGACCCTGA
SEQ- 2.8kb-REV1	CCTGATGTGGCTGATGGAAT
SEQ- 2.8kb-REV2	TGACGGGTCCCATGAGTTAT
SEQ- 2.8kb-REV3	CCTGTGAAACCCTCCTCAAG
SEQ- 2.8kb-REV4	CCTTAAGCCCCGAGTTTAT
SEQ- 2.8kb-REV5	TTTCGCAAAGGAAAGGAAGA
GLprimer2 rev (Promega)	ACTGACTGACTGACTGACTG

4.18 Transfecção e ensaio de gene repórter

Células HEK293 e Raw264.7 foram transfectadas com os plasmídeos contendo segmentos da região promotora putativa de *Rasgef1b* para avaliação da atividade constitutiva e induzida de cada construção mediante ativação das vias de TLRs ou de fatores de transcrição da família NF- κ B diretamente. As células HEK293 eram plaqueadas em placas de superfície tratada para cultura de células de 24 poços (JET BIOFIL) a uma densidade de 1×10^5 células por poço em 500 μ L de meio DMEM completo. As placas eram mantidas em estufa a 5% de CO₂ e 37 °C, e as transfecções eram realizadas após 24 horas de plaqueamento, quando as células apresentavam

confluência 80-90%. Quatrocentos nanogramas do plasmídeo pGL3-Basic ou dos repórteres contendo segmentos região promotora putativa de *Rasgef1b* (pGL3-0.302, pGL3-0.8, pGL3-1.7, pGL3-2.8, pGL3-Δ492) eram transfectados, juntamente com 100ng do plasmídeo pRL-TK que promove a expressão constitutiva da luciferase de *Renilla*, usado como normalizador nos ensaios de gene repórter. Para avaliar os efeitos de moléculas das vias de sinalização de TLRs e de fatores de transcrição da família NF-κB na atividade dos segmentos, as células eram transfectadas ou não com 500 ng dos plasmídeos pFlag-Mal/TIRAP ou pFlag-p65, assim como 2,5 µg do plasmídeo pFlag-c-Rel utilizando-se o método polímero catiônico por meio do uso do reagente MAX-PEI (Polietilenoimina, PolySciences, EUA) na proporção de 5:1 (µl de MAX-PEI : µg de DNA). A quantidade de DNA transfectado era mantida constante pela transfecção do plasmídeo pFLAG-CMV4 nas células que não recebiam os plasmídeos de expressão citados.

As células Raw264.7 eram plaqueadas em placas de superfície tratada para cultura de células de 24 poços (JET BIOFIL) a uma densidade de 2×10^5 células por poço em 500 µL de meio DMEM completo. Quatrocentos nanogramas do plasmídeo pGL3-Basic ou do plasmídeo pGL3-0.302 eram transfectados, juntamente com 100ng do plasmídeo pRL-TK, utilizando-se como reagente de transfecção a Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific) na proporção 2:1 (µL de lipofectamina : µg de DNA). Após 24 horas o meio era trocado por DMEM fresco, e as células eram estimuladas ou não com 100 ng/mL de LPS (O55:B5 – Sigma-Aldrich, EUA) durante 3, 6, 9, 12 e 24 horas para avaliar a atividade do promotor.

4.19 Obtenção do extrato celular e ensaio de gene repórter

Para a obtenção dos extratos celulares, o meio de cultura era aspirado por sucção a vácuo e eram adicionados por poço 200µL de tampão de lise passiva (PLB 1X, do inglês *Passive Lysis Buffer*) fornecido pelo kit “Dual-Luciferase Reporter System” (Promega). A placa era então incubada à temperatura ambiente sob baixa agitação em shaker orbital por 15 minutos e então armazenada em freezer a -20°C até que a leitura da luminescência fosse realizada. Para isso, após descongelamento, as amostras eram transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5mL (Axygen Scientific) e centrifugadas a 8.000 x g por 5 minutos. Cinco microlitros de cada amostra eram adicionados por poço em uma placa de 96 wells opaca, de cor branca (FluoroNunc, Nunc, EUA). Em cada poço eram adicionados 40µL do reagente “LARII” (Promega), seguido da leitura das amostras em luminômetro

(LumiCount™, Packard Instruments). Imediatamente após a leitura da luciferase de vagalume (*Photinus pyralis*) a placa era retirada do aparelho e eram adicionados 40µL do reagente “Stop & Glo” (Promega) a cada poço para a leitura da luciferase de *Renilla*. Os valores obtidos das leituras eram registrados e salvos automaticamente pelo programa “Reader” (Packard Instruments, USA). A atividade relativa da luciferase de cada repórter transfectado era determinada e normalizada pela razão do valor da leitura da luciferase do vagalume sobre o valor da leitura da luciferase da *Renilla* (dada pelo plasmídeo pRL-TK transfectado).

4.20 Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados nesse trabalho estão listados na **Tabela 4**.

Tabela 4: Listagem e descrição dos plasmídeos utilizados para transfecção.

Plasmídeos	Descrição
pFLAG-CMV4	Plasmídeo de expressão eucariótica contendo epítipo FLAG (Sigma, USA)
pFLAG-Mal/TIRAP	Contém sequência codificadora de Mal/TIRAP com epítipo FLAG (Fitzgerald et al, 2001).
pFLAG-p65	Contém sequência codificadora do monômero p65 (RelA) de NF-kB com epítipo FLAG, gentilmente cedido por Daniel Mansur (UFSC, Brasil)
pFLAG-c-Rel	Contém sequência codificadora do monômero c-Rel de NF-kB com epítipo FLAG (Addgene, USA)
pGL3- 0.302 kb	Contém o gene da luciferase de vagalume (<i>Pluc</i>) sob o controle transcricional do segmento de DNA de 302 nucleotídeos (-183/+119) da provável região promotora de <i>Rasgef1b</i> murino.
pGL3- 0.8 kb	Contém o gene da luciferase de vagalume (<i>Pluc</i>) sob o controle transcricional do segmento de DNA de 885 nucleotídeos (-706/+119) da provável região promotora de <i>Rasgef1b</i> murino .
pGL3- 1.7 kb	Contém o gene da luciferase de vagalume (<i>Pluc</i>) sob o controle transcricional do segmento de DNA de 1740 nucleotídeos (-1621/+119) da provável região promotora de <i>Rasgef1b</i> murino.
pGL3- 2.8 kb	Contém o gene da luciferase de vagalume (<i>Pluc</i>) sob o controle transcricional do segmento de DNA de 2.866 nucleotídeos (-2747/+199) da provável região promotora de <i>Rasgef1b</i> murino.
pGL3- Δ492	Contém o gene da luciferase de vagalume (<i>Pluc</i>) sob o controle transcricional do segmento de DNA de 2.374 nucleotídeos (-2747/-374) da provável região promotora de <i>Rasgef1b</i> murino.
pGL3-Basic	Plasmídeo comercial (Promega) contendo o gene da luciferase de vagalume <i>Photinus pyralis</i> , ausente de promotor ou enhancer.C
pRL-TK	Contém o gene da luciferase de celenterado <i>Renilla</i> sob o controle transcricional do promotor do gene da timidina cinase do vírus HSV-1 (Promega)

4.21 Análise estatística

Os experimentos de RT-qPCR foram realizados em triplicata técnica e os valores são representativos de três experimentos independentes, expressos como média e desvio padrão. Os ensaios de gene repórter foram realizados em duplicata técnica e os valores são representativos de dois ou três experimentos independentes (como indicado nas

figuras), expressos como média e desvio padrão. Os dados foram analisados para identificação de significância estatística através do programa GraphPad Prism 5.03 utilizando-se os testes One-way ANOVA ou Two-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni como indicado nas figuras.

5. RESULTADOS

5.1 Análise dos níveis do mRNA de RasGEF1a, RasGEF1b e RasGEF1c em macrófagos murinos derivados de medula óssea (BMDMs)

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade da região promotora putativa de *Rasgef1b* no contexto da resposta imune mediada por TLRs. Contudo, devido à escassez de dados disponíveis na literatura sobre os membros da família RasGEF, julgamos necessário investigar o perfil de expressão desses genes em macrófagos sob a ótica da resposta imune mediada por TLRs. Para isso, BMDMs murinos foram tratados ou não com LPS e os níveis relativos de mRNA de RasGEF1a, RasGEF1b e RasGEF1c foram determinados por PCR em tempo real, utilizando-se como normalizador, o gene *Rpl32* murino, cuja expressão é estável diante das condições experimentais testadas. A **Figura 6a** mostra os níveis relativos do mRNA de RasGEF1b e RasGEF1a em relação a RasGEF1c, que nesse caso foi usado como calibrador, devido aos seus níveis serem menores. Observa-se que os níveis do mRNA de RasGEF1b são robustamente elevados em relação aos níveis dos transcritos de RasGEF1a e RasGEF1c. A maior abundância do transcrito de RasGEF1b indica que a expressão desse GEF é dominante em relação aos outros membros da família RasGEF. Esse resultado dá suporte à ideia de que RasGEF1b possa desempenhar um papel importante em macrófagos. A **Figura 6b** mostra o *fold* de indução dos transcritos de RasGEF1a, RasGEF1b e RasGEF1c em resposta ao tratamento com LPS durante 4 e 8 horas. Nas células tratadas, os níveis de mRNA de RasGEF1b e RasGEF1c tiveram um aumento de aproximadamente 4,5 vezes com 4 horas, e superior a 2 vezes com 8 horas. No entanto, para RasGEF1a, os níveis do mRNA diminuem com 4 e 8 horas, sugerindo que a expressão desse gene seja reprimida em BMDMs após o tratamento com LPS.

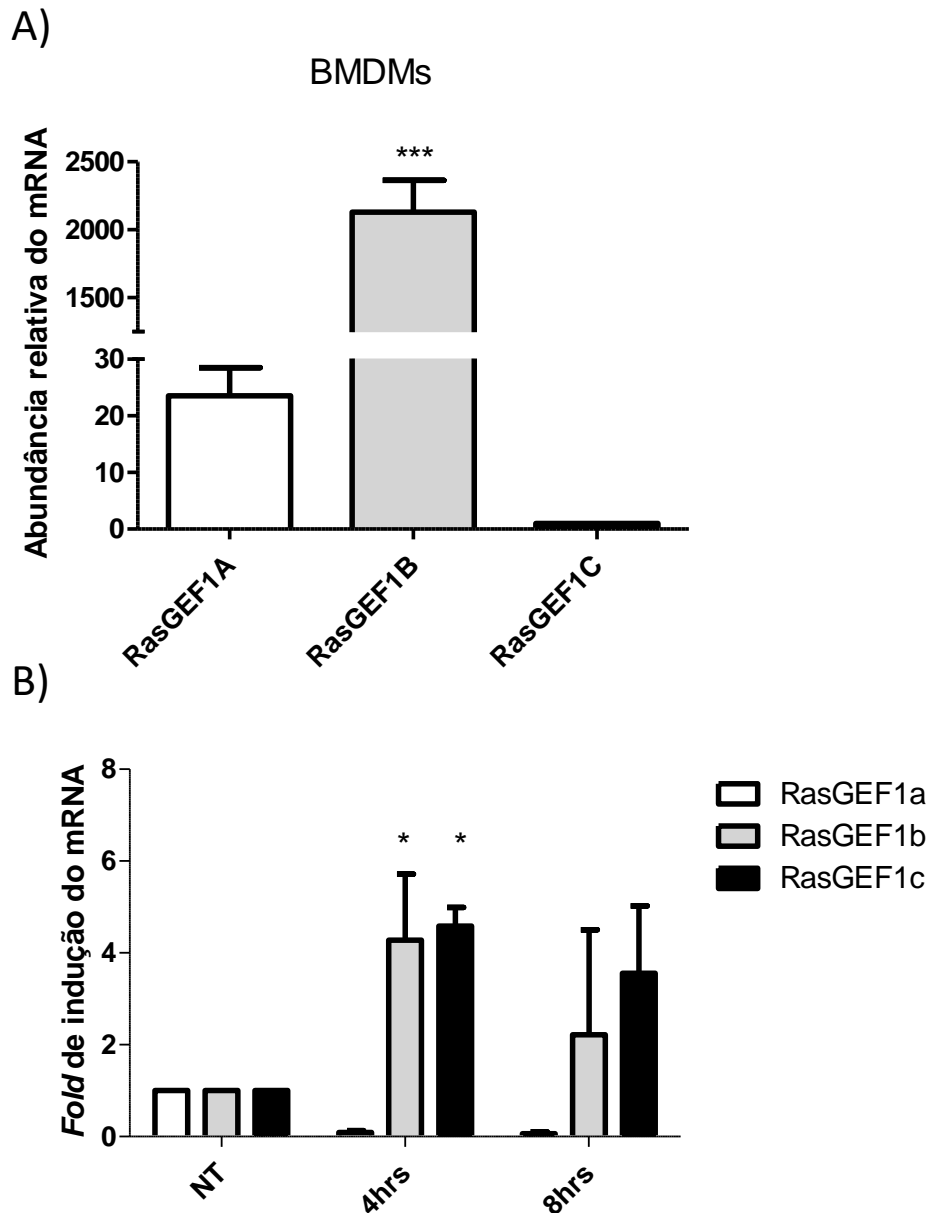


Figura 6: Análise dos níveis do mRNA de RasGEF1a, RasGEF1b e RasGEF1c por RT-qPCR. BMDMs eram plaqueadas em placas de 6 poços a 2×10^6 células/poço e tratadas ou não (NT) com LPS a 100ng/mL pelos tempos indicados. O cDNA era obtido a partir do RNA total e utilizado como molde em reações de RT-qPCR para a amplificação dos genes alvo e do gene referência (Rpl32) utilizado como normalizador. As reações eram realizadas em triplicata e os valores são representativos de três experimentos independentes, expressos como média \pm D.P.; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ em relação ao calibrador. Os níveis relativos do mRNA foram calculados através da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$. **A)** Abundância relativa do mRNA de RasGEF1b e RasGEF1a em relação a RasGEF1c (calibrador). Teste estatístico: One-Way Anova/Bonferroni posttest. **B)** Razão dos níveis do mRNA de RasGEF1a, RasGEF1b e RasGEF1c entre células tratadas e não-tratadas (calibrador). Teste estatístico: Two-Way ANOVA/Bonferroni posttests.

5.2 Identificação de elementos regulatórios presentes na sequência do promotor putativo de *Rasgef1b* através de análises *in silico*

Ferramentas de bioinformática são importantes para a obtenção de informações, mesmo que hipotéticas, sobre sequências nucleotídicas e também de aminoácidos ainda não caracterizadas. Os resultados obtidos através dessas análises realizadas *in silico* permitem guiar o trabalho experimental e fornecem subsídios para perguntas biológicas pertinentes (Jareborg et al., 1999).

Dados da literatura mostram que *Rasgef1b* tem sua expressão induzida em resposta à ativação de receptores do tipo Toll (Andrade et al., 2010; Ferreira et al., 2002). No entanto, os componentes moleculares que se ligam à região promotora e modulam a expressão desse gene são ainda desconhecidos. Portanto, a investigação dos elementos regulatórios presentes nessa região e dos fatores de transcrição que são potencialmente recrutados por eles é de grande importância para o entendimento da regulação transcricional de *Rasgef1b*. Para iniciar essa investigação, conduzimos análises *in silico* em uma sequência de 3.000 nucleotídeos recuperada do banco de dados de sequências nucleotídicas do NCBI (National Center for Biotechnology Information - número de acesso NC_000071.6). O segmento analisado compreende uma região de 2.881 nucleotídeos a montante e 119 nucleotídeos a jusante do sítio de início da transcrição de *Rasgef1b* (-2.881 a +119, onde a posição +1 corresponde ao TSS putativo). Utilizamos as ferramentas TFsearch 1.3 e TFBIND para investigar a presença de elementos regulatórios putativos nessa sequência. Dentre os resultados obtidos, identificamos e selecionamos os elementos regulatórios para a ligação de fatores de transcrição associados à resposta imune cujo *score* fosse superior a 85 pontos (*cutoff* 85 - relativo à matriz de similaridade com a sequência consenso). A **Tabela 5** sumariza os principais elementos regulatórios identificados, indicando suas sequências nucleotídicas, a fita codificadora (+) ou molde (-) em que se encontra no DNA, a posição relativa ao TSS putativo, o *score* e o número de acesso (registro no banco de dados TRANSFAC R.3.4). Estão presentes na sequência, sobretudo próximos ao TSS, vários sítios putativos de ligação dos fatores de transcrição da família NF- κ B/Rel, assim como de AP-1. Esses fatores de transcrição são diretamente ativados através da sinalização disparada por TLRs e desempenham um papel central na resposta imune inata. Ademais, outros fatores associados à modulação da resposta imune como C/EBP (do inglês *CCAAT-enhancer-binding proteins*), STAT1 (do inglês, *Signal transducer and activator of transcription 1*) e Sp1 (do inglês, *Specificity protein 1*)

também foram encontrados nessa sequência. Essas análises estão em concordância com os dados experimentais de expressão de *Rasgef1b*.

Tabela 5: Principais elementos regulatórios associados à resposta imune identificados na sequência da região promotora putativa de *Rasgef1b*.

Fator de transcrição	Fita do DNA	Posição relativa	Sequência	Score	Número de acesso (Registro TRANSFAC)
NF-κB	-	+119/ +110	GGGAAAACCC	88.6	M0054
	+	+110/+119	GGGTTTTCCC	85.7	M0054
	+	+109/ +118	CGGGTTTTCC	93.1	M0052
	-	+43/+31	GGGAAATGCC	87.5	M0054
	+	+32/+42	GGGCATTCC	92.7	M0052
	+	+32/+42	GGGCATTCC	91.6	M0054
	-	-73/-87	CGGGGACTTGCCAG	86.5	M00194
	-	-74/-86	GGGGACTTGCCA	92.8	M00208
	-	-75/-85	GGGACTTGCC	85.4	M0052
	-	-75/-85	GGGACTTGCC	91.3	M0054
	+	-109/-100	CGGGAGTCCC	86.2	M0051
	-	-2267/-2280	TTTGGAAGTTCCGC	91.0	M00194
	+	-2279/-2270	CGGAACTCC	87.0	M00052
c-REL	+	+109/ +118	CGGGTTTTCC	96.8	M0053
	+	+71/+80	TGGAGTTCA	87.3	M0053
	+	+32/+42	GGGCATTCC	93.4	M0053
	-	-75/-85	GGGACTTGCC	85.4	M0053
	-	-2269/-2278	TGGAAGTCC	86.0	M0053
	+	-2279/-2270	CGGAACTCC	86.8	M0053
Sp1	+	+9/+19	GGGGCGTGGCC	89.0	M00008
AP-1	-	-622/-630	TTGAATCAG	89.9	M00199
	+	-1157/-1149	TTGACTCAG	94.0	M00199
	+	-1158/ -1148	ATTGACTCAGG	87.6	M00173
	-	-2339/ -2347	CTGAGTCAT	92.5	M00199
	+	-2347/ -2339	ATGACTCAG	98.3	M00199
	+	-2348/ -2339	GATGACTCAG	91.8	M00173
C/EBP	-	-770/ -782	GATTTGGAGACTT	86.9	M00159
	+	-1950/ -1939	TCTTTGGAAATGA	92.3	M00159
	+	-1973/ -1959	AGCATGATGTAAGCT	85.5	M00109
	-	-2554/ -2567	CCTTTTGCAAAATCA	90.3	M00116
	-	2554/ -2566	CCTTTTGCAAAATC	85.4	M00159
	+	-2567/-2554	TGATTTTGCAAAGG	88.1	M00109
	+	-2688/ -2676	GATATGGTAAACC	86.2	M00159
	+	-2724/ -2710	TTATTGATTAACAT	86.5	M00116
Stat1	-	-2287/-2295	TTCCAGGAA	91.3	M00223
	+	-2295/-2287	TTCCTGGAA	94.2	M00223

Devido à presença notável dos sítios putativos de ligação a NF- κ B na sequência, sobretudo na circunvizinhança do TSS, decidimos investigar se esses elementos estariam conservados na sequência do *RASGEF1B* humano. Para isso, submetemos a sequência ortóloga humana (NCBI – número de acesso - NC_000004.12) à análise pelo programa TFBIND, e utilizamos adicionalmente o programa rVISTA (regulatory VISTA), que faz a busca automática de elementos regulatórios conservados entre duas sequências através da combinação do uso de bancos de dados de motivos de ligação a fatores de transcrição e análises comparativas de sequências. De acordo com essas análises, dois dos seis elementos regulatórios para NF- κ B presentes na sequência de *Rasgef1b* murino estão conservados na sequência ortóloga humana. Na sequência murina esses elementos se encontram centralizados nas posições -79 (na fita molde) e +75 (fita codificadora) em relação ao TSS (+1), ao passo que na sequência humana esses elementos se encontram centralizados nas posições relativas -123 (fita codificadora) e +17 (fita codificadora), respectivamente (**Figura 7**).

CAMUNDONGO

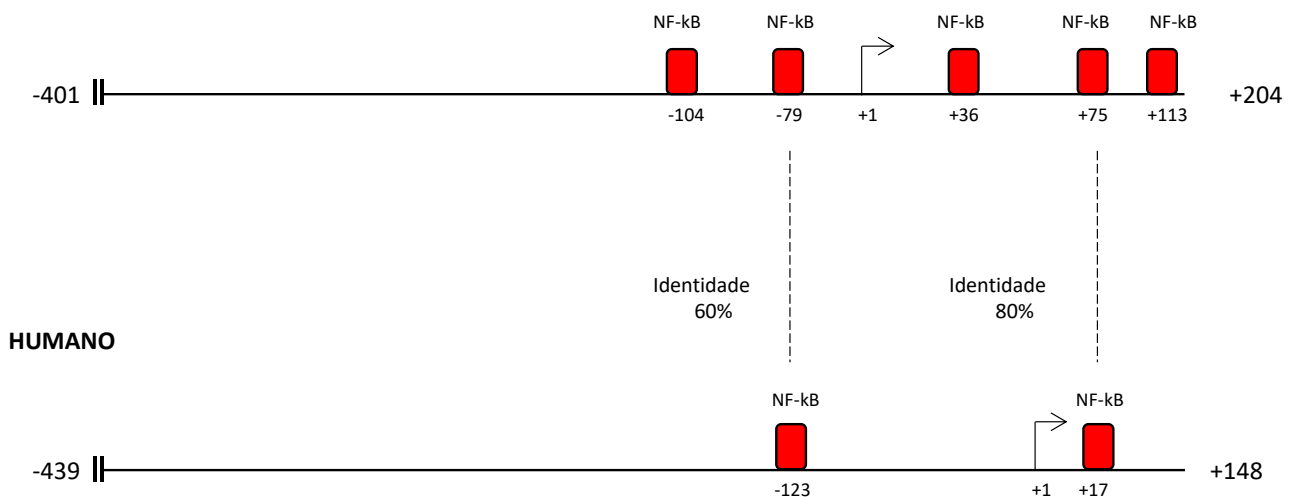


Figura 7: Representação esquemática da região circunvizinha ao TSS de *Rasgef1b* murino e humano. A sequência de 3 kb (-3000 a +214) proveniente do DNA genômico murino foi recuperada a partir do banco de dados de sequências do NCBI. Essa sequência foi comparada à sequência ortóloga humana (-3000 ao +160) através do alinhamento por BLASTn. A figura mostra a região alinhada com 70% de identidade e os elementos regulatórios para a família NF- κ B/Rel identificados utilizando-se os programas TFSearch 1.3, TFBIND e rVista. As linhas pontilhadas indicam os elementos conservados, identificados em concordância pelos programas mencionados. A identidade entre as sequências nucleotídicas dos elementos conservados estão indicadas.

Elementos regulatórios comumente encontrados na circunvizinhança do TSS são essenciais para promover a transcrição normal de genes eucarióticos. Esses elementos são responsáveis pelo recrutamento da maquinaria basal de transcrição, que inclui a RNA polimerase II e os fatores gerais de transcrição (GTFs, do inglês *General transcription factors*) associados (Butler and Kadonaga, 2002). Com base em análises manuais e através do programa TFBIND, verificamos que as sequências em torno do TSS de *Rasgef1b* não abrigam os elementos mais comuns de ligação a GTFs, como o TATA box, Inr (do inglês, *initiator*), BRE (do inglês, *TFIIB recognition element*), e DPE (do inglês, *downstream core promoter element*). No entanto, corroborando observações preliminares sugeridas por Ferreira et al. (2002), identificamos a presença de uma região rica em dinucleotídeos Citosina-Guanina (CpG) na circunvizinhança do TSS de *Rasgef1b*. Os programas utilizados para a análise (Methprimer, EMBOSS CpgPlot e EMBOSS newcpgreport) mostram que essa ilha CpG possui 439 nucleotídeos, e se estende da posição -281 ao +158. Portanto, embora os principais elementos eucarióticos para a ligação de GTFs estejam ausentes, esses dados sugerem que essa região possa conter o promotor mínimo de *Rasgef1b* devido à presença notável de uma ilha CpG.

O alinhamento entre sequências genômicas de diferentes espécies pode fornecer informações importantes sobre regiões funcionalmente conservadas (Blanchette and Tompa, 2002) Com essa finalidade, utilizamos o programa BLASTn (Nucleotide Blast) para alinhar as sequências regulatórias putativas de *Rasgef1b* murino (do -3000 ao final do primeiro éxon, +214) e humano (do -3000 ao final do primeiro éxon, +160). Somente a região circunvizinha ao TSS putativo foi alinhada com sucesso entre as duas sequências, apresentando 70% de identidade. Essa região contém 605 nucleotídeos (da posição -401 a +204 na sequência murina), abriga cinco elementos regulatórios para NF- κ B como mostrado na **figura 7**. Adicionalmente, submetemos a sequência completa do gene *Rasgef1b* murino (NCBI - NC_000071.6), incluindo a região regulatória descrita, à análise pelo programa mVISTA (<http://genome.lbl.gov/vista/mvista/submit.shtml>), que busca por segmentos evolutivamente conservados entre sequências de diferentes espécies. Essa análise incluiu o alinhamento entre a sequência de camundongo (*Mus musculus*), com as sequências de rato (*Rattus norvegicus*), humano (*Homo sapiens*), chimpanzé (*Pan troglodytes*), macaco rhesus (*Macaca mulatta*), boi (*Bos taurus*), cão (*Canis lupus familiaris*), galinha (*Gallus gallus*) e peixe zebrafish (*Danio rerio*). A **figura 8** mostra graficamente o grau de identidade entre as diferentes regiões ao longo das sequências. Cada sequência é representada disposta no sentido horizontal, da direita para a esquerda

(5'→3'). Quanto maior o pico, maior a identidade de alinhamento (de 50 a 100%) dessa região com a região ortóloga de camundongo. Como esperado, observa-se alto grau de conservação entre as sequências de camundongo e rato, inclusive para a maior parte da região não-codificadora. Essa similaridade diminui em relação aos outros mamíferos filogeneticamente mais distantes, no entanto, ainda se observa considerável identidade entre os éxons, UTRs, e parte das regiões não-codificadoras. Interessante notar que não há qualquer similaridade na região 5'UTR da sequência de *Canis familiaris*. Em relação às outras classes filogenéticas, a identidade entre as regiões não-codificadoras é praticamente inexistente, ocorrendo apenas entre os éxons. É importante notar que há uma região não-codificadora conservada entre as sequências de todos os mamíferos, localizada imediatamente a montante do primeiro éxon de *Rasgef1b*. Em relação ao alinhamento com a sequência humana, essa região conservada contém 205 nucleotídeos (do -401 ao -197 em relação ao TSS, +1), variando o tamanho em alguns poucos pares de bases nas sequências dos demais mamíferos analisados. Esse segmento faz parte da região já descrita que apresentou 70% de identidade no alinhamento realizado através do BLASTn entre as sequências de camundongo e humano. Em conjunto, esses resultados sugerem que, por apresentarem um grau elevado de conservação, essas regiões não-codificadoras devem desempenhar algum papel funcional na regulação da expressão do gene *Rasgef1b*.

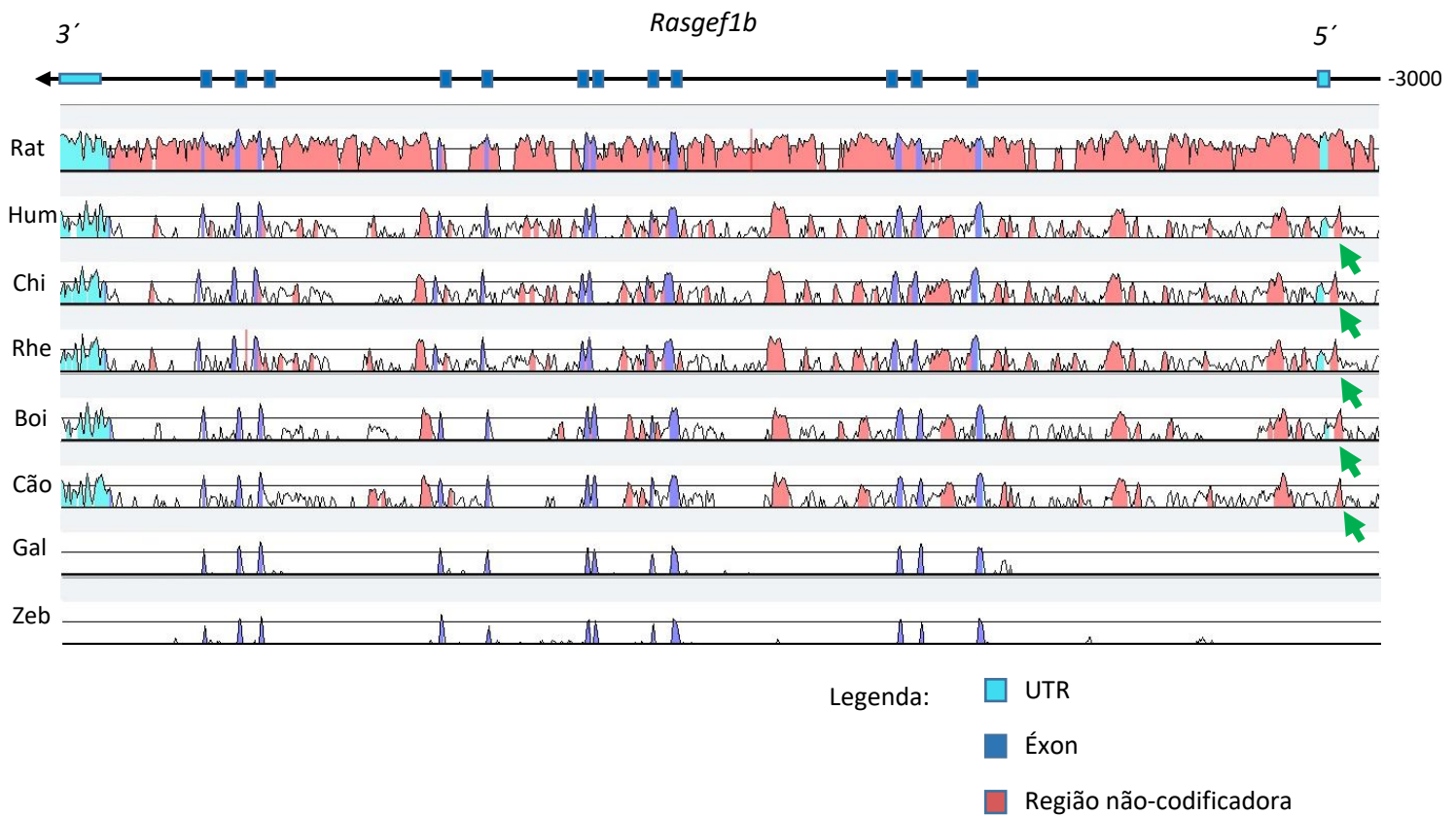


Figura 8: Esquema gráfico do alinhamento entre as sequências de *Rasgef1b* de espécies diferentes. A sequência de *Rasgef1b* de camundongo (do -3000 ao último éxon) foi analisada através do programa mVISTA para a identificação de regiões evolutivamente conservadas entre as sequências de rato, humano, chimpanzé, macaco rhesus, boi, cão, galinha e zebrafish. A figura mostra graficamente o grau de identidade entre as diferentes regiões ao longo das sequências. As sequências estão representadas dispostas no sentido horizontal, da direita para a esquerda (5' → 3'). Quanto maior o pico, maior a identidade de alinhamento (de 50 a 100%) dessa região com a relativa de camundongo. Em azul escuro estão representados os éxons, em azul claro as regiões não transcritas (UTR) e em vermelho as regiões não-codificadoras. As setas verdes indicam a região não-codificadora conservada a montante do primeiro éxon, que faz parte do promotor putativo investigado nesse trabalho.

5.2 Determinação da provável localização do sítio de início da transcrição de *Rasgef1b*

Como mencionado, a sequência da região promotora putativa de *Rasgef1b*, descrita no presente trabalho, foi recuperada a partir do banco de dados de sequências nucleotídicas do NCBI (número de acesso NC_000071.6) e do navegador Ensembl (<http://www.ensembl.org> - número de acesso ENSMUSG00000029333). A posição do primeiro nucleotídeo transcrito de *Rasgef1b* (TSS), utilizada como referência nesse trabalho, encontra-se anotada nesses documentos e foi descrita essencialmente com base em análises *in silico* (**Figura 9a**). Embora haja concordância entre as sequências mais recentemente depositadas em ambos os bancos de dados, a versão anterior da sequência referência depositada no NCBI (NC_000071.5), com a qual iniciamos o presente estudo, apresenta uma anotação diferente para a posição do TSS (**Figura 9b**). Segundo essa anotação, o TSS de *Rasgef1b* estaria localizado 73 nucleotídeos a jusante do TSS descrito na anotação atual (posição +74 em relação à anotação mais recente).

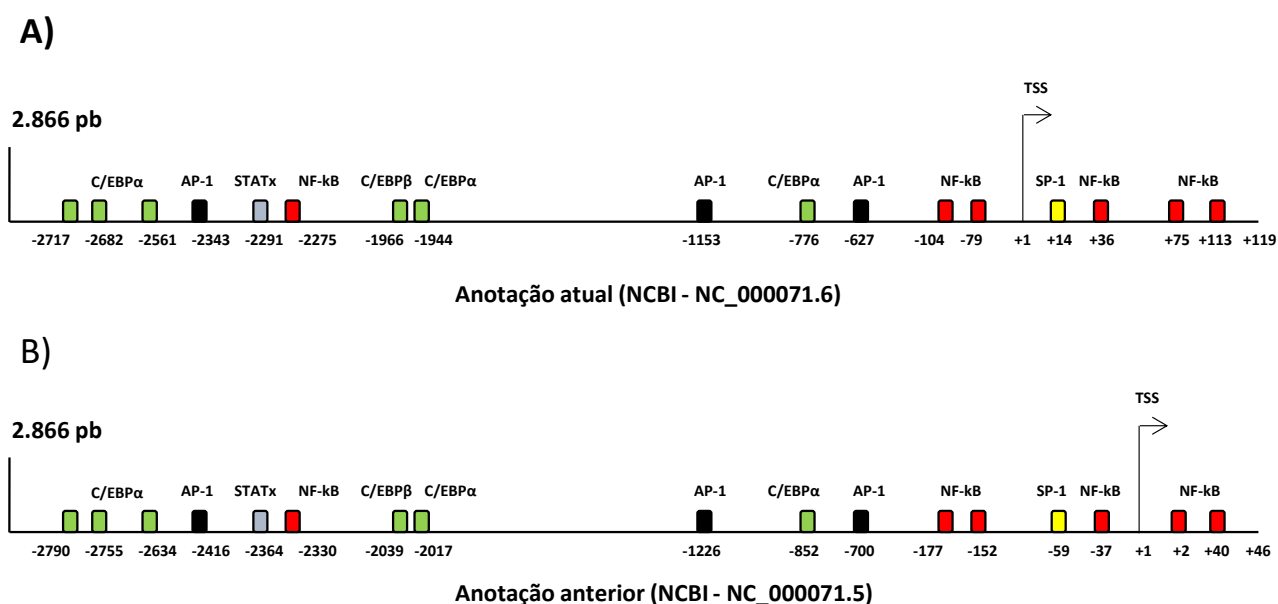


Figura 9: Representação esquemática da região promotora de *Rasgef1b* de acordo com diferentes anotações. A) Esquema baseado na anotação atualmente depositada no NCBI (número de acesso – NC_000071.6). **B)** Esquema baseado na anotação anterior depositada no NCBI, mostrando um TSS putativo diferente da anotação atual (número de acesso – NC_000071.5).

Uma vez que a discrepância entre as anotações data da época em que iniciamos nossos estudos, julgamos necessário fornecer evidências experimentais a respeito da provável localização do TSS de *Rasgef1b*, de modo a obter um mapeamento mais confiável do segmento analisado. Nosso objetivo, portanto, foi investigar se o nucleotídeo indicado como o TSS na anotação mais recente (NC_000071.6) faz parte do mRNA que é transcrito a partir de *Rasgef1b*. Para isso, realizamos reações de RT-PCR a partir do cDNA de células Raw264.7 tratadas ou não com LPS. Uma primeira reação de RT-PCR foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos *forward* RT-TSS+1 e *reverse* ECO501R (**Tabela 2**). O oligonucleotídeo *forward* TSS +1 foi desenhado de forma que sua extremidade 5' se alinhe com o primeiro nucleotídeo do transcrito de *Rasgef1b* (posição +1 até +21, de acordo a anotação NC_000071.6). O oligonucleotídeo *reverse* ECO501R, se alinha dentro da região codificadora de *Rasgef1b* (posição +720 até +705) (**Figura 10a**). A **figura 10b** mostra o resultado dessa reação, submetida à eletroforese em gel de agarose, onde esperava-se que fosse gerado um amplicon de 720 pb. Embora observe-se um rastro indicando um acúmulo de vários produtos amplificados na amostra proveniente de células tratadas com LPS (terceira canaleta), o resultado é inconclusivo devido ao alto grau de amplificação inespecífica, supostamente em razão da sequência pouco específica do oligonucleotídeo TSS+1, rica em repetições de guanina e citosina. Para possibilitar um diagnóstico mais esclarecedor, uma alíquota da primeira reação foi purificada e o produto foi utilizado como alvo para uma segunda reação de RT-PCR (*nested* RT-PCR) utilizando-se os oligonucleotídeos *forward* Nested+22 e *reverse* qRT-REV4 que se alinham internamente à sequência do amplicon gerado pelos oligonucleotídeos utilizados na primeira reação (posição +22/+41 e +371/350, respectivamente). A **figura 10c** mostra o resultado dessa reação submetida à eletroforese em gel de agarose. Na canaleta onde foi fracionada a amostra proveniente de células tratadas (terceira canaleta) observa-se uma banda de 350 pb referente ao amplicon. Ademais, uma terceira reação foi realizada utilizando-se como molde uma alíquota do produto da primeira reação e os oligonucleotídeos *forward* Nested+73 (posição +74/+94), a jusante do oligonucleotídeo Nested+22, e o *reverse* qRT-REV4. Observa-se na **figura 10d**, a banda de 298 pb referente ao amplicon. Os produtos dessas reações confirmam, de maneira indireta, a presença do amplicon de 720 pb gerado como produto da primeira reação de RT-PCR. Esses resultados sugerem que o transcrito de *Rasgef1b* inclui o nucleotídeo indicado como o TSS pela anotação da sequência referência atual do gene. Nesse sentido, estes dados

5.4 Amplificação, clonagem e geração de mutantes por deleção da região promotora putativa de *Rasgef1b*.

Para promover estudos funcionais sobre a atividade da região promotora putativa de *Rasgef1b*, primeiramente foi preciso amplificar e clonar essa região em um plasmídeo de expressão da luciferase, de modo a viabilizar os ensaios de gene repórter. Para isso, primeiramente realizamos a amplificação, através de PCR, de um segmento de DNA de 3.000 nucleotídeos a partir do DNA genômico de macrófagos peritoneais de camundongo C57Bl/6, utilizando-se oligonucleotídeos específicos (**Tabela 2**) (**Figura 11**). Considerando a anotação recuperada do NCBI (número de acesso NC_000071.6), esse segmento contém uma região de 2.881 nucleotídeos a montante e 119 nucleotídeos a jusante do sítio de início da transcrição de *Rasgef1b* (-2881 a +119, onde a posição +1 corresponde ao TSS). Sítios de restrição para a enzima *XhoI* foram inseridos nos oligonucleotídeos para que estivessem presentes em ambas as extremidades desse segmento amplificado por PCR (**Tabela 2**). O amplicon foi clonado inicialmente no vetor pGEM-T-Easy (Promega) e o plasmídeo foi transformado em bactérias quimiocompetentes XL1-Blue para a replicação e obtenção do inserto em média escala através de Midiprep.

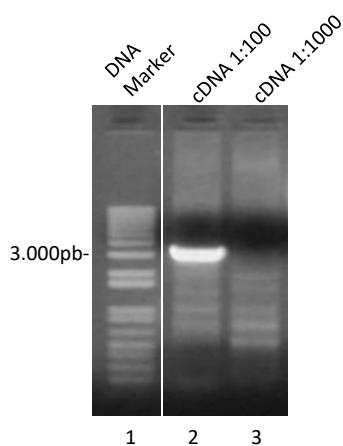


Figura 11: Amplificação do segmento de 3 kb da região promotora putativa de *Rasgef1b*.

Foram realizadas duas reações de PCR a partir de DNA genômico murino em duas diluições diferentes e as amostras foram fracionadas em gel de agarose 1%. Na canaleta 2 foi fracionada a amostra da reação realizada a partir de 2 ul de DNA genômico murino previamente diluído 1:100, onde observa-se a amplificação do segmento de 3 kb. Na canaleta 3 foi fracionada a amostra da reação contendo 2ul de DNA genômico murino diluído 1:1000. *DNA marker*: 1kb DNA ladder plus (Invitrogen).

Em seguida, procedeu-se a clonagem do inserto no repórter de expressão da luciferase, pGL3-Basic (Promega). Diante das dificuldades encontradas para clonar o inserto na orientação correta, foi necessário realizar a digestão desse segmento com a enzima *KpnI*, cujo sítio de restrição encontra-se próximo à sua extremidade 5'. Através dessa digestão, 134 nucleotídeos foram removidos da extremidade 5' do inserto, gerando um segmento de 2.866 pb (-2747/+199) e tornando possível a clonagem unidirecional no plamídeo pGL3-Basic. A clonagem e a orientação do inserto foram confirmadas por digestão simples com a enzima *HindIII* ou digestão sequencial com as enzimas *XhoI* e *KpnI*, e posterior fracionamento eletroforético em gel de agarose (**Figura 12a**). Como esperado, a digestão com *HindIII* gerou três fragmentos de 7.072 pb, 584 pb e 360 pb, ao passo que a digestão dupla resultou na liberação do inserto de 2.8 kb e linearização do vetor de 4.8 kb. A **figura 12b** mostra a representação esquemática do segmento clonado com os principais elementos regulatórios associados à resposta imune presentes nessa região, identificados com base em análises *in silico*.

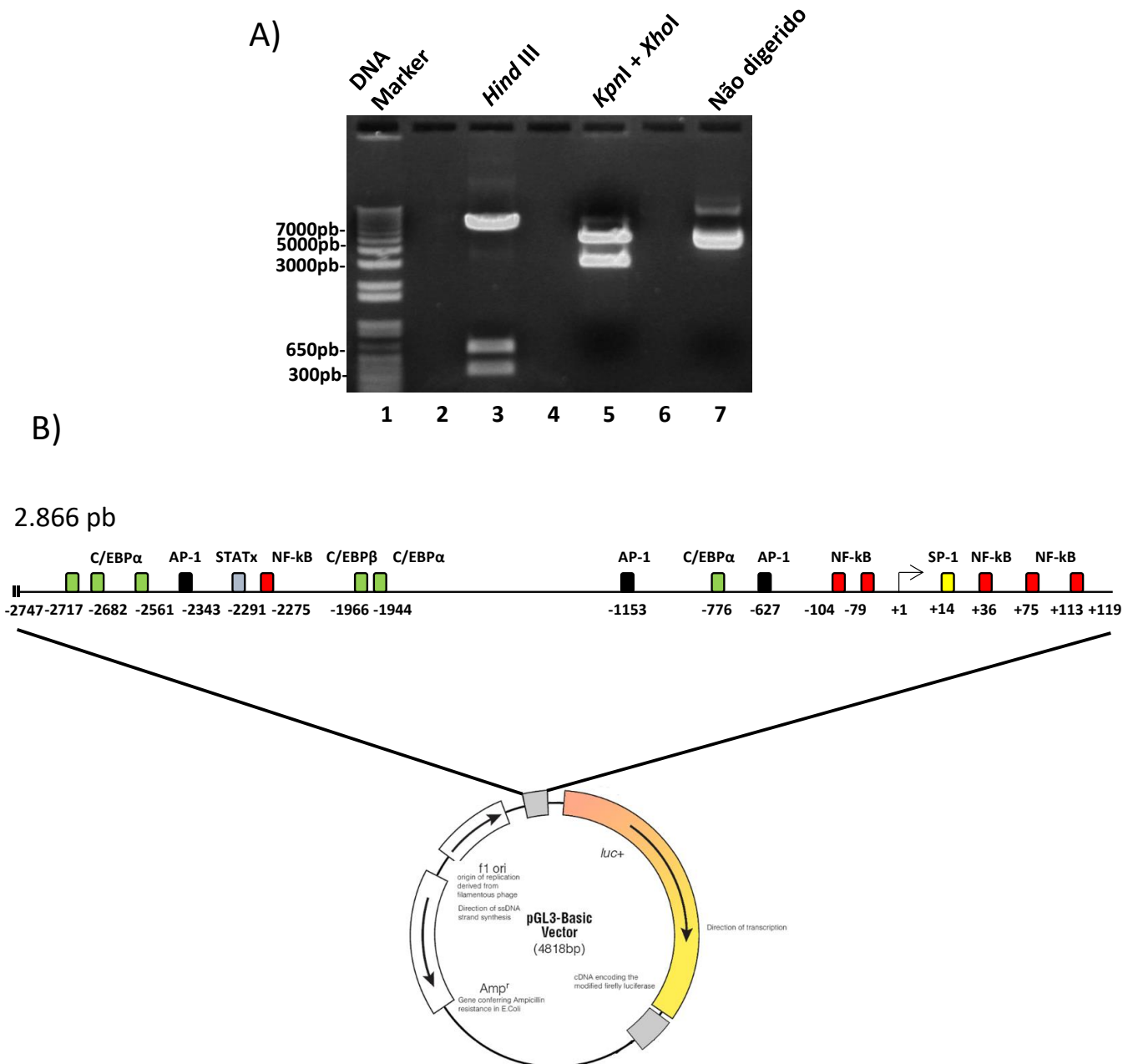


Figura 12: Análise da clonagem e representação esquemática do plasmídeo pGL3-2.8 kb. A)

Uma alíquota proveniente de miniprep do plasmídeo pGL3-2.8 kb foi digerida com *Hind*III apenas ou com *Kpn*I e *Xho*I sequencialmente e então fracionada em gel de agarose 1% para diagnóstico da clonagem. Uma alíquota do plasmídeo não digerido foi fracionado na canaleta 7 como referência. *DNA marker*: 1kb DNA ladder plus (Invitrogen). **B)** O segmento de 2.866 pb foi clonado entre os sítios de *Kpn*I e *Xho*I do plasmídeo pGL3-Basic. No esquema está indicado o TSS putativo do gene *Rasgef1b* (+1), assim como os principais sítios de ligação para fatores de transcrição associados à resposta imune. Os elementos para a família NF-kB/Rel foram identificados utilizando-se os programas TFSearch 1.3, TFBIND e rVista. Os demais elementos foram identificados utilizando-se o programa TFSearch 1.3. O limiar de corte utilizado foi um *score* de 85 pontos (*cutoff* 85).

Mutantes por deleção foram gerados a partir do plasmídeo pGL3-2.8 kb com o objetivo de se realizarem estudos funcionais comparativos sobre a atividade de segmentos de diferentes tamanhos da região promotora do gene *Rasgef1b*. Para gerar a construção pGL3-Δ492 (-2747/-374) o plasmídeo pGL3-2.8kb foi digerido com a enzima *Bgl*III. Essa digestão removeu 492 pares de bases da extremidade 3' do segmento clonado (da posição -373 ao +119), incluindo a região do TSS putativo e parte do primeiro éxon de *Rasgef1b*. Para gerar a construção pGL3-1.7 kb (-1621/+119), foi realizada uma digestão dupla do plasmídeo pGL3-2.8kb com as enzimas *Eco*RI e *Kpn*I. Essa digestão removeu 1.126 nucleotídeos da extremidade 5' do segmento clonado (da posição -2747 ao -1622). Finalmente, para a geração do pGL3-0.8 kb (-706/+119), foi realizada uma digestão dupla do pGL3-2.8kb com as enzimas *Mlu*I e *Kpn*I. Essa digestão removeu 1.981 nucleotídeos da extremidade 5' do segmento clonado (da posição -2747 ao -707). A **figura 13** mostra o diagnóstico da geração dos mutantes através de digestão e eletroforese. Uma quinta construção chamada pGL3-0.302kb (-183/+119) foi gerada através de síntese de DNA pela empresa GenScript (EUA). A **figura 14** mostra um esquema de todos os plasmídeos gerados onde estão representados os sítios putativos de ligação dos principais fatores de transcrição associados à resposta imune.

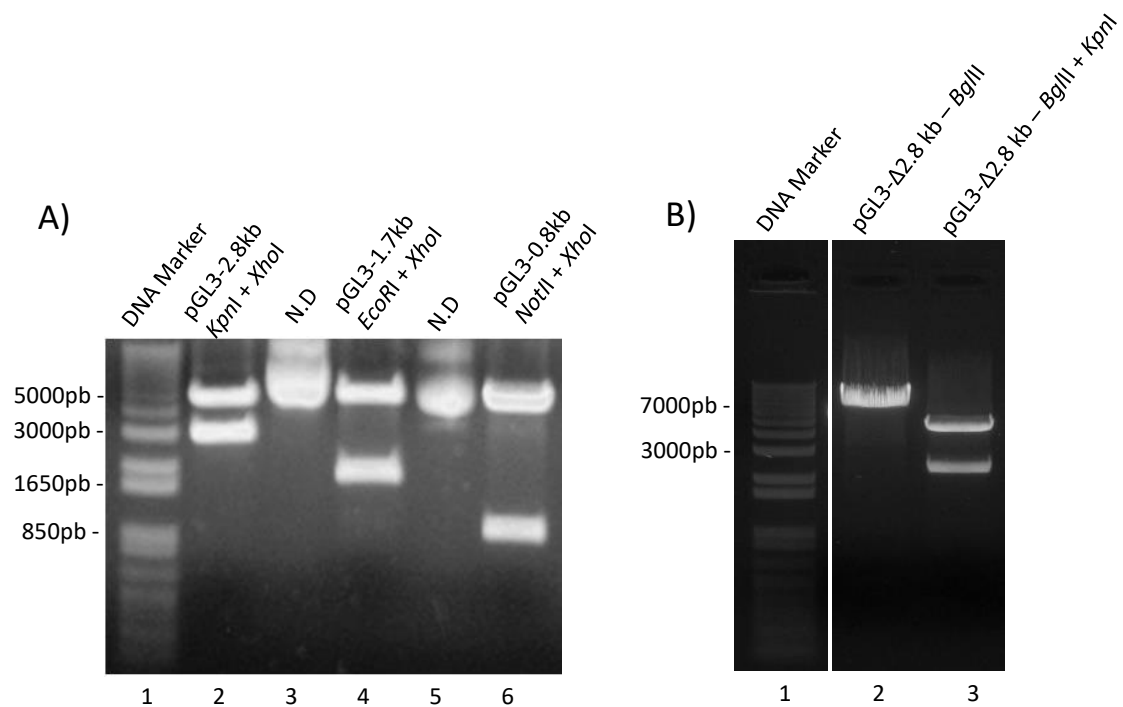


Figura 13: Análise da geração das construções pGL3-2.8 kb, pGL3-1.7 kb, pGL3-0.8 kb e pGL3-Δ492. Amostras provenientes de miniprep de cada plasmídeo foram digeridas e fracionadas para diagnóstico em gel de agarose 1% contendo brometo de étido. **A)** O plasmídeo pGL3-2.8 kb foi digerido com *XhoI* e *KpnI*, o pGL3-1.7 kb com *EcoRI* e *XhoI* e o pGL3-0.8 kb com *NotI* e *XhoI*, para liberação do inserto. Amostras não digeridas foram fracionadas como referência. **B)** O plasmídeo pGL3-Δ429 foi digerido com a enzima *BglII* para a linearização do plasmídeo ou sequencialmente com *BglII* e *KpnI* para a liberação do inserto. *DNA marker*: 1kb DNA ladder plus (Invitrogen).

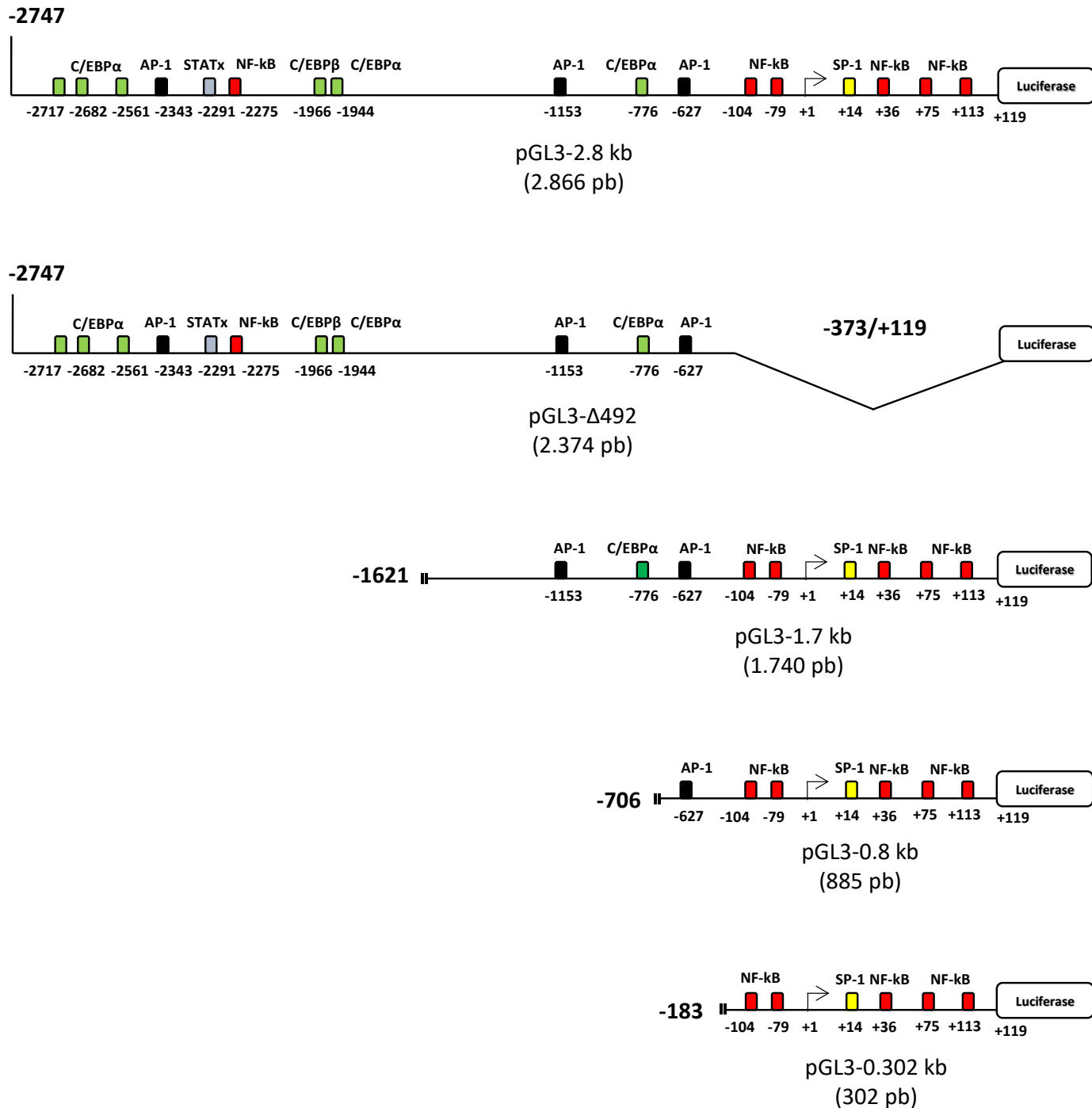


Figura 14: Representação esquemática das construções contendo parte da região promotora de *Rasgef1b*. Os segmentos da região promotora putativa de *Rasgef1b* foram clonados no repórter da luciferase, pGL3-Basic. Estão indicados na figura o tamanho (em pares de bases) dos segmentos clonados, a nomenclatura dada a cada construção, e a posição relativa do TSS putativo de *Rasgef1b* e dos principais sítios de ligação para fatores de transcrição associados à resposta imune identificados por análises *in silico* (TF-Search 1.3 e TFBIND).

5.5 Análise da atividade da região promotora putativa de *Rasgef1b*

Como descrito anteriormente, análises da região promotora putativa de *Rasgef1b* realizadas *in silico* mostram prováveis sítios para a ligação de fatores de transcrição ativados via TLRs, como AP-1 e NF- κ B, assim como outros fatores associados à resposta imune. Nesse sentido, com o intuito de se fornecer dados a respeito da regulação transcricional de *Rasgef1b*, decidimos investigar a atividade de parte da região promotora putativa do gene, sobretudo no contexto da resposta celular mediada por TLRs. Para isso, os repórteres gerados contendo segmentos da região promotora putativa de *Rasgef1b* foram transfectados por 24 horas em células HEK293 e a atividade de cada construção foi analisada através de ensaio de gene repórter. Para avaliar o efeito da ativação das vias de TLRs sobre a atividade dos segmentos, superexpressamos a molécula adaptadora Mal/TIRAP através de transfecção do plasmídeo pFLAG-Mal/TIRAP. A **figura 15** mostra a atividade basal (barras brancas) e induzida (barras pretas) de cada segmento, expressa em valores relativos de luciferase. Observa-se que as construções pGL3 2.8 kb, 1.7 kb, 0.8 kb e 0.302 kb apresentam uma atividade basal bastante elevada quando comparada ao vetor vazio (pGL3-Basic). Além disso, esses segmentos apresentam um aumento significativo em até duas vezes em sua atividade mediante ativação forçada das vias de TLRs pela superexpressão de Mal/TIRAP. Esse resultado sugere que a região analisada é induzível pela ativação da via MyD88-dependente de TLRs. É importante notar que o menor segmento, contendo apenas 302 nucleotídeos (pGL3-0.302), mas abrigando cinco sítios putativos para ligação a NF- κ B, apresenta a maior atividade, o que sugere que essa região possa ser suficiente para a expressão do gene. A construção pGL3- Δ 492 não apresenta qualquer atividade, o que é verificado pelos valores desprezíveis de luciferase. A ausência de atividade dessa construção se deve supostamente a perda de acesso da RNA polimerase II e de outros fatores gerais de transcrição sobre a sequência nucleotídica remanescente, visto que houve a deleção da região que abriga a ilha CpG, parte do primeiro éxon de *Rasgef1b*, e o TSS putativo. Esse resultado corrobora nossos dados obtidos através de análises *in silico*, sugerindo que essa região deve conter os elementos regulatórios críticos para controlar a transcrição do gene *Rasgef1b*.

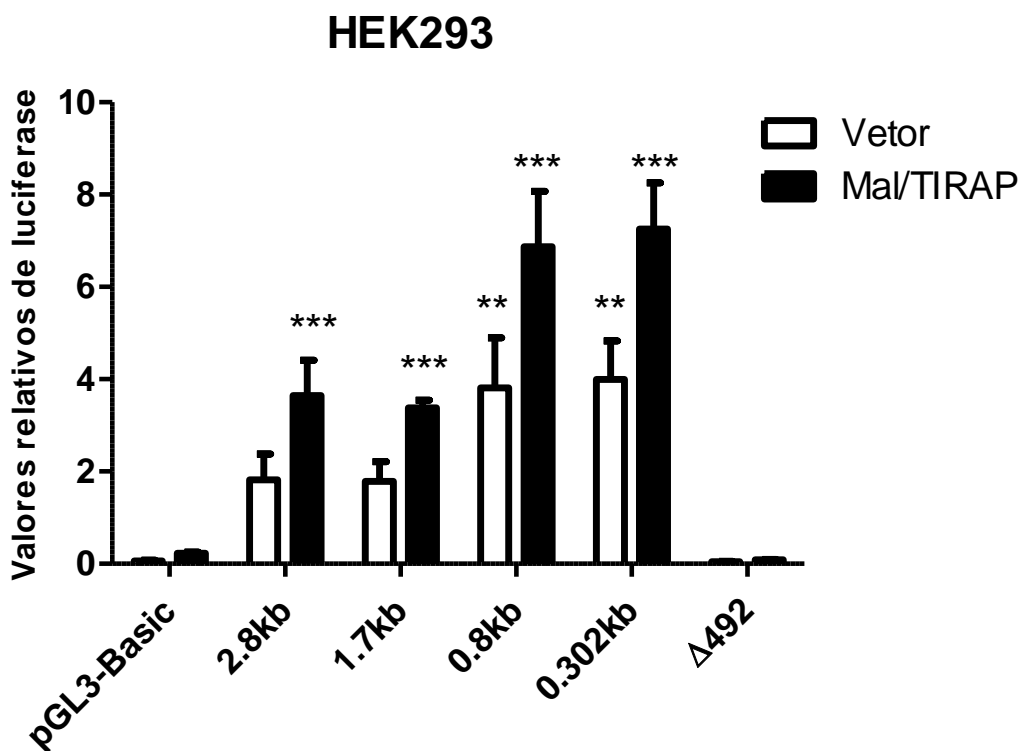


Figura 15: Ensaio de gene repórter - atividade constitutiva (vetor) e induzida por Mal/TIRAP dos repórteres da região promotora putativa de *Rasgef1b*. Células HEK293 eram plaqueadas em placas de 24 poços a 1×10^5 células/poço. As células eram transfectadas por 24 horas com 500 ng de pFLAG-Mal/TIRAP ou pFLAG-CMV4 (vetor), 400 ng dos repórteres e 100 ng de pRL-TK, utilizado como normalizador. A atividade de cada repórter é expressa em valores relativos obtidos pela razão luciferase/renilla (pRL-TK). Os experimentos eram realizados em duplicata e os valores são representativos de três experimentos independentes, expressos como média \pm D.P.; ** $p \leq 0,01$; em relação ao pGL3-Basic/vetor (One-way ANOVA/Bonferroni post tests); *** $p \leq 0,001$ em relação ao vetor (barras brancas) (Two-way ANOVA/Bonferroni post tests).

Os resultados descritos acima sugerem que, em células humanas HEK293, os segmentos da região promotora putativa de *Rasgef1b* possuem atividade constitutiva considerável e parecem ser induzidos mediante ativação de TLRs. Para confirmar esses dados e, adicionalmente, investigar a atividade da região promotora em células murinas e de função na resposta imune inata, macrófagos Raw264.7 foram transfectados com a construção pGL3-0.302 kb por 24 horas e então estimulados ou não com LPS (agonista de TLR4) durante 3, 6, 9, 12 ou 24 horas. Na **figura 16** observa-se que o segmento analisado apresenta uma atividade basal (NT) elevada também nesse tipo celular. Além disso, os valores relativos de luciferase aumentam progressivamente com o tempo de tratamento com LPS (**Figura 16a**), atingindo seu pico 24 horas após, onde a atividade do segmento analisado teve um aumento superior a 3 vezes em relação às células não-tratadas (**Figura 16b**). Esse resultado mostra que o segmento de 302 nucleotídeos da região regulatória de *Rasgef1b* é de fato responsivo à ativação de TLR4, corroborando os dados de ativação das vias de TLRs por Mal/TIRAP em células HEK. Ademais, esse resultado reforça a idéia de que o segmento de 302 pb parece ser suficiente para regular a expressão induzida de *Rasgef1b* na resposta imune inata mediada por TLRs.

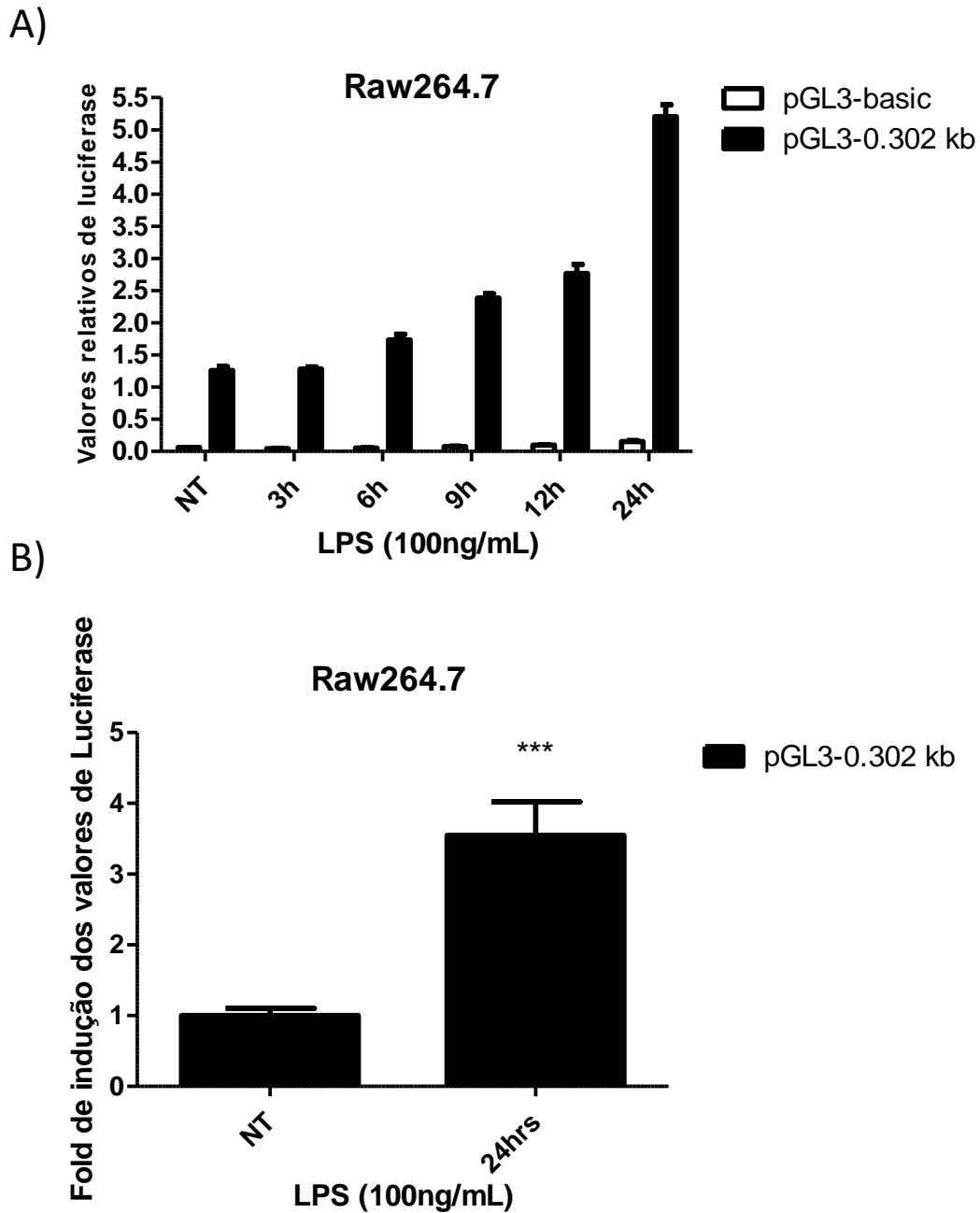


Figura 16: Análise da atividade do segmento de 0.302 kb em macrófagos Raw264.7 tratados ou não com LPS. Os macrófagos eram plaqueados em placas de 24 poços a 2×10^5 células/poço. As células eram transfectadas com 400 ng dos repórteres e 100 ng de pRL-TK, utilizado como normalizador. Após 24 horas, as células eram tratadas com 100 ng/mL de LPS durante os tempos indicados. **A)** Atividade relativa dos repórteres pGL3-302 kb e pGL3-Basic em diferentes tempos de tratamento com LPS. **B)** *Fold* de indução da atividade do segmento de 0.302 kb após 24 horas de tratamento com LPS (razão entre tratado e não-tratado). Os experimentos eram realizados em duplicata e os valores são representativos de dois experimentos independentes, expressos como média \pm D.P.; *** $p \leq 0,001$ em relação ao não-tratado (NT) (Two-way ANOVA/Bonferroni post tests).

O NF- κ B é um fator de transcrição crucial na regulação da resposta imune. Sua ativação ocorre através de diferentes estímulos, sobretudo pela ativação de TLRs (Hayden and Ghosh, 2012). Os segmentos investigados nesse trabalho abrigam vários elementos regulatórios para a ligação de membros da família NF- κ B, em sua maioria localizados nas adjacências do TSS putativo de *Rasgef1b*. Estes dados provenientes de análises *in silico*, juntamente com os dados experimentais obtidos através de ensaio de gene repórter, sugerem que os fatores de transcrição da família NF- κ B possam ser importantes moduladores da atividade da região promotora de *Rasgef1b*. Nesse sentido, decidimos investigar o efeito da ativação forçada de NF- κ B através da superexpressão das subunidades p65(RelA) ou c-Rel, sobre a atividade da região promotora putativa de *Rasgef1b*. Para isso, células HEK293 foram transfectadas ou não com os plasmídeos de expressão pFLAG-p65 ou pFLAG-c-Rel, e com os repórteres pGL3-0.302 kb ou pGL3-2.8 kb. A construção pGL3-0.302 kb abriga cinco elementos regulatórios para NF- κ B proximais ao TSS putativo, enquanto que o pGL3-2.8 kb abriga um sítio adicional na posição -2275. Na **Figura 17** observa-se que a atividade relativa dos segmentos tem um aumento significativo após a ativação forçada de NF- κ B. A superexpressão de c-Rel induziu um aumento de aproximadamente 3 vezes na atividade de ambos os segmentos, enquanto que a superexpressão de p65 induziu um aumento de superior a 4 vezes para o segmento de 302 pb, e próximo a 3 vezes para o segmento de 2.8 kb (**Figura 18**). De acordo com esse resultado, o sítio adicional presente no segmento de 2.8 kb parece não ser importante para o recrutamento do NF- κ B, ao passo que alguns dos elementos regulatórios proximais ao TSS muito provavelmente são funcionais. Esses dados corroboram a ideia de que fatores de transcrição da família NF- κ B podem se ligar à região promotora de *Rasgef1b* e desempenhar um papel na regulação transcricional desse gene.

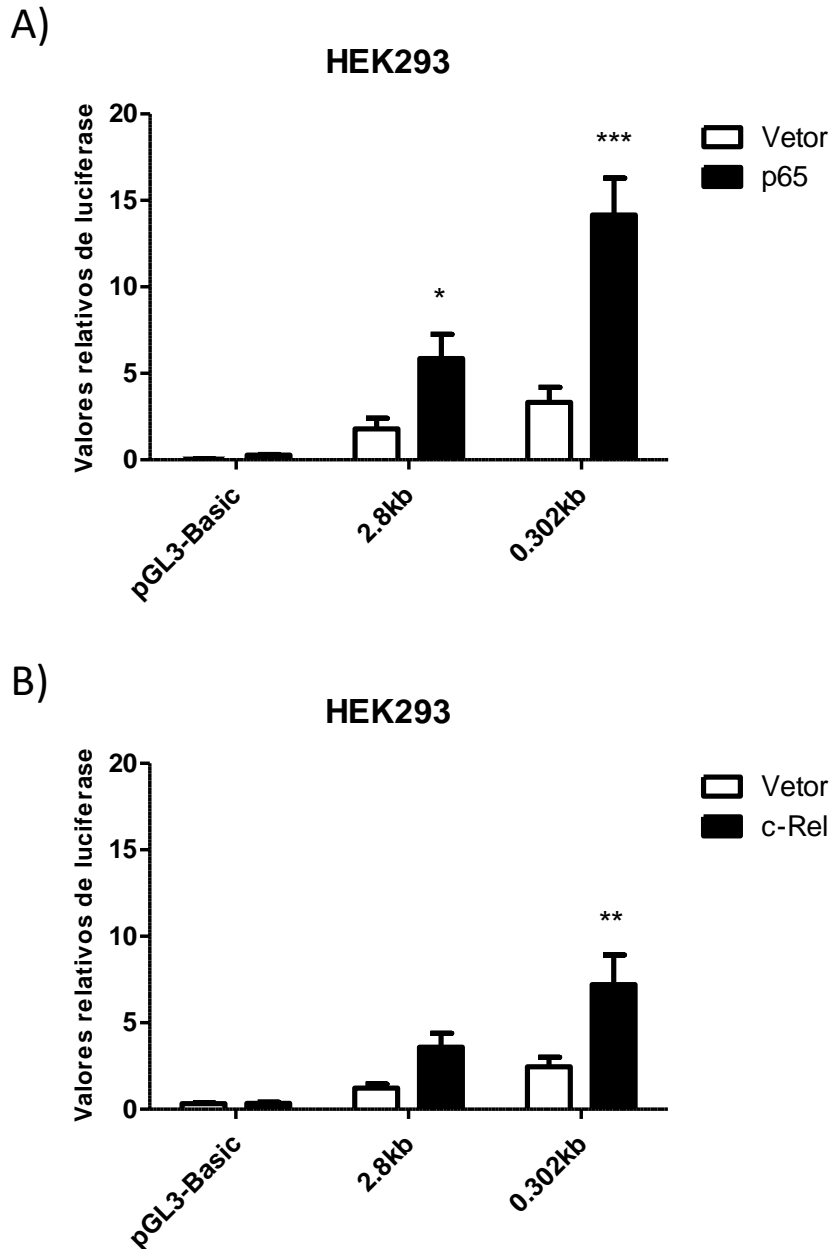


Figura 17: Ensaio de gene repórter - atividade constitutiva e induzida por p65 ou c-Rel, dos repórteres da região promotora putativa de *Rasgef1b*. Células HEK293 eram plaqueadas em placas de 24 poços a 1×10^5 células/poço. As células eram transfectadas por 24 horas com os plasmídeos de expressão pFLAG-p65 (500 ng) ou pFLAG-c-Rel (2,5 μ g), 400 ng dos repórteres e 100 ng de pRL-TK, utilizado como normalizador. O plasmídeo pFLAG-CMV4 (500 ng) era transfectado para manutenção da quantidade de DNA transfectado (vetor). A atividade de cada repórter é expressa em valores relativos obtidos pela razão luciferase/renilla (pRL-TK). Os experimentos eram realizados em duplicata e os valores são representativos de três experimentos independentes, expressos como média \pm D.P.; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ em relação ao vetor (Two-way ANOVA/Bonferroni post tests). **A)** Atividade constitutiva (vetor) e induzida pela superexpressão de p65 (RelA) dos repórteres pGL3-Basic, pGL3-2.8 kb e pGL3-0.302 kb. **B)** Atividade constitutiva (vetor) e induzida pela superexpressão de c-Rel dos repórteres pGL3-Basic, pGL3-2.8 kb e pGL3-0.302 kb.

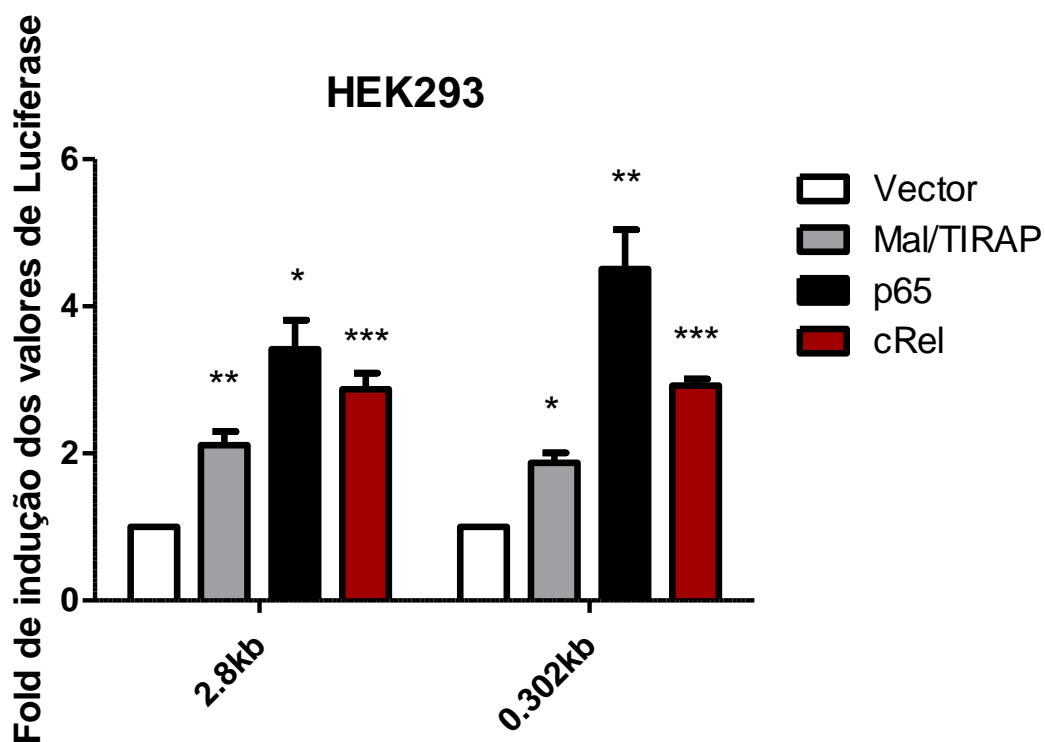


Figura 18: Análise comparativa do efeito da superexpressão de diferentes moléculas sob a atividade dos segmentos de 0.302 kb e 2.8 kb. A figura mostra comparativamente o *fold* de indução da atividade dos segmentos de 2.8 kb e 0.302 kb após a superexpressão de Mal/TIRAP, p65 ou c-Rel. Os experimentos eram realizados em duplicata e os valores são representativos de três experimentos independentes, expressos como média \pm D.P.; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ em relação ao vetor (barras brancas).

Para testar essa hipótese, foi realizado um experimento em que BMDMs murinos imortalizados do tipo selvagem (WT) ou deficientes de p65 (p65-KO) foram deixados sem tratamento ou tratados com LPS por diferentes intervalos de tempo. O RNA total foi obtido, transcrito reversamente à primeira fita de cDNA que foi utilizado como molde em reação de RT-qPCR. O resultado, embora preliminar, indica que após a estimulação com LPS os níveis do mRNA de RasGEF1b são elevados nos BMDMs WT, porém reduzidos nos BMDMs p65-KO, ao menos nos intervalos de tempo até 8 horas pós-estimulação (**Figura 19**). Esse dado sugere que p65 contribui parcialmente para a expressão de *Rasgef1b* em macrófagos estimulados com LPS, corroborando a idéia de que NF- κ B exerce um papel regulatório sobre a expressão desse gene. No entanto, é notável que em tempos tardios pós-estimulação, i.e 18h e 24h, os níveis do mRNA de RasGEF1b encontram-se mais elevados nas células p65-KO quando comparados com as WT.

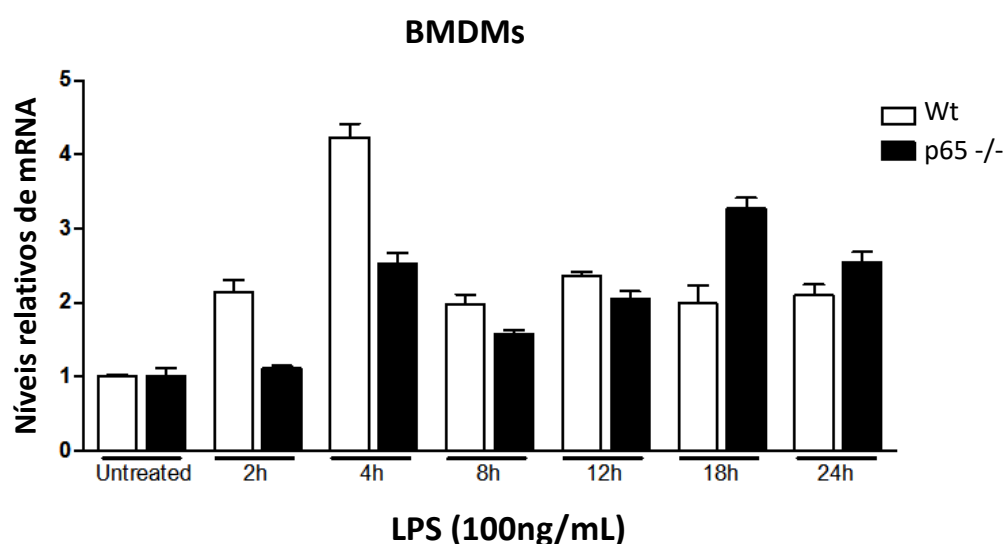


Figura 19: Análise dos níveis do mRNA de RasGEF1b em BMDMs WT e p65-/- tratados ou não com LPS. Os BMDMs WT e p65-KO eram plaqueados em placas de 6 poços a 2×10^6 células/poço e tratadas ou não (NT) com LPS a 100 ng/mL pelos tempos indicados. O cDNA era obtido a partir do RNA total e utilizado como molde em reações de RT-qPCR para a amplificação dos genes alvo e do gene referência (Rpl32) utilizado como normalizador. Os níveis relativos do mRNA foram calculados através da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Valores representativos de um único experimento realizado em triplicata técnica, expressos como média \pm D.P.

DISCUSSÃO

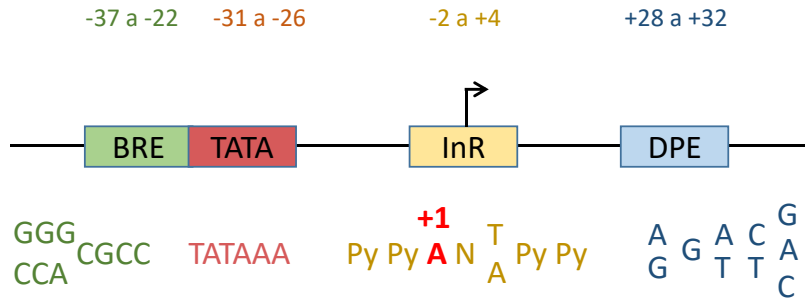
Por ser um GEF, a proteína RasGEF1b está supostamente envolvida, através da regulação da atividade de proteínas Ras, em processos celulares importantes, como na transdução de sinal, biossíntese de proteínas, regulação do citoesqueleto, transporte de vesículas, e no ciclo celular (Bos et al., 2007; Vigil et al., 2010). Sob a ótica imunológica, estudos mostram que os níveis do mRNA de RasGEF1b são robustamente elevados tanto *in vitro* em macrófagos murinos e humanos estimulados com agonistas de TLR2 e TLR4, quanto *in vivo* em órgãos de camundongos infectados com protozoários parasitas como *Trypanosoma cruzi* ou *Plasmodium chabaudi* (Andrade et al., 2010; Ferreira et al., 2002). Nossos estudos conduzidos em macrófagos murinos derivados de medula óssea tratados com LPS reproduzem esses resultados e fornecem dados adicionais sobre o perfil de expressão de RasGEF1a e RasGEF1c. Embora a expressão do mRNA de RasGEF1c seja induzida em níveis semelhantes ao mRNA de RasGEF1b, a **figura 6a** mostra claramente a maior abundância do transcrito de RasGEF1b nessas células. Esse resultado sugere que a expressão desse GEF é dominante em relação a RasGEF1c e RasGEF1a em BMDMs murinos, o que, em parte, justifica nossa escolha em conduzir estudos sobre esse membro da família RasGEF. Além disso, o resultado apresentado na **figura 6b** mostra que o mRNA de RasGEF1c é induzido em níveis semelhantes ao mRNA de RasGEF1b, ao passo que a transcrição de RasGEF1a é inibida em BDMDs murinos tratados com LPS. De acordo com análises *in silico* conduzidas através do programa Clustal Omega versão 1.2.1 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo), a sequência de aminoácidos da proteína RasGEF1b apresenta 59.96% de identidade com RasGEF1a e 66.09% de identidade com RasGEF1c. Embora essas proteínas apresentem um grau de conservação relativamente elevado entre si, com exceção do nosso resultado apresentado na **figura 6b**, não há qualquer outra evidência descrita na literatura que sugira um papel de RasGEF1c e RasGEF1a no contexto da resposta imune.

O promotor mínimo de um gene é definido como a sequência mínima de DNA onde atua a maquinaria de transcrição basal da RNA polimerase II para promover sua transcrição (Butler and Kadonaga, 2002). Tipicamente, essa região engloba o TSS e se estende por, pelo menos, aproximadamente 35 nucleotídeos a montante e a jusante (Smale, 2001). A transcrição eficiente de um gene requer a montagem da RNA polimerase associada a fatores gerais (ou basais) de transcrição (GTFs), que vão reconhecer e se ligar a motivos presentes na sequência do promotor mínimo. No presente trabalho realizamos

buscas na sequência de *Rasgef1b* pelos motivos de ligação a GTFs comumente encontrados em promotores eucarióticos. Esses motivos incluem o TATA box, o Inr (do inglês, *initiator*), BRE (do inglês, *TFIIB recognition element*), e DPE (do inglês, *downstream core promoter element*) (Butler e Kadonga 2002) (**Figura 20**).

Através de análises *in silico*, utilizando-se o programa TFBIND, encontramos alguns elementos TATA box na sequência de *Rasgef1b* murino. O mais proximal ao TSS localiza-se na posição -603/-589 da fita codificadora. No entanto, tipicamente um TATA box funcional localiza-se aproximadamente entre 25 a 30 nucleotídeos a montante do TSS (Butler and Kadonaga, 2002). Portanto, devido à sua posição, julgamos que o elemento TATA encontrado muito provavelmente não seja funcional. Elementos BRE são tipicamente encontrados imediatamente a montante do TATA box funcional (Lagrange et al., 1998). Uma vez que *Rasgef1b* parece não possuir um TATA box proximal ao TSS, não foi possível identificar um motivo BRE na sequência.

O InR é um elemento que inclui o TSS (+1) e se estende por poucos nucleotídeos a montante e a jusante (**Figura 20**) (Smale and Baltimore, 1989). Através de análise manual, julgamos que a transcrição de *Rasgef1b* muito provavelmente não depende de InR devido à discrepância entre a sequência nucleotídica circunvizinha ao TSS e a sequência consenso do elemento. Os promotores que abrigam um elemento DPE funcional, obrigatoriamente dependem também do elemento InR. A sequência consenso para o DPE deve se localizar exatamente na posição +28 a +32 em relação ao +1 do elemento InR (Kutach and Kadonaga, 2000). Como esperado, uma vez que o elemento InR parece não ser encontrado no promotor de *Rasgef1b*, também não identificamos o consenso de DPE na posição estimada.



Modificado de Butler & Kadonaga (2000)

Figura 20: Representação esquemática de elementos de ligação a GTFs comumente encontrados no promotor mínimo de genes eucarióticos. Estão representados os elementos mais comuns encontrados nessas regiões, a sequência consenso de cada elemento, assim como as variações possíveis, e sua posição relativa. Um promotor mínimo pode abrigar vários, todos, ou nenhum desses elementos. Quando presentes, esses elementos participam da transcrição via RNA polimerase II.

Embora, supostamente, a região circunvizinha ao TSS de *Rasgef1b* não abrigue os motivos de ligação a GTFs mencionados, sua sequência é rica em repetições de dinucleotídeos Citosina-Guanina. Regiões como essa são denominadas ilhas CpG, onde normalmente estão contidos os promotores mínimos de vários genes eucarióticos. Em mamíferos, por exemplo, estima-se que 40% dos promotores mínimos estejam contidos em regiões de ilha CpG (Fatemi et al., 2005; Larsen et al., 1992). Tipicamente, esses promotores não abrigam elementos comuns de ligação a GTFs, como o TATA box e DPE. No entanto, devido à sua natureza rica em repetições CG, é muito comum encontrar elementos de ligação ao fator de transcrição Sp1 nessas regiões (Butler and Kadonaga, 2002). Notavelmente, nossas análises *in silico* indicam que a região de ilha CpG encontrada na sequência de *Rasgef1b* abriga um sítio de Sp1 centralizado na posição +14 da fita codificadora, como mostrado na **Figura 12b**. De fato, dados da literatura mostram que Sp1 é capaz de ativar a transcrição em promotores ausentes de TATA box, desempenhando o papel de fator geral de transcrição através do recrutamento da maquinaria basal de transcrição (Butler and Kadonaga, 2002; Butta et al., 2006; Zhou et al., 2005). Em conjunto, nossas análises *in silico* sugerem que o promotor mínimo de *Rasgef1b* deve estar contido na região de ilha CpG descrita (do -281 ao +158) e que Sp1 pode ser importante para sua regulação. De fato, através de ensaio de gene repórter, fornecemos uma forte evidência que corrobora essa ideia. Como já descrito, a construção pGL3-Δ492 foi gerada a partir do pGL3-2.8 kb através da deleção de um segmento de 492 pares de bases (do -373 ao +119) que abrigava parte da ilha CpG, o primeiro éxon de

Rasgef1b, o TSS putativo e o elemento de ligação regulatório para a ligação de Sp1. O resultado apresentado na **figura 15** mostra que em células HEK293 transientemente transfectadas essa construção não apresenta qualquer atividade, sugerindo que a região deletada seja essencial para promover a transcrição do gene *Rasgef1b*.

O disparo das vias de sinalização de TLRs converge para a rápida ativação, não apenas dos fatores de transcrição da família NF- κ B, mas também do fator de transcrição AP-1 através da atividade das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs, do inglês *mitogen-activated protein kinases*) (Guha and Mackman, 2001). Através da utilização de ferramentas de bioinformática, identificamos na região regulatória investigada, pelo menos três elementos regulatórios putativos para a ligação de AP-1 e seis para NF- κ B. Ademais, nossos resultados obtidos através de ensaio de gene repórter mostram que a ativação das vias de sinalização de TLRs, através da superexpressão da molécula adaptadora Mal/TIRAP em células HEK293 ou da estimulação de macrófagos Raw264.7 com o agonista de TLR4 (LPS), leva a um aumento significativo da atividade do(s) segmento(s) da região promotora de *Rasgef1b* (**Figuras 15 e 16**). Esses resultados corroboram os dados descritos por Andrade et al. (2010), sugerindo que a ativação da via MyD88-dependente é importante para a indução da expressão de *Rasgef1b*. É importante notar que, a menor construção (pGL3-0.302 kb), abrigando cinco sítios putativos para a ligação de NF- κ B (**Figura 14**), apresentou a maior atividade (tanto constitutiva quanto induzida) em todos os ensaios de gene repórter realizados, e, portanto, parece ser suficiente para indução da transcrição de *Rasgef1b*. Com bases nesses dados, é razoável inferir que os fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B possam desempenhar um papel na regulação da atividade da região promotora desse gene.

Em relação ao fator de transcrição AP-1, embora o segmento de 0.302 kb (pGL3-0.302 kb) não abrigue nenhum sítio putativo para ligação desse fator (**Figura 14**), sua atividade induzida pela superexpressão de Mal/TIRAP é igual ou superior à atividade dos segmentos maiores, que abrigam um ou mais sítios (**Figura 15**). Esse resultado sugere que elementos para AP-1 presentes nos segmentos maiores parecem não ser funcionais. No entanto, é possível que o segmento de 0.302 kb abrigue outros elementos regulatórios para AP-1 potencialmente funcionais que não foram identificados pelos mecanismos de busca utilizados ou que foram desconsiderados em nossas análises devido ao seu *score* reduzido. Portanto, para se investigar um possível papel desse fator de transcrição na regulação da expressão de *Rasgef1b*, estudos subsequentes mais aprofundados são necessários.

As subunidades de NF- κ B investigadas nesse trabalho, p65 e c-Rel, formam homo ou heterodímeros tipicamente ativados através da via canônica de NF- κ B. A ativação dessa via pode ocorrer através de variados estímulos que são reconhecidos por diferentes receptores, entre eles, os TLRs. As cinco subunidades de NF- κ B podem se associar em mais de 12 dímeros diferentes. Cada dímero pode se ligar a motivos característicos no DNA e regular, de forma específica, seus promotores alvo. No entanto, grande parte dos promotores são regulados de forma redundante por dímeros distintos. Não se sabe ao certo se essa propriedade reflete uma simples redundância na ativação gênica, ou se faz parte de um contexto de regulação mais complexo (Saccani et al., 2003). Os dímeros formados pela subunidade p65, sobretudo com p50 (p65:p50), são os mais comumente descritos. Esses dímeros possuem a capacidade de regulação transcricional de uma ampla gama de genes (Hayden and Ghosh, 2004). Camundongos deficientes de p65 não sobrevivem à fase embrionária devido ao elevado grau de apoptose em hepatócitos, o que evidencia a importância dessa molécula na homeostase celular (Beg et al., 1995). A subunidade c-Rel, ao contrário de p65 que supostamente é ubíqua, parece ser constitutivamente expresso principalmente em monócitos maduros e em linhagens linfocitárias, enquanto que, em outros tipos celulares como fibroblastos, sua expressão requer estímulos variados (Grumont and Gerondakis, 1990; Liou et al., 1994). Dímeros que contém a subunidade c-Rel parecem desempenhar um papel mais restrito, sobretudo na resposta imune adaptativa. No entanto, esses fatores também são importantes e requeridos para a regulação de alguns promotores e para o funcionamento normal do organismo. Por exemplo, Sanjabi e colaboradores (2000) mostraram que c-Rel é necessário para a indução de IL-12-p40 em macrófagos (Sanjabi et al., 2000). Kontgen e colaboradores (1995) mostraram que camundongos deficientes de c-Rel, embora viáveis, apresentam problemas na proliferação de linfócitos e na imunidade humoral (Kontgen et al., 1995). Nossos estudos sugerem fortemente que o fator de transcrição NF- κ B desempenha um papel na regulação transcricional de *Rasgef1b*. De fato, como mostrado em nossos resultados, as subunidades p65 e c-Rel promovem um aumento na atividade do promotor de *Rasgef1b* (**Figura 17**). Além disso, a ausência de p65 em BMDMs sugere que esse fator contribui para a indução da expressão de *Rasgef1b* após ativação de TLR4 em tempos precoces (**Figura 19**). No entanto, em tempos mais tardios pós-estimulação com LPS, os níveis elevados do mRNA de RasGEF1b nos BMDMs p65-KO poderiam ser explicados pela atuação de outros fatores de transcrição tardiamente ativados ou ainda por um mecanismo compensatório mediado por dímeros de NF- κ B ausentes de p65,

formados, por exemplo, por c-Rel. Contudo, por se tratar de um dado preliminar, estudos mais aprofundados são necessários para se confirmar a identidade dos possíveis dímeros de NF- κ B que atuam sobre regulação desse gene.

O método de *footprinting* filogenético é utilizado para a identificação de regiões regulatórias funcionais no DNA baseando-se em análises da conservação entre sequências não-codificadoras de genes ortólogos (Blanchette and Tompa, 2002). Como mencionado no **tópico 5.2**, nossa análise de alinhamento por BLASTn mostra elevado grau de conservação entre as sequências nucleotídicas circunvizinhas ao TSS de *Rasgef1b* murino e humano (70% de identidade). Como mostrado na **figura 9**, essa região abriga cinco dos seis sítios putativos para a ligação de NF- κ B identificados na sequência promotora putativa de *Rasgef1b* murino. De acordo com o programa TFBIND e rVISTA, dois desses elementos (posições -79 e +75) encontram-se conservados na sequência ortóloga humana (posições +123 e +17). Ademais, parte dessa região alinhada por BLASTn é também evolutivamente conservada entre as sequências de diferentes espécies de mamíferos analisadas através do programa mVISTA. De acordo com o programa Rank VISTA, a conservação dessa região é estatisticamente significativa, com um valor de $p \leq 0,024$ para o alinhamento entre as sequências de camundongo e humano. Isso significa que a probabilidade de uma sequência qualquer apresentar o grau de identidade verificado com uma outra sequência que evolui independentemente, por mero acaso, é menor que $2,4 \times 10^{-2}$. Portanto, nossas análises *in silico* não só corroboram a ideia de que a família dos fatores de transcrição NF- κ B atuam na regulação da atividade da região promotora de *Rasgef1b*, mas também suportam a observação de que a região proximal ao TSS é essencial nesse contexto.

As deleções realizadas a partir da construção pGL3-2.8 kb resultaram em segmentos que abrigam um conjunto de possíveis elementos regulatórios distintos entre si. Certamente, mesmo na ausência de um estímulo ou ativação forçada pela expressão de um fator de transcrição, é esperado que se observe diferença entre as atividades dos segmentos devido à combinação de componentes moleculares distintos que podem atuar sobre cada um, implicando em uma regulação conjunta diferencial. De fato, isso parece ocorrer em nossos resultados. De um modo geral, observa-se que a atividade relativa dos segmentos menores - 0.302 kb e 0.8 kb - é maior que atividade relativa dos segmentos maiores (1.7 kb e 2.8 kb). Essa diferença de atividade pode ser explicada, por exemplo, pela presença, nos segmentos maiores, de sítios putativos para reguladores negativos da transcrição constitutivamente expressos. Observa-se, por exemplo, que as construções

pGL3-2.8 kb e pGL3-1.7 kb abrigam elementos regulatórios putativos para a ligação do fator de transcrição C/EBP que não estão presentes nas construções pGL3-0.8 kb e pGL3-0.302 kb (**Figura 14**). A família C/EBP contém 6 membros (C/EBP α , β , γ , δ , ϵ , ζ), que podem ser expressos constitutivamente em diferentes tipos celulares, e que em conjunto desempenham funções variadas no organismo, atuando desde a regulação de genes associados a processos básicos como o controle do ciclo celular, até na imunidade (Lekstrom-Himes, 1998; Mikita et al., 1998; Udofa et al., 2013)). Esses fatores podem atuar tanto como ativadores ou repressores da transcrição, dependendo do promotor em que ligam (Kandel 2002). Como mostrado por Sachdeva e colaboradores (2012), C/EBP β pode atuar como um regulador negativo da expressão do miRNA-145 em células humanas. Adicionalmente, (Ralph et al., 2006; Wang et al., 1996) mostraram que C/EBP β se liga à região promotora e reprime a expressão do gene humano HPV11. Em vista desses dados, é razoável considerar que, além de C/EBP, outros fatores de transcrição constitutivamente expressos podem estar atuando na diminuição da atividade relativa dos segmentos de 2.8 kb e 1.7 kb. No entanto, estudos mais aprofundados são necessários para se esclarecer essa questão.

Finalmente, nossos dados de *nested* RT-PCR mostram que o nucleotídeo indicado como o início da transcrição de *Rasgef1b* faz parte do mRNA desse gene. No entanto, esses dados em si não confirmam se o nucleotídeo indicado é, de fato, o primeiro nucleotídeo transcrito do gene. Atualmente, o padrão ouro utilizado para se responder essa questão são os ensaios de RACE (do inglês, *Rapid amplification of cDNA ends*). Embora julguemos necessário fornecer essa evidência, há de se considerar que o início da transcrição de *Rasgef1b* pode ocorrer em diferentes pontos ao longo do promotor mínimo, uma vez que essa é uma característica comum de genes que não possuem TATA e cuja transcrição basal é regulada por Sp1, como parece ser o caso de *Rasgef1b* (Butler and Kadonaga, 2002).

CONCLUSÕES

Com base no conjunto de dados apresentados nesse trabalho, concluímos que:

- 1- A expressão do mRNA de RasGEF1b em BMDMs murinos é dominante em relação à RasGEF1a e RasGEF1c.
- 2- A expressão do mRNA de RasGEF1c também é induzida assim como RasGEF1b, enquanto que RasGEF1a é reprimido em BMDMs murinos após tratamento com LPS.
- 3- A região regulatória a montante da sequência codificadora de *Rasgef1b* murino abriga elementos regulatórios putativos para a ligação de fatores de transcrição associados à resposta imune e parte dela é evolutivamente conservada entre diferentes espécies de mamíferos.
- 4- A região circunvizinha ao TSS putativo de *Rasgef1b* abriga uma ilha CpG que contém o promotor mínimo de *Rasgef1b*, sendo necessária para a ativação transcricional do gene.
- 5- O nucleotídeo +1 indicado através de análises *in silico* como o TSS de *Rasgef1b* de fato está presente no transcrito desse gene.
- 6- A região genômica investigada no presente trabalho faz parte da região promotora de *Rasgef1b*. À exceção do segmento desprovido da região circunvizinha ao TSS, todos os segmentos investigados apresentam uma atividade constitutiva intrínseca e induzível mediante ativação das vias de sinalização de TLRs.
- 7- A expressão forçada das subunidades de NF- κ B, p65 e c-Rel, induz a um aumento da atividade da região promotora de *Rasgef1b* em células HEK293.
- 8- A subunidade NF- κ B/p65 parece desempenhar um papel importante na regulação transcricional de *Rasgef1b*.

O presente trabalho fornece um conjunto de dados inéditos que contribuem para a compreensão da regulação transcricional de *Rasgef1b*, da região genômica envolvida nessa função, e dos prováveis componentes moleculares que atuam sobre ela, fornecendo subsídios para estudos futuros mais aprofundados sobre os mecanismos moleculares que modulam a expressão desse gene.

REFERÊNCIAS

- Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology* 2, 675-680.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- Albiger, B., Dahlberg, S., Henriques-Normark, B., and Normark, S. (2007). Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *Journal of internal medicine* 261, 511-528.
- Anderson, K.V., Bokla, L., and Nusslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42, 791-798.
- Andrade, W.A., Silva, A.M., Alves, V.S., Salgado, A.P., Melo, M.B., Andrade, H.M., Dall'Orto, F.V., Garcia, S.A., Silveira, T.N., and Gazzinelli, R.T. (2010). Early endosome localization and activity of RasGEF1b, a toll-like receptor-inducible Ras guanine-nucleotide exchange factor. *Genes and immunity* 11, 447-457.
- Anwar, M.A., Basith, S., and Choi, S. (2013). Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling. *Exp Mol Med* 45, e11.
- Arigoni, M., Bracco, E., Lusche, D.F., Kae, H., Weeks, G., and Bozzaro, S. (2005). A novel *Dictyostelium* RasGEF required for chemotaxis and development. *BMC Cell Biol* 6, 43.
- Baker, R.G., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2011). NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab* 13, 11-22.
- Bar-Sagi, D., and Feramisco, J.R. (1985). Microinjection of the ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. *Cell* 42, 841-848.
- Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T., Ghosh, S., and Baltimore, D. (1995). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 376, 167-170.
- Blanchette, M., and Tompa, M. (2002). Discovery of regulatory elements by a computational method for phylogenetic footprinting. *Genome Res* 12, 739-748.
- Boguski, M.S., and McCormick, F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366, 643-654.
- Bonizzi, G., and Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in immunology* 25, 280-288.
- Bos, J.L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865-877.

- Bowtell, D., Fu, P., Simon, M., and Senior, P. (1992). Identification of murine homologues of the *Drosophila* son of sevenless gene: potential activators of ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6511-6515.
- Broek, D., Toda, T., Michaeli, T., Levin, L., Birchmeier, C., Zoller, M., Powers, S., and Wigler, M. (1987). The *S. cerevisiae* CDC25 gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway. *Cell* 48, 789-799.
- Butler, J.E., and Kadonaga, J.T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes & development* 16, 2583-2592.
- Butta, N., Larrucea, S., Alonso, S., Rodriguez, R.B., Arias-Salgado, E.G., Ayuso, M.S., Gonzalez-Manchon, C., and Parrilla, R. (2006). Role of transcription factor Sp1 and CpG methylation on the regulation of the human podocalyxin gene promoter. *BMC Mol Biol* 7, 17.
- Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clark, G.J., and Der, C.J. (1998). Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17, 1395-1413.
- Chen, Y., Zhang, X.M., Han, F.M., Du, P., and Xia, Q.S. (2007). Gene expression profile analyses of mice livers injured by Leigongteng. *World J Gastroenterol* 13, 3619-3624.
- Cherfils, J., and Zeghouf, M. (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev* 93, 269-309.
- Coleman, M.L., Marshall, C.J., and Olson, M.F. (2004). RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 355-366.
- Dempsey, P.W., Vaidya, S.A., and Cheng, G. (2003). The art of war: Innate and adaptive immune responses. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 60, 2604-2621.
- Downward, J., Riehl, R., Wu, L., and Weinberg, R.A. (1990). Identification of a nucleotide exchange-promoting activity for p21ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5998-6002.
- Doyle, S.L., and O'Neill, L.A. (2006). Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol* 72, 1102-1113.
- Epting, D., Vorwerk, S., Hageman, A., and Meyer, D. (2007). Expression of rasgef1b in zebrafish. *Gene expression patterns : GEP* 7, 389-395.
- Farnsworth, C.L., Freshney, N.W., Rosen, L.B., Ghosh, A., Greenberg, M.E., and Feig, L.A. (1995). Calcium activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF. *Nature* 376, 524-527.
- Fatemi, M., Pao, M.M., Jeong, S., Gal-Yam, E.N., Egger, G., Weisenberger, D.J., and Jones, P.A. (2005). Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level. *Nucleic Acids Res* 33, e176.
- Ferreira, L.R., Abrantes, E.F., Rodrigues, C.V., Caetano, B., Cerqueira, G.C., Salim, A.C., Reis, L.F., and Gazzinelli, R.T. (2002). Identification and characterization of a novel mouse gene encoding

- a Ras-associated guanine nucleotide exchange factor: expression in macrophages and myocarditis elicited by *Trypanosoma cruzi* parasites. *J Leukoc Biol* 72, 1215-1227.
- Fleming, I.N., Elliott, C.M., Buchanan, F.G., Downes, C.P., and Exton, J.H. (1999). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates Tiam1 by reversible protein phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 274, 12753-12758.
- Gerondakis, S., Grossmann, M., Nakamura, Y., Pohl, T., and Grumont, R. (1999). Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts. *Oncogene* 18, 6888-6895.
- Ghosh, S., and Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl, S81-96.
- Grossmann, M., Metcalf, D., Merryfull, J., Beg, A., Baltimore, D., and Gerondakis, S. (1999). The combined absence of the transcription factors Rel and RelA leads to multiple hemopoietic cell defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11848-11853.
- Grumont, R.J., and Gerondakis, S. (1990). Murine c-rel transcription is rapidly induced in T-cells and fibroblasts by mitogenic agents and the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cell Growth Differ* 1, 345-350.
- Guha, M., and Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular signalling* 13, 85-94.
- Gulbins, E., Coggeshall, K.M., Langlet, C., Baier, G., Bonnefoy-Berard, N., Burn, P., Wittinghofer, A., Katzav, S., and Altman, A. (1994). Activation of Ras in vitro and in intact fibroblasts by the Vav guanine nucleotide exchange protein. *Mol Cell Biol* 14, 906-913.
- Hatada, E.N., Nieters, A., Wulczyn, F.G., Naumann, M., Meyer, R., Nucifora, G., McKeithan, T.W., and Scheidereit, C. (1992). The ankyrin repeat domains of the NF-kappa B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF-kappa B DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2489-2493.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes & development* 18, 2195-2224.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2012). NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & development* 26, 203-234.
- Hoffmann, A., Leung, T.H., and Baltimore, D. (2003). Genetic analysis of NF-kappaB/Rel transcription factors defines functional specificities. *The EMBO journal* 22, 5530-5539.
- Huxford, T., Huang, D.B., Malek, S., and Ghosh, G. (1998). The crystal structure of the IkappaBalpha/NF-kappaB complex reveals mechanisms of NF-kappaB inactivation. *Cell* 95, 759-770.
- Jacobs, M.D., and Harrison, S.C. (1998). Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell* 95, 749-758.

- Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology* *20*, 197-216.
- Jareborg, N., Birney, E., and Durbin, R. (1999). Comparative analysis of noncoding regions of 77 orthologous mouse and human gene pairs. *Genome Res* *9*, 815-824.
- Kahana, J.A., and Cleveland, D.W. (1999). Beyond nuclear transport. Ran-GTP as a determinant of spindle assembly. *J Cell Biol* *146*, 1205-1210.
- Kanzler, H., Barrat, F.J., Hessel, E.M., and Coffman, R.L. (2007). Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* *13*, 552-559.
- Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annual review of immunology* *18*, 621-663.
- Kauffmann-Zeh, A., Rodriguez-Viciana, P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffey, P., Downward, J., and Evan, G. (1997). Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* *385*, 544-548.
- Kawai, T., and Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell death and differentiation* *13*, 816-825.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* *11*, 373-384.
- Kawasaki, T., and Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* *5*, 461.
- Kontgen, F., Grumont, R.J., Strasser, A., Metcalf, D., Li, R., Tarlinton, D., and Gerondakis, S. (1995). Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes & development* *9*, 1965-1977.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* *30*, 16-34.
- Kutach, A.K., and Kadonaga, J.T. (2000). The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in Drosophila core promoters. *Mol Cell Biol* *20*, 4754-4764.
- Lagrange, T., Kapanidis, A.N., Tang, H., Reinberg, D., and Ebricht, R.H. (1998). New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes & development* *12*, 34-44.
- Larsen, F., Gundersen, G., Lopez, R., and Prydz, H. (1992). CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* *13*, 1095-1107.
- Lekstrom-Himes, J. (1998). Biological Role of the CCAAT/Enhancer-binding Protein Family of Transcription Factors. *Journal of Biological Chemistry* *273*, 28545-28548.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* *86*, 973-983.

- Lemmon, M.A., Ferguson, K.M., and Schlessinger, J. (1996). PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* 85, 621-624.
- Lima, K.M. (2012). Análise dos níveis proteicos de RasGEF1b e do seu papel sobre a regulação da ativação de NF-kappaB em macrófagos estimulados com agonistas de receptores do tipo Toll (TLRs). (Universidade Federal de Minas Gerais).
- Liou, H.C., Sha, W.C., Scott, M.L., and Baltimore, D. (1994). Sequential induction of NF-kappa B/Rel family proteins during B-cell terminal differentiation. *Mol Cell Biol* 14, 5349-5359.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lu, Y.C., Yeh, W.C., and Ohashi, P.S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145-151.
- Malek, S., Huang, D.B., Huxford, T., Ghosh, S., and Ghosh, G. (2003). X-ray crystal structure of an I-kappaBbeta x NF-kappaB p65 homodimer complex. *The Journal of biological chemistry* 278, 23094-23100.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Mifsud, E.J., Tan, A.C., and Jackson, D.C. (2014). TLR Agonists as Modulators of the Innate Immune Response and Their Potential as Agents Against Infectious Disease. *Front Immunol* 5, 79.
- Mikita, T., Kurama, M., and Schindler, U. (1998). Synergistic activation of the germline epsilon promoter mediated by Stat6 and C/EBP beta. *J Immunol* 161, 1822-1828.
- Novick, P., Field, C., and Schekman, R. (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21, 205-215.
- O'Neill, L.A., and Bowie, A.G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 7, 353-364.
- Quilliam, L.A., Khosravi-Far, R., Huff, S.Y., and Der, C.J. (1995). Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins. *Bioessays* 17, 395-404.
- Quilliam, L.A., Rebhun, J.F., and Castro, A.F. (2002). A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of Ras-family GTPases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 71, 391-444.
- Raetz, M., Kibardin, A., Sturge, C.R., Pifer, R., Li, H., Burstein, E., Ozato, K., Larin, S., and Yarovinsky, F. (2015). Cooperation of TLR12 and TLR11 in the IRF8-dependent IL-12 response to *Toxoplasma gondii* profilin. *J Immunol* 191, 4818-4827.
- Ralph, W.M., Jr., Liu, K., and Auborn, K.J. (2006). CCAAT/enhancer-binding protein beta represses human papillomavirus 11 upstream regulatory region expression through a promoter-proximal YY1-binding site. *J Gen Virol* 87, 51-59.

- Repasky, G.A., Chenette, E.J., and Der, C.J. (2004). Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol* *14*, 639-647.
- Ridley, A.J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* *70*, 389-399.
- Robinson, L.C., Gibbs, J.B., Marshall, M.S., Sigal, I.S., and Tatchell, K. (1987). CDC25: a component of the RAS-adenylate cyclase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* *235*, 1218-1221.
- Rocha, C.D. (2014). Análise dos efeitos de RasGEF1B sobre a regulação negativa de NF-kappaB. *Manuscrito em preparação*.
- Rothwarf, D.M., and Karin, M. (1999). The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE* *1999*, RE1.
- Saccani, S., Pantano, S., and Natoli, G. (2003). Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers. *Mol Cell* *11*, 1563-1574.
- Sanjabi, S., Hoffmann, A., Liou, H.C., Baltimore, D., and Smale, S.T. (2000). Selective requirement for c-Rel during IL-12 P40 gene induction in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 12705-12710.
- Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* *46*, 705-716.
- Servitja, J.M., Marinissen, M.J., Sodhi, A., Bustelo, X.R., and Gutkind, J.S. (2003). Rac1 function is required for Src-induced transformation. Evidence of a role for Tiam1 and Vav2 in Rac activation by Src. *The Journal of biological chemistry* *278*, 34339-34346.
- Shou, C., Farnsworth, C.L., Neel, B.G., and Feig, L.A. (1992). Molecular cloning of cDNAs encoding a guanine-nucleotide-releasing factor for Ras p21. *Nature* *358*, 351-354.
- Simon, M.A., Bowtell, D.D., Dodson, G.S., Lavery, T.R., and Rubin, G.M. (1991). Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* *67*, 701-716.
- Smale, S.T. (2001). Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes & development* *15*, 2503-2508.
- Smale, S.T., and Baltimore, D. (1989). The "initiator" as a transcription control element. *Cell* *57*, 103-113.
- Sun, S.C. (2011). Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Res* *21*, 71-85.
- Takagi, M. (2011). Toll-like receptor--a potent driving force behind rheumatoid arthritis. *J Clin Exp Hematop* *51*, 77-92.
- Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* *81*, 153-208.

- Udofa, E.A., Stringer, B.W., Gade, P., Mahony, D., Buzza, M.S., Kalvakolanu, D.V., and Antalis, T.M. (2013). The Transcription Factor C/EBP- β Mediates Constitutive and LPS-Inducible Transcription of Murine SerpinB2. *PLoS one* 8.
- Vallabhapurapu, S., and Karin, M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology* 27, 693-733.
- Valverde, T.M. (2011). RasGEF1b: localização celular de seus domínios e papel regulador negativo sobre ativação de NF-kappaB (Universidade Federal de Minas Gerais).
- van Dam, T.J., Bos, J.L., and Snel, B. Evolution of the Ras-like small GTPases and their regulators. *Small GTPases* 2, 4-16.
- van Kuppeveld, F.J., Johansson, K.E., Galama, J.M., Kissing, J., Bolske, G., van der Logt, J.T., and Melchers, W.J. (1994). Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR. *Appl Environ Microbiol* 60, 149-152.
- Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K.L., and Der, C.J. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* 10, 842-857.
- Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* 10, 842-857.
- Wang, H., Liu, K., Yuan, F., Berdichevsky, L., Taichman, L.B., and Auborn, K. (1996). C/EBPbeta is a negative regulator of human papillomavirus type 11 in keratinocytes. *J Virol* 70, 4839-4844.
- Wang, V.Y., Huang, W., Asagiri, M., Spann, N., Hoffmann, A., Glass, C., and Ghosh, G. (2012). The transcriptional specificity of NF-kappaB dimers is coded within the kappaB DNA response elements. *Cell reports* 2, 824-839.
- Wang, Y., Liu, L., Davies, D.R., and Segal, D.M. (2010). Dimerization of Toll-like receptor 3 (TLR3) is required for ligand binding. *The Journal of biological chemistry* 285, 36836-36841.
- Whitman, M., and Melton, D.A. (1992). Involvement of p21ras in *Xenopus* mesoderm induction. *Nature* 357, 252-254.
- Wilkins, A., and Insall, R.H. (2001). Small GTPases in *Dictyostelium*: lessons from a social amoeba. *Trends Genet* 17, 41-48.
- Wolfman, A., and Macara, I.G. (1990). A cytosolic protein catalyzes the release of GDP from p21ras. *Science* 248, 67-69.
- Zheng, Y., and Quilliam, L.A. (2003). Activation of the Ras superfamily of small GTPases. *Workshop on exchange factors. EMBO Rep* 4, 463-468.
- Zhou, J., Fan, C., Zhong, Y., Liu, Y., Liu, M., Zhou, A., Ren, K., and Zhang, J. (2005). Genomic organization, promoter characterization and roles of Sp1 and AP-2 in the basal transcription of mouse PDIP1 gene. *FEBS Lett* 579, 1715-1722.

ENDEREÇOS ELETRÔNICOS

TFsearch

www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html

TFBIND

<http://tfbind.hgc.jp/>

T.Tsunoda, and T.Takagi.

Estimating Transcription Factor Bindability on DNA.

BIOINFORMATICS, Vol.15, No.7/8, pp.622-630, 1999.

rVISTA

<http://genome.lbl.gov/vista/rvista/submit.shtm>

Loots, G., Ovcharenko, I., Pachter, L., Dubchak, I., Rubin, E. rVISTA for comparative sequence-based discovery of functional transcription factor binding sites. (2002) Genome. Res. 12:832-839

mVISTA

<http://genome.lbl.gov/vista/mvista/submit.shtml>

Frazer KA, Pachter L, Poliakov A, Rubin EM, Dubchak I. VISTA: computational tools for comparative genomics. Nucleic Acids Res. 2004 Jul 1;32(Web Server issue):W273-9

Mayor C., Brudno M., Schwartz J. R., Poliakov A., Rubin E. M., Frazer K. A., Pachter L. S. and Dubchak I. (2000) VISTA: Visualizing Global DNA Sequence Alignments of Arbitrary Length. Bioinformatics, 16:1046

MethPrimer

<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>

Li LC and Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. Bioinformatics. 2002 Nov;18(11):1427-31. PMID: 12424112.

EMBOSS-Cpgplot

http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpgplot/

EMBOSS-Newcpgreport

http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_newcpgreport/

EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000)

Rice, P. Longden, I. and Bleasby, A.

Trends in Genetics 16, (6) pp276—277

BLASTn

<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410. [PubMed](#)

UniProtKB

<http://www.uniprot.org>

UniProt: a hub for protein information
Nucleic Acids Res. 43: D204-D212 (2015).

Clustal Omega versão 1.2.1

www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo

Sievers F, Wilm A, Dineen DG, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* 7:539
doi:10.1038/msb.2011.75