

Modulação da atividade biológica do Fator de Necrose Tumoral (TNF) por *Tsg-5*

Elaine Pereira Guimarães

Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Luiz Fernando Lima Reis

NÃO CIRCULA

São Paulo
2002

FUNDAÇÃO ANTONIO
PRUDENTE
BIBLIOTECA

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Guimarães, Elaine Pereira.

**Modulação da atividade biológica do Fator de Necrose Tumoral (TNF)
por *Tsg-5* / Elaine Pereira Guimarães -- São Paulo, 2002.**

60p.

Dissertação(mestrado)—Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Luiz Fernando Lima Reis

Descritores: 1. REGULAÇÃO DE EXPRESSÃO GENÉTICA/imunologia. 2.
FATOR DE NECROSE TUMORAL/genética. 3. APOPTOSE. 4. FATORES DE
TRANSCRIÇÃO/imunologia.

Agradecimentos

À Deus,

Pela vida

Ao orientador,

Ao Luís Fernando pela oportunidade de fazer parte do seu grupo. Pelas palavras confortantes nas horas em que precisei, pelos desabafos, pelas lágrimas, e por todo apoio nos momentos mais difíceis. Pela pessoa maravilhosa que é, obrigada por tudo e sucessos.

À meus pais,

Agradeço à meus queridos pais por terem sempre acreditado em mim. Obrigada por vocês, que mesmo distantes, souberam aliviar minhas dores, apoiar minhas decisões. E foram incondicionalmente PAIS. Obrigada por tudo que deixaram pra trás nesses anos todos, para engrandecer a mim e a meus irmãos. Agradeço também pelos valores que me

foram passados e que fizeram de mim quem sou. Amo muito vocês!!

Aos meus irmãos,

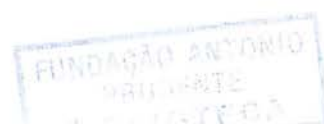
Dy e Dú, que sempre estiveram ao meu lado e compartilharam dos momentos de alegrias e tristezas. Um grande abraço cheio de saudades.

Ao meu amor,

Ao Peterson pelo seu amor e amizade, por seu conforto nas horas que precisei, pelas lágrimas que enxugou e pelos sorrisos que me fez sorrir. Por tentar entender coisas que, às vezes, nem eu sabia explicar. Pelas vezes em que se calou e pelas vezes em que falou o que era certo. Obrigada por me ajudar a cruzar mais uma etapa da minha vida, e por fazer parte dela. Te amo muito!!

Aos amigos do laboratório,

Como não falar de cada um. Fazer parte deste grupo foi um grande prazer.



Sibelinha, que desde que cheguei me estendeu a mão me recebendo em sua casa, sempre amiga. Sem contar seus bolos...

Bia, umas das poucas paulistas do grupo, muito justa e querida, sempre nos levando a todos os lugares..., amiga de todas as horas.

Lú, a última mineirinha a entrar no grupo, sempre disposta a te ouvir e, como toda "Inacinha" deve ser, muito acolhedora.

Abrantes, talvez um dos que mais merece meus agradecimentos, pela ajuda no trabalho, pela paciência, pelas vezes que fez do meu o seu trabalho. Obrigada.

Adriana, a que vive fazendo canções pra você, sempre preocupada com todos, e sempre muito ocupada também. Agradeço pela sua amizade e ensinamentos.

Susana, pelo ombro amigo oferecido por muitas vezes e pela amizade curta mas sincera. Obrigada.

Regininha, pelo empenho em meus experimentos e pela amizade oferecida. Obrigada.

Gustavo, um matemático fora do ninho, mas biólogo nas horas vagas. Abraços.

Franco, que fofo, sempre com suas balinhas. Obrigada pelo carinho.

Alex, irmãozinho de aniversário, sempre na dele mas pronto pra te atender. Obrigada pelas mãozinhas.

Waleska, quem me acolheu num momento difícil e sempre me auxiliou em minhas buscas. Grata por tudo.

Ricardinho, sempre me perguntando quando iria defender. Chegou a hora! Obrigada pelo apoio e encorajamento.

Lara, o cão doido, mal chegou ao laboratório e já tomou conta da minha bancada. Vou sentir saudades.

Ana Lepique, um furacão que passou por aqui, um pouco mãezona, uma lição de profissinalismo. A ela meu muito obrigada pelos ensinamentos, persistência e pela amizade acolhedora.

Chamberlein, um convívio mais distante, mas sempre com um sorriso. Obrigada.

Gisele, sempre pronta pra nos atender.
Obrigada pelas canções.

Rosi Roela, mesmo não sendo uma componente do grupo, sempre atenciosa, obrigada pelo auxílio no experimentos.

À Katy e Paty,

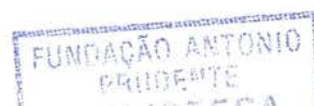
Amigas que, por muitas vezes, substituíram a família, confortaram as saudades. Pelos 3 anos juntas. Obrigada.

Aos meus amigos,

Todos aqueles que fizeram ou fazem parte da minha história contribuindo de alguma forma. Obrigada. Em especial à Roberta, tia "Chuva", tio Toninho, Fer e Jú, minha segunda família.

Aos meus familiares,

A estes que estão sempre na minha platéia aplaudindo pelos meus feitos, mesmo quando não sinto merecer, meu muito obrigada a todos.



Aos colegas do Instituto Ludwig,

Pelas conversas nos corredores, pelas dúvidas tiradas, pelo companheirismo, pela amizade e o bom clima da sala de cultura, pela primeira acolhida no Lab. de Genética-Dr.Simpson, pelas risadas e por tudo que aqui passei.. Minha eterna gratidão a todos os componentes do Inst. Ludwig. Em especial a Elisângela e Anna Christina pelo sequenciamento.

Ao laboratório de imunologia da USP,

Ao grupo do Dr.Gustavo Amarante Mendes, grata pela colaboração e amizade. Em especial à Gabriela.

RESUMO

Guimarães, EP. **Modulação da atividade biológica do Fator de Necrose Tumoral (TNF) por *Tsg-5***. São Paulo; 2002. (Dissertação de mestrado - Fundação Antônio Prudente).

Na tentativa de contribuir para o melhor entendimento do mecanismo de ação do TNF como citocina pró-inflamatória, nosso laboratório identificou, por DDRT-PCR, um transcrito de 560-590 bases expresso apenas em MEFs induzidos com TNF. O gene associado a este transcrito recebeu o nome de *TNF-stimulated gene 5 (Tsg-5)*. De acordo com pesquisas de homologia em banco de dados, trata-se de um gene ainda não descrito. O gene *Tsg-5* possui três exons e uma forma de "splicing alternativo", onde o segundo éxon não é utilizado. O objetivo deste trabalho é iniciar a caracterização funcional de *Tsg-5*, contribuindo assim para o entendimento do mecanismo de ação do TNF e, de maneira mais ampla, dos mecanismos moleculares que governam a Resposta Inflamatória. Para tanto isolamos clones de fibroblastos murinos, transfectados com um vetor para expressão constitutiva de *Tsg-5*. Estes clones foram utilizados em experimentos onde foi avaliada a resposta ao TNF, através de parâmetros como índice apoptótico, proliferação celular e indução de genes. Os dados obtidos através de ensaios de proliferação, realizados por incorporação de timidina, não nos revelaram diferenças entre o índice proliferativo entre os clones transfectados e os diversos clones controles. Do mesmo modo, nos ensaios de EMSA (Ensaio de alteração de motilidade eletroforética), onde buscamos detectar o nível de atividade de NF- κ B, que é uma das principais

vias de sinalização de TNF, não observamos nenhuma diferença entre células controle ou transfectadas com vetor de expressão de *Tsg-5*. Avaliamos também a expressão de outros genes, induzidos por TNF, nos clones transfectados com *Tsg-5*. Foi observado que nos clones que expressam maior quantidade de *Tsg-5*, ocorreu uma diminuição dos níveis de mRNA para o gene da quimiocina KC/N51. Nestes clones também notamos um aumento em níveis de mRNA para *c-jun*, o que sugere um possível aumento da ativação do fator de transcrição AP-1. Os ensaios de apoptose sugerem uma maior sensibilidade a agentes que induzem à apoptose em clones com altos níveis de mRNA de *Tsg-5*. Os dados obtidos concluem que uma maior expressão do gene *Tsg-5* parece não interferir na via da ativação de NF- κ B, ou na via mitogênica de TNF. Por outro lado, ainda que preliminares, nossos dados sugerem que a expressão de *Tsg-5* poderia estar relacionada com elevados níveis de AP-1 o que levaria à uma maior sensibilidade aos agentes apoptóticos.

SUMMARY

Guimarães, EP. **Modulação da atividade biológica do Fator de Necrose Tumoral (TNF) por Tsg-5** Functional Characterization of Tsg-5 in mouse fibroblasts exposed to TNF São Paulo; 2002. (Dissertação de mestrado - Fundação Antônio Prudente).

TNF is a pro-inflammatory cytokine with pleiotropic function. We identified a new gene, named Tsg-5, whose expression is up-regulated in TNF-treated mouse embryonic fibroblasts (MEFs). Tsg-5 gene has three exons, and encodes a mRNA of 560 bases. In vivo, Tsg-5 is expressed constitutively in thymus and ovary and, in response to LPS, its mRNA is detected in spleen, lung, and brain. For the functional characterization of Tsg-5, we generated clones of MEFs that express Tsg-5 under the control of the α -actin promoter. Clones showing different levels of Tsg-5 mRNA were isolated. With these clones, we asked the question whether overexpression of Tsg-5 would interfere with TNF responsiveness. We first measure the ability of TNF to stimulate gene expression. Whereas no differences in the inducibility of IRF-1 and I β were observed, there was reduced induction of KC and decreased *c-jun* gene expression in clones with higher Tsg-5 mRNA. EMSA analysis showed that TNF activation of NF- κ B was comparable in all tested clones. There were also no differences in stimulation of DNA synthesis when clones were treated with TNF. Were observed a sensibility of the clones with higher Tsg-5 mRNA to apoptosis-inducing agents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - : Representação esquemática da via de transdução de sinal ativada por TNF.....	5
Figura 2A: Plasmídio pBKCMVTSG5.....	16
Figura 2B: Plasmídio pBactNEOTSG5.....	16
Figura 3: Northern Blot de fibroblastos de camundongo do tipo selvagem (WT) ou deficientes para o IFR-1 (IRF-1 ^{0/0}).....	25
Figura 4: Northern Blot de clones transfectados com o plasmídio pBKCVMTSG-5.2 e .5.3 ou vazios.....	27
Figura 5: Expressão do transgene <i>Tsg-5</i> em clones transfectados com o plasmídio pBactNEOTSG-5.....	28
Figura 6: Efeito da expressão de <i>Tsg-5</i> na indução de genes por TNF.....	30
Figura 7: Expressão de <i>c-jun</i> em clones transfectados com o transgene <i>Tsg-5</i>	32
Figura 8: EMSA de clones vazios ou transfectados com o cDNA de <i>Tsg-5</i>	35
Figura 9: EMSA de clones vazios ou transfectados com <i>Tsg-5</i> em diferentes tempos de indução.....	36
Figura 10: Gráfico de valores relativos de incorporação de timidina em diferentes clones carenciados e tratados com TNF.....	38
Figura 11: Porcentagem de morte celular em clones transfectados ou não com <i>Tsg-5</i> , tratados com VM26.....	41
Figura 12: Índice de morte celular em clones com diferentes concentrações da expressão de <i>Tsg-5</i> , tratados com VM26.....	43
Figura 13: Gráfico de curva dose-resposta ao tratamento com VM26.....	44

LISTA DE SIGLAS

Tsg-5: TNF stimulated gene-5

TNF: Tumor necrosis factor

IFN: Interferon

DDRT-PCR: Diferencial display

MEF: Fibroblastos de embrião de camundongo

EMSA: Ensaio de motilidade eletroforética

KC/N51: Gene regulado por TNF

NF- κ B: Nuclear factor- B

RNA: Ácido ribonucleico

mRNA: RNA mensageiro

DNA: Ácido desoxirribonucleico

AP-1: Activating protein 1

***c-jun*:** Oncoproteína que forma o complexo AP-1

***c-fos*:** Molécula formadora do complexo AP-1

IL-1: Interleucina-1

IL-6: Interleucina-6

LPS: Lipopolissacáride

TNFR I: Receptor I de TNF

TNFR II: Receptor II de TNF

NK: Natural Killer

MAPKinase: Mitogen-activated protein Kinase

TRADD: TNFR I associated death domain protein

RIP: Receptor interacting 1

FADD: Fas-associated death domain protein

TRAF2: TNF-receptor associated factor 2

UV: Ultra-violeta

ATF: Activating transcription factor

JNK: Jun aminoterminal-Kinase

FS-4: Fibroblastos de camundongo

IFR-1: Interferon regulatory factor-1

HL-60: Células promielocíticas

FCS: Soro fetal bovino

G418: Geneticina (antibiótico)

pBKCMV: Vetor de expressão

pBactNEO: Vetor de expressão

NEO: Neomicina (antibiótico)

PNK: Polinucleotídeo Kinase

VM26: Veniposídeo

HFS-PI: Tampão intercalante

SV129: Linhagem de camundongo

IKB: Inibidor de Kappa B

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	O TNF.....	2
1.2	TNF e IFNs.....	8
1.3	O <i>Tsg-5</i>	9
1.4	Apoptose.....	11
2	JUSTIFICATIVA.....	13
3	OBJETIVOS.....	14
3.1	Objetivo Geral.....	14
3.2	Objetivos Específicos.....	14
3.2.1	Expressar <i>Tsg-5</i> em fibroblastos murinos imortalizados.....	14
3.2.2	Comparar os níveis de resposta a TNF de diferentes clones.....	14
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1	Bactéria competente.....	15
4.2	Vetores.....	15
4.3	Drogas.....	17
4.4	Cultura e transfecção de célula.....	17
4.5	Extração de RNA total e hibridização por Northern Blot.....	18
4.6	Ensaio de alteração de motilidade eletroforética (EMSA)...	20
4.7	Ensaio de entrada em S por incorporação.....	22
4.8	Ensaio de apoptose.....	23
5	RESULTADOS.....	25
5.1	Obtenção de clones de <i>Tsg-5</i>	25
5.2	Modulação de resposta a TNF.....	29

5.3	Ensaio de alteração da motilidade eletroforética (EMSA).....	33
5.4	Ensaio de entrada em S (incorporação de timidina).....	37
5.5-	Ensaio de apoptose.....	39
6	DISCUSSÃO.....	45
7	CONCLUSÕES.....	51
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

O processo inflamatório compreende um conjunto complexo e coordenado de eventos, cujo objetivo primordial é resolver uma alteração tecidual e impedir e/ou limitar a propagação de um agente agressor no organismo. Deste processo participam diversas células relacionadas ao sistema imune além de uma ampla variedade de mediadores, que, em conjunto, são denominados mediadores da inflamação.

Vários dos mediadores da inflamação são produzidos e liberados por diversos tipos celulares que migram para os sítios inflamatórios e outros são gerados pela ativação de componentes presentes no plasma, destacando-se entre eles o sistema do complemento e a cascata de coagulação sanguínea. Diversos mediadores inflamatórios lipídicos, produtos da clivagem enzimática de lipídeos de membrana, também são produzidos por diversos tipos celulares (macrófagos, monócitos, neutrófilos e mastócitos).

As citocinas, que são exemplo de mediadores, são proteínas secretadas por células do sistema imune em resposta a antígenos, e estimulam diversas respostas celulares, envolvidas em imunidade e inflamação. Sua ação pode ser estimular o crescimento e proliferação de linfócitos ou ativar diferentes células efetoras envolvidas na eliminação do antígeno.

Dados sugerem que as citocinas possuem uma função redundante, podendo interagir funcionalmente para influenciar na ação e síntese de outras citocinas (ABBAS 1997).

Com a caracterização das citocinas com atividades pró-inflamatórias, novos aspectos relacionados à biologia do processo inflamatório foram elucidados. Tornou-se claro que a regulação da expressão gênica mediada por citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-1, IL-6 e TNF é fundamental para o desenvolvimento e o controle do processo inflamatório.

1.1 O TNF

O fator de necrose tumoral (TNF) foi originalmente descrito como sendo uma proteína mediadora dos processos de necrose hemorrágica induzida por endotoxina em camundongos (CARSWELL *et al.*, 1975). Posteriormente, O TNF foi também reconhecido como sendo o fator sérico que levava à caquexia (BEUTLER *et al.*, 1985). Entretanto, logo após a clonagem e expressão do TNF como proteína recombinante, ficou demonstrado que este possui diversas outras funções além da anti-tumoral. Hoje, sabemos que o TNF é o principal mediador do choque séptico em infecções por germes gram-negativos (BEUTLER & CERAMI, 1986), possui atividade mitogênica em células fibroblásticas (SUGARMAN *et al.*, 1985; VILCEK *et al.*, 1986) e, por si só ou através da indução de outras citocinas como IL-1 (DINARELLO *et al.*, 1986), IL-6 (KOHASE *et al.*, 1986; ZHANG *et al.*, 1990), IL-8 (MATSUSHIMA *et al.*, 1988; LEE *et al.*, 1990), MACF (LEE *et al.*, 1990; FURUTANI *et al.*, 1989), pode modular a atividade de células componentes do sistema imune (macrófagos, linfócitos, leucócitos polimorfonucleares), além de células endoteliais, hepatócitos e astrócitos (OLD, 1985; LEE & VILCEK, 1989; BEUTLER, 1990 - revisões). O TNF também está diretamente envolvido nas

reações inflamatórias, com atividades fundamentais em processos de defesa contra doenças virais, bacterianas, parasitárias, além de doenças auto-imunes e do câncer.

O TNF é sintetizado como uma proteína precursora de 26kDa que, após processamento, libera uma forma madura de 17kDa (KRIEGLER *et al.*, 1988; JUE *et al.*, 1990). Comparada à forma madura, a forma precursora possui um domínio N-terminal extra de 76 aa em humanos e de 79 aa em camundongos e existe como uma proteína transmembrana. Há evidências da participação da forma transmembrana no contato célula-célula *in vivo*, sendo a forma solúvel a responsável pelos sintomas observados no choque séptico e pela caquexia. Um balanço entre as duas formas é importante na diversidade da atividade biológica do TNF (WATANABE *et al.*, 1998).

O TNF é produzido principalmente por macrófagos ativados, podendo também ser produzido por linfócitos T, células natural Killer (NK), células endoteliais, mastócitos, células da glia, células de Kupper e células da musculatura lisa. A síntese de TNF é regulada em diversos níveis: regulação da transcrição, estabilidade do mRNA e síntese da proteína (BROUCKAERT e FIERIS 1996). O TNF possui homologia estrutural e funcional com proteínas secretadas por linfócitos T, chamadas linfotoxinas, e em camundongos são secretadas como glicoproteínas (GRAY *et al.* 1984).

Para exercer suas várias atividades biológicas o TNF forma trímero e liga-se a dois receptores específicos, TNFR1 e TNFR2, desencadeando uma cascata de sinalização que culmina com a modulação da expressão de uma série de genes (TARTAGLIA e GOEDDEL 1992). O receptor 1 de TNF (TNFR1) é expresso em todos os tipos celulares e o receptor 2 (TNFR2) é expresso somente em células do sistema imune e células endoteliais. A maioria dos sinais celulares desencadeados por TNF são

mediados por TNFR1, e TNFR2 tem sua função menos esclarecida. Vale ressaltar que o receptor 1 é que possui o domínio de morte para a ativação da cascata de apoptose.

Na cascata de eventos necessários para a transdução de sinal dos receptores de TNF até o núcleo celular, o fator de transcrição NF- κ B parece desempenhar um papel fundamental (YAMAMOTO e GAYNOR 2001; AGGARWAL et al. 2001-Figura 1). NF- κ B desempenha um papel central na resposta imune e é capaz de regular a expressão de uma vasta quantidade de genes (PERKINS 2000). Interessante notar que NF- κ B parece ser crítico tanto para as funções mitogênicas, pró-inflamatórias quanto para funções pró-apoptóticas (BALDWIN 2001), todas características de TNF. O exato mecanismo pelo qual a célula é capaz de decidir por cada uma dessas funções ainda é motivo de investigação (TARTAGLIA et al. 1993).

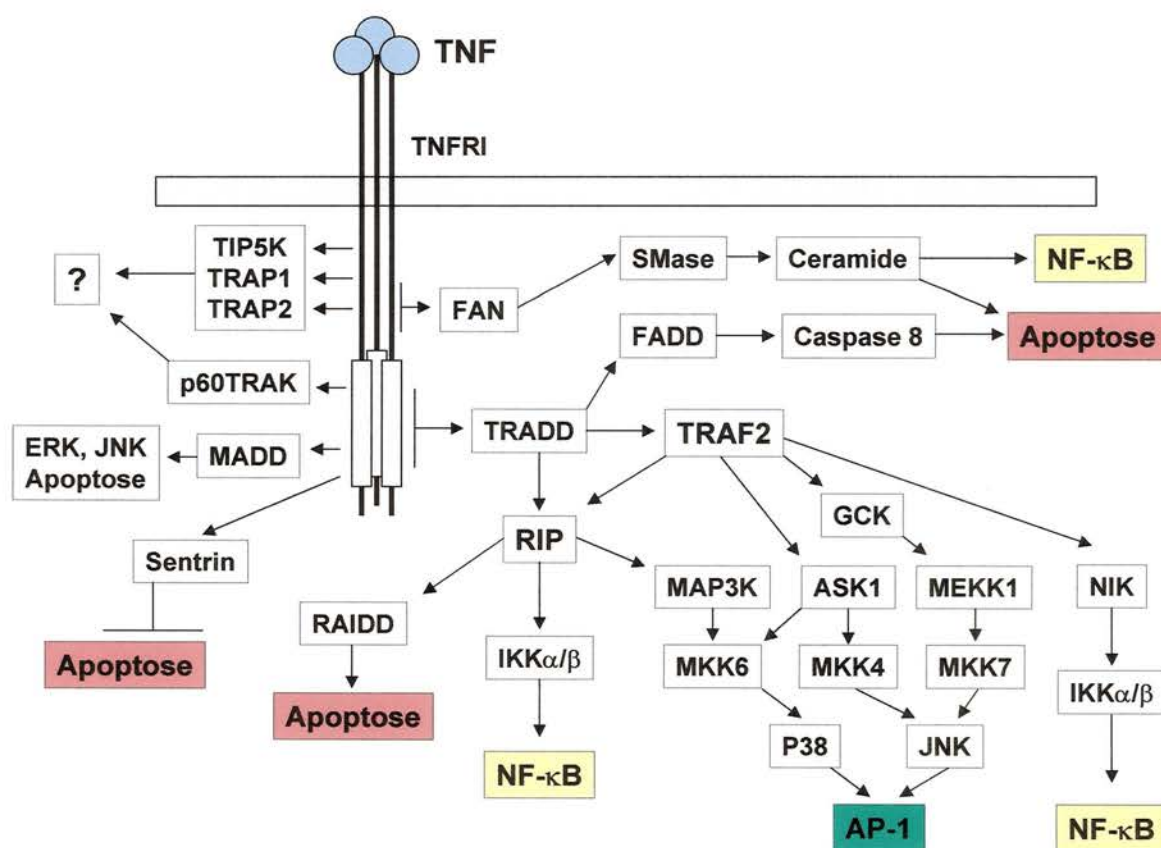


Figura 1: Representação esquemática da via de transdução de sinal ativada por TNF. A ligação de TNF ao receptor TNFR1 induz a mobilização e interação de proteínas com domínios intracitoplasmáticos do receptor TNFR1. Dentre essas proteínas estão TRADD, FADD, TRAF, MADD e RIP. Várias das vias convergem para ativação de NF- κ B e AP-1 ou para vias de ativação de apoptose (Adaptado de Aggarwal et al. 2001).

A ligação do trímero de TNF aos receptores TNFR1 ou TNFR2 recruta uma variedade de proteínas que interagem com o domínio citoplasmático dos receptores. O receptor TNFR2, não representado acima, é encontrado em forma de trímero ligado a proteína TRAF2.

A primeira proteína recrutada por TNFR1 é TRADD (TNFR1-associated death domain protein), a qual desencadeia o recrutamento de 3 mediadores adicionais, RIP-1 (receptor-interacting protein 1), FADD (Fas-associated death domain protein) e TRAF-2 (TNF-receptor associated factor 2), HENGARTNER (2000), que é um eficiente ativador de MAPKinasas (YUAN 1997). O mecanismo efetor da apoptose induzida por TNF é mediado por enzimas proteolíticas, denominadas caspases (BAUD e KARIN 2001).

Através do recrutamento de TRADD seguido por FADD, ou somente FADD como acontece com o receptor Fas, outro membro da família TNF (FAOUZI et al. 2001), será ativada a via de apoptose, seguida da via das caspases, que será ativada a partir da caspase 8 associada a FADD, e culminará na indução da apoptose (KRAMMER 2000; BAUD e KARIN 2001). A atividade mitogênica de TNF, no outro extremo da resposta inflamatória, tem sido associada à ativação de NF- κ B (LEE et al. 2000).

Um outro fator de transcrição ativado por TNF e de grande importância na sua atividade biológica é AP-1, principalmente envolvido na proliferação celular (SHAULIAN e KARIN 2001). AP-1 é um fator transcricional composto por heterodímeros ou homodímeros das famílias *fos*, *jun* e ATF (WAGNER 2001) como exemplos *jun/fos* ou *jun/jun*. Vários estímulos são capazes de aumentar a expressão das proteínas dessas famílias e ativá-las transducionalmente, incluindo fatores de

crescimento presentes no soro, citocinas, ativadores de células T, neurotransmissores e radiação UV (KARIN 1995).

A família AP-1 (activating protein 1) de fatores de transcrição consiste de homômeros e heterodímeros de *jun*, *fos* e ATF (activating transcription factor), subunidades que se ligam formando um complexo de grande estabilidade, que se liga a um sítio específico do DNA, sítio AP-1 (KARIN et al. 1997).

A ativação do complexo ocorre por fosforilação, JNK (Jun amino-terminal Kinase) e MAPK (mitogen-activated protein Kinase), estas ativadas por componentes da via de sinalização de TNF (KARIN et al. 1997; TANG et al. 2001- figura 1).

Provavelmente, a oncoproteína *c-jun* (VOGT 2001) e *c-fos* foram os primeiros fatores de transcrição descobertos em associação com a proliferação celular (KARIN et al. 1997).

Recentemente, foi sugerido que AP-1 pode estar envolvido na via de apoptose (KARIN et al. 1997). Algumas formas de apoptose requerem síntese de proteínas "de novo", e é possível que a atividade de AP-1 seja essencial para indução da expressão dos genes das referidas proteínas. AP-1 não é suficiente para desencadear a apoptose, mas sua atividade parece ser necessária para alguns tipos celulares iniciarem o processo de morte programada (KARIN et al. 1997).

O fenótipo aparentemente normal de camundongos deficientes para TNF (TNF^{-/-}) ou seus receptores (TNFR1^{-/-} e TNFR2^{-/-}) sugere que TNF é dispensável na formação dos tecidos na fase pré-natal ou na organogênese. No entanto, os animais TNF^{-/-} não formam folículos primários de células B no baço, centros germinativos e produzem baixos níveis de anticorpos IgG contra antígenos timo dependentes (MARINO et al. 1997). Esses

animais também apresentam quadro de choque quando inoculados com altas doses de LPS. Camundongos deficientes para o receptor 1 de TNF (TNFR1-p55), apresentam os mesmos sintomas dos animais deficientes para TNF em relação à sensibilidade à altas doses de LPS. O papel de TNF na proteção contra agentes infecciosos ficou determinado pela alta sensibilidade desses animais à infecção por LM (*Listeria monocytogenes*) (PFEFFER et al. 1993; ROTHE et al. 1993).

Camundongos deficientes para o receptor 2 (TNFR2- p75), apresentam uma reduzida necrose tecidual e uma maior resistência aos efeitos de TNF (ERICKSON et al. 1994).

1.2 TNF e IFNs

As citocinas apresentam um considerável grau de redundância em suas atividades biológicas e ainda, apresentam uma complexa rede de interações onde suas atividades são moduladas. A este complexo sistema deu-se o nome de “REDE de CITOCINAS”.

Por exemplo, TNF induz a síntese de muitas proteínas indutíveis também por IFNs, e pode modular a síntese de IFN- (RUBIN et al. 1988).

Em células FS-4 tratadas com TNF observa-se o aumento da concentração de mRNA de IFN- , ou seja, TNF induz síntese de IFN- e, na presença de quantidades sub-efetivas de IFN, TNF exerce uma atividade anti-vírica que não se manifesta na presença de anticorpos anti-IFN- . (REIS et al. 1989)

Coletivamente, esses dados sugerem que TNF e os IFNs compartilham a habilidade de ativar fatores regulatórios que levam a expressão de um grupo comum de genes. (RUBIN et. al. 1988)

O fator de transcrição IRF-1 (*Interferon regulatory factor -1*), descrito inicialmente durante estudos da regulação do gene de inteferon- (INF-) (REIS et al. 1994) é também ativado por uma série de outras citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ , IL-1 ou IL-6, os autores MIYAMOTO et al. (1988); FUJITA et al. (1989) e ABDOLLAHI et al. (1991) e, neste contexto, IRF-1 surgiu como um fator de transcrição que poderia explicar, pelo menos em parte, a redundância biológica observada entre várias citocinas (REIS et al. 1992).

1.3 O *Tsg-5*

Com o objetivo de elucidar o papel de IRF-1 na transdução de sinal desencadeado por TNF, nosso grupo comparou por “Differential Display” (DDRT-PCR) as populações de mRNA em fibroblastos de camundongos do tipo selvagem ou deficiente para IRF-1 tratados ou não com TNF.

Um fragmento de cDNA (denominado 059A14+) com 253 pares de bases foi clonado a partir de fibroblastos de embrião de camundongos (MEFs) imortalizados, deficientes para o fator de transcrição IRF-1 (IRF-1^{o/o}) e estimulados com TNF (Eduardo G. Pires, Tese de Mestrado). Em ensaios de Northern Blot este fragmento de cDNA hibridizou com um transcrito de 560-590 bases expresso preferencialmente em MEFs imortalizados IRF-1^{o/o} induzidos por TNF, confirmando a natureza diferencial

deste transcrito. Fizemos uma análise contra um banco de dados o qual revelou que a sequência do fragmento 059A14+ não apresentava homologia com sequências até então depositadas.

Curiosamente, até hoje nenhuma outra sequência com homologia a *Tsg-5* foi depositada no Gene bank. A partir deste dado, o gene associado a este transcrito recebeu o nome de *TNF-stimulated gene-5 (Tsg-5)*. Posteriormente observamos que o gene *Tsg-5* é induzido por TNF em culturas primárias de fibroblastos de embrião de camundongos tanto do tipo selvagem quanto deficientes para IRF-1. (ABRANTES et al. 2002 J Biol Chem submetido)

Assim, a observação de que IRF-1 poderia estar inibindo a indução de *Tsg-5*, por TNF, parece uma particularidade das células imortalizadas. De qualquer forma, estas células poderão ser de grande valia para os experimentos de caracterização do promotor de *Tsg-5*.

Utilizamos uma biblioteca de cDNA e uma biblioteca genômica para a caracterização do mRNA e do gene codificador para *Tsg-5*. A varredura da biblioteca de cDNA identificou 10 clones positivos e, na biblioteca genômica, foi encontrado um fago com um inserto de 15 Kb. A análise dos dados gerados a partir destes clones revelou que o gene *Tsg-5* possui 3 exons e que pelo menos um evento de “splicing” alternativo ocorre, com a exclusão da sequência do exon 2.

Os dados de sequenciamento sugerem que o gene *Tsg-5* tem o potencial para codificar uma polipetídeo de 34 ou 40 aminoácidos, dependendo da presença ou ausência do segundo exon. Sua função não pode ser inferida a partir de sua sequência primária de aminoácidos.

Em estudos realizados no laboratório para análise da expressão “*in vivo*” de *Tsg-5* em camundongos tratados ou não com LPS, pôde ser observada uma expressão constitutiva em células do timo e ovário, e uma expressão induzida em células de pulmão, baço e cérebro. Também para identificar a função do gene de *Tsg-5*, foram realizadas culturas de células, onde uma possível sensibilidade à apoptose foi registrada.

1.4 Apoptose

A palavra apoptose vem do grego e significa deteriorar. A maioria das células eucariontes superiores tem a habilidade de auto destruição, ativada por um intrínscio programa de suicídio celular.

A morte celular pode ser necessária ou ser, seriamente, prejudicial. Este processo fisiológico normal é denominado como morte celular programada. O termo apoptose foi originalmente definido por possuir certas características morfológicas, incluindo invaginação de membrana, condensação de cromatina e retração do citoplasma e núcleo. Desde a definição inicial, o termo apoptose tem sido extensivamente usado para referir-se a características bioquímicas e morfológicas de morte celular programada (THOMPSON, 1995).

As células em apoptose, freqüentemente, tem uma involução de membrana formando o corpos apoptóticos, em pontos mais avançados da apoptose, que serão, prontamente, fagocitados e digeridos por macrófagos (THOMPSON, 1995).

Em contraste com o mecanismo de necrose, as células apoptóticas mantêm sua membrana íntegra, sem extravasamento de material citoplasmático, como ocorre na necrose celular.

O processo de apoptose tem funções importantes tanto no desenvolvimento embriológico, como na manutenção da homeostase e na maturação dos sistemas nervoso e imune. Além de levar também, a um mecanismo de defesa de células, potencialmente, indesejadas, como acontece em infecções virais e células tumorais. Em contraste, a apoptose pode ter um efeito benéfico em uma variedade de processos patogênicos, como na seleção de células T aptas, no controle da auto-destruição em adictivos, bem como em doenças neuronais como Alzheimer (THOMPSON, 1995).

Na maioria dos tipos celulares a apoptose é caracterizada pela fragmentação de seu DNA por ação de endonucleases (STELLER, 1995). O DNA de células apoptóticas é clivado em múltiplos fragmentos de 180 a 200 pares de bases, correspondendo ao tamanho de um oligonucleossoma.

2 JUSTIFICATIVA

Uma das estratégias amplamente utilizadas para elucidação do mecanismo de ação do TNF como citocina pró-inflamatória, tem sido a identificação e caracterização funcional dos genes estimulados por TNF.

Nosso laboratório identificou um fragmento de cDNA (originalmente denominado 059A14+) com 253 pares de bases que foi clonado a partir de fibroblastos de embrião de camundongos (MEFs) imortalizados, e estimulados com TNF. O gene associado a este fragmento recebeu o nome de *TNF-stimulated gene 5* (*Tsg-5*). O gene de *Tsg-5* parece codificar para um polipeptídeo de 40 aminoácidos, e é expresso *in vivo*, em células de timo, ovário, pulmão, baço e cérebro.

Como a função biológica de *Tsg-5* não pode ser inferida através de sua sequência de aminoácidos, decidimos investigar o efeito de expressão deste gene, que é um gene induzido por TNF observando duas das atividades biológicas mais antagônicas de TNF: síntese de DNA, podendo levar à proliferação celular, e morte celular.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização funcional do gene *Tsg-5*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1- Expressar *Tsg-5* em fibroblastos murinos imortalizados

3.2.2- Comparar os níveis de resposta a TNF de diferentes clones de células transfectadas com *Tsg-5* transgene, avaliando:

- a) Indução de marcadores moleculares de resposta a TNF
- b) Índice de entrada em S em resposta a TNF
Medido por incorporação de timidina tritiada
- c) Índice de apoptose em resposta a TNF, avaliado por leitura em FACs
Medido através da incorporação de iodeto de propídeo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 BACTÉRIA COMPETENTE

Bactérias JM 109 competentes foram preparadas de acordo com o protocolo de INOUE et al. (1990).

A transformação foi feita segundo, protocolo descrito por INOUE et al. (1990), seguida de clonagem dos plasmídios.

4.2 VETORES

Para clonagem do cDNA de *Tsg-5* foram utilizados 2 vetores de expressão: a) pBKCMV, que possui o promotor de CMV e tem como marcador o gene de resistência a Neomicina; e b) vetor pBactNEO, também com marcador de resistência a Neomicina e o promotor de α -actina. (REIS et al. 1992, figura 2B).

Os cDNAs gerados pelas duas formas de "splicing alternativo", de 2 e 3 exons, foram clonadas no vetor pBKCMV, dando origem aos plasmídios pBKCMVTSG-5.2 e pBKCMVTSG-5.3 (figura 2A). Os sítios de clonagem utilizados foram XbaI e BamHI. No vetor pBactNEO, foi clonada a forma de 3 exons, nos sítios SalI e XhoI, originando pBactNEOTSG-5.3 (figura 2B).

A confirmação das clonagens foi feita através da análise de digestões com enzimas de restrição para confirmar a presença dos insertos.

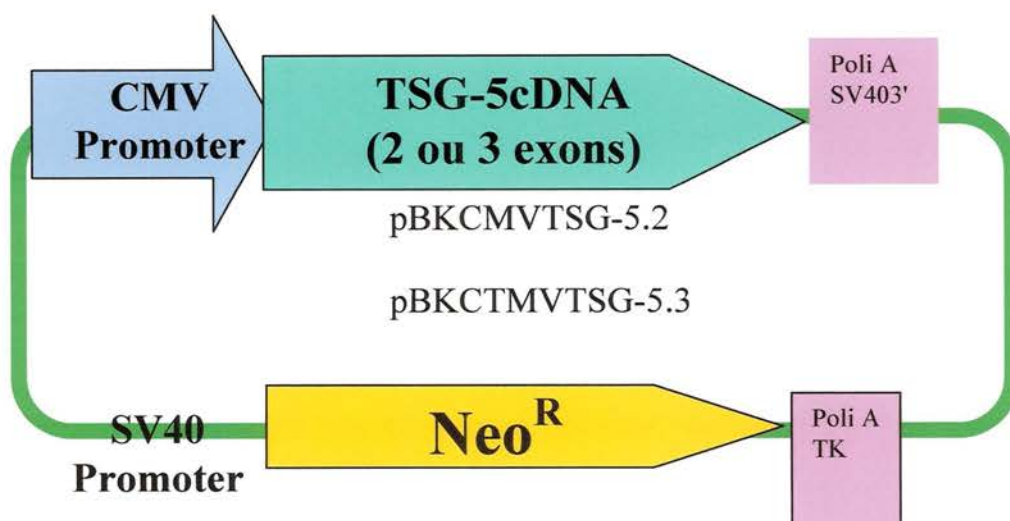


Figura 2A: Plasmídio pBKCMVTSG5. Representação esquemática do plasmídio pBKCMV com o promotor de CMV e o gene de resistência a neomicina. Este plasmídio foi utilizado para clonagem do cDNA de *Tsg-5* contendo 2 exons (pBKCMVTSG-5.2), ou 3 exons (pBKCMVTSG-5.3)

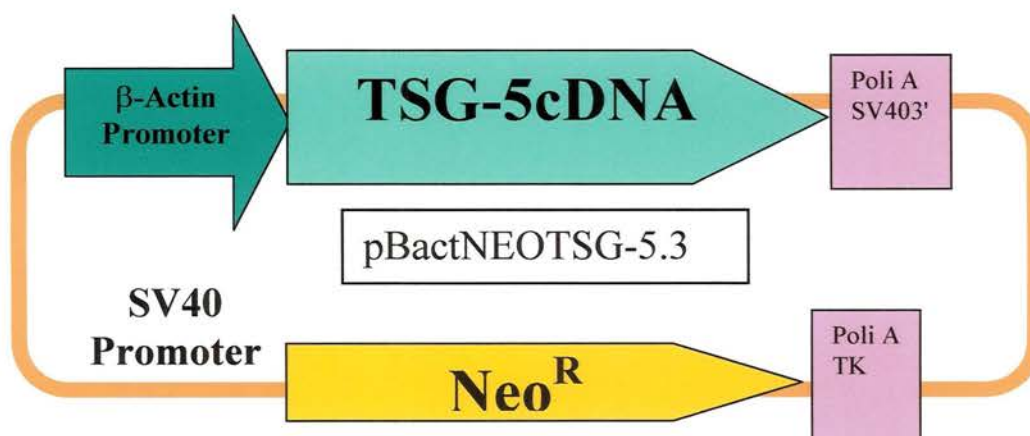


Figura 2B: Plasmídio pBactNEOTSG5. Representação esquemática do plasmídio pBactNEO com promotor de β -actina de galinha e o gene de resistência a neomicina. Este plasmídio foi utilizado para clonagem do cDNA de *Tsg-5* contendo os 3 exons (pBactNEOTSG-5.3)

4.3 DROGAS

As seguintes drogas foram utilizadas nos diferentes experimentos, e em concentrações variadas, conforme indicado em cada experimento.

- 1) G418- Geneticina (Gibco BRL)
- 2) Staurosporina
- 3) Veniposídeo (VM 26- Bristol-Myers Squibb)
- 4) Iodeto de Propídeo (Sigma)
- 5) TNF- (R&D systems)

4.4 CULTURA E TRANSFECCÃO DE CÉLULAS

Nos experimentos de transfecção foram utilizadas culturas de fibroblastos de embrião de camundongo SV129, imortalizados espontaneamente por passagens sucessivas em cultura (MEFs imortalizados- gentilmente cedidos pelos Drs. Yi-Li Yang e Charles Weissman, Universidade de Zurich).

Os MEFs foram mantidos em cultura em meio DMEM suplementado com 10% FCS, em estufa de CO₂ (5%), a 37⁰C.

Após transfecção, com o plasmídeo de expressão contendo o cDNA de *Tsg-5* e o gene de resistência a Neomicina, os MEFs foram mantidos em cultura com DMEM suplementado de 10% FCS e foi adicionado o antibiótico G418 (Geneticina-Gibco BRL), em concentração de 0,2mg/ml. O meio foi trocado a cada 48 horas.

No ensaio de eletroporação uma suspensão de 6.10^6 células (MEFs imortalizados) foi colocada em uma cubeta junto com uma quantidade aproximada de

5 g de DNA plasmidial. As células foram submetidas a uma ddp (diferença de potencial) de 276V, 600 F, e num tempo aproximado de 7 msec. Em seguida a suspensão foi transferida para um tubo contendo 50ml de meio D10 (DMEM 10% Soro Bovino Fetal), e distribuída em 5 placas de petri (p100) e colocadas em estufa de 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas.

Após 24 horas iniciou-se a seleção com o antibiótico Geneticina (G-418, concentração de 0,4mg/ml) que foi adicionado ao meio e trocado a cada 48 horas. O período médio de seleção foi de 11 dias. Após seleção, os clones são mantidos com tratamento do antibiótico a 0,2mg/ml.

O armazenamento dos clones transfectados e selecionados, derivados de MEFs imortalizado foi feito em nitrogênio líquido, com seus devidos meios de congelamento e aliquotados em criotubos.

4.5 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E HIBRIDIZAÇÃO NORTHERN BLOT

Os RNAs foram extraídos dos clones em monocamada (estágio de confluência da cultura), utilizando TRIzol Reagent (Life Technologies, USA), conforme instruções do fabricante.

A concentração foi determinada levando-se em conta que 1 unidade corresponde a 40 µg de RNA. A razão entre as leituras das absorbâncias feitas a 260 e 280 nm foi usada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do ácido nucleico nas

proteínas, determinado a qualidade do RNA. O RNA foi considerado de boa qualidade quando a relação entre as absorbâncias 260/ 280 foi de 1,7-2,0.

Para a realização do experimento de Northern Blot o RNA total (15 g) foi desnaturado pela incubação a 65°C em tampão de amostra (EDTA 0,5M, formaldeído 37%, tampão borato 1M, glicerol 100% e formamida) e fracionados por tamanho em gel de agarose 1%, em tampão de borato pH 8.3, contendo 5,2% de formaldeído e EDTA. Após a corrida os RNAs foram transferidos para uma membrana de nylon (Hybond-N, Amersham), por capilaridade, por um tempo aproximado de 18 horas à temperatura ambiente. Os RNAs foram fixados à membrana utilizando-se o aparelho UVCrosslinker da FisherBiotech.

As membranas contendo as amostras de RNAs fracionadas foram pré-hibridizadas (CHURCH e GILBERT 1984). A pré-hibridização foi feita a 65°C em forno giratório por uma hora

Após a pré-hibridização a sonda marcada radioativamente (Kit Ready to go-Amersham) e previamente desnaturada foi adicionada a solução e a hibridização "overnight", aproximadamente 16 horas.

As membranas foram lavadas com solução de lavagem duas vezes, e expostas contra filmes de raio-X sob o abrigo da luz em cassete apropriado a -70°C, por períodos variados.

4.6 ENSAIO DE ALTERAÇÃO DE MOTILIDADE ELETROFORÉTICA (EMSA)

Esses experimentos tiveram como objetivo principal detectar a atividade de NF- κ B nos diferentes clones de *Tsg-5*. Os extratos celulares foram utilizados para medir a atividade de cada clone na ligação ao DNA, com relação a NF- κ B.

Os oligonucleotídeos utilizados nos experimentos foram sintetizados em fita simples, anelados em iguais proporções molares e os oligonucleotídeos contendo a sequência consenso para a ligação de NF- κ B ou uma sequência mutada, foram marcados com ^{32}P ATP (Armstrong/Pharmacia) utilizando a enzima T4 Polinucleotídeo Kinase (PNK), os oligonucleotídeos, consenso e mutados, foram utilizados como sondas. O oligonucleotídeo consenso representa a sequência igual a do fator NF- κ B. Os outros oligonucleotídeos, C e TTT, contém a sequência consenso de NF- κ B alterada em uma ou três bases, respectivamente, alterando o sítio para ligação de NF- κ B. Esses oligonucleotídeos foram utilizados como competidores para testar a especificidade da ligação das proteínas do extrato nuclear ao oligonucleotídeo consenso.

A detecção da ligação do extrato nuclear ao DNA foi feita pela observação da alteração de migração do oligonucleotídeo em gel de poliacrilamida, onde a visualização se dá por exposição contra filme de raio-X, após secagem do gel.

Para a preparação dos extratos nucleares, os clones contendo ou não o cDNA de *Tsg-5*, foram crescidos em placas de petri (p100) e as culturas, com confluência aproximada de 70%, foram tratadas ou não com TNF (10ng/ml) por tempos variados. A

seguir as células foram raspadas da placa e lavadas, 2 vezes, com PBS. As células foram transferidas para tubos cônicos, sedimentadas por centrifugação e, a seguir, descartado o sobrenadante. Após dispersão do sedimento de células, por homogeneização por Vortex, adicionamos tampão de lise (hipotônico- HEPES, KCl, EDTA e DTT). Após centrifugação, o sedimento de núcleos foi ressuspensão em tampão de extração (alto sal- HEPES, NaCl, EDTA, DTT, PMSF, protinina e leupeptina), e a suspensão foi incubada em gelo por 30 minutos. Novamente os núcleos foram sedimentados por centrifugação durante 15 minutos a 4 C. O sobrenadante contendo as proteínas nucleares foi recuperado, aliquoteado e imediatamente congelado a -70 C.

Para a reação de ligação ao DNA, a mistura contendo o extrato nuclear, BSA, DNA de salmão (inespecífico-não ligação), e tampão de ligação (HEPES, EDTA, glicerol e KCl), foi incubada em gelo. Após incubação, foi adicionado o oligonucleotídeo marcado e as reações foram incubadas a 30 C por 15 minutos.

Os oligonucleotídeos (sonda livre) e os complexos oligonucleotídeo/proteína foram eletroforéticamente fracionados em gel de poliacrilamida nativo. A corrida foi feita em tampão 0,5X TBE a 200V.

Após corrida, o gel foi fixado em solução de etanol 20% e ácido acético 10%, transferido para papel Whatmman e seco a 80 c, sob vácuo e exposto contra filme de raio-X.

NF-KB consenso

5' GCC TGG GAA AGT CCC CTC AAC T 3'

3' CGG ACC CTT TCA GGG GAG TTG A 5'

NF-KB Δ TTT (três mutações)

5' GCC YGG GAA AGT CAA ATC AAC T 3'

3' CGG ACC CTT TCA GTT TAG TTG A 5'

NF-KB Δ C (uma mutação)

5' GCC TGG GAA AGT CGC CTC AAC T 3'

3' CGG ACC CTT TCA GCG GAG TTG A 5'

4.7 ENSAIO DE ENTRADA EM S POR INCORPORAÇÃO DE TIMIDINA

Para determinação da fase do ciclo celular, realizamos o ensaio de entrada em S medido por incorporação de timidina. O experimento mede a síntese de DNA, o qual pode refletir o índice proliferativo.

Os clones foram crescidos em DMEM10%+G418 e, para cada clone, 10^4 células foram distribuídos em cada well de placas de 96 wells. Para cada clone 3 wells foram utilizados.

As células foram carenciadas em meio contendo 0,2% de FCS. Após 24 horas de carenciamento as células foram estimuladas com TNF (10ng/ml), por 12 horas. Após o estímulo, foi adicionado 1 Ci de H^3 timidina.

Após 12 horas da marcação, e ainda em meio carenciado, as células foram lavadas e fixadas em filtro (FilterMat). A leitura da incorporação da ^3H timidina foi feita no cintilador LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter (Beckman Coulter).

4.8 ENSAIO DE APOPTOSE

Na determinação do índice de apoptose, medida por porcentagem de morte celular, foram utilizados clones controles e transfectados com o cDNA de *Tsg-5*. Os clones expressando diferentes níveis do RNA de *Tsg-5* e seus controles (clones transfectados com plasmídio vazio), tiveram seus DNAs quantificados por citometria de fluxo.

O método determina a emissão de fluorescência pelo iodeto de propídio, que se intercala ao DNA, de forma estequiométrica, a cada 4 nucleotídeos. Há, portanto, uma relação diretamente proporcional entre a emissão de fluorescência e o conteúdo de DNA/célula.

Em casos onde a célula encontra-se em apoptose, é apresentada a fragmentação do DNA (CIDLOWSKI et al. 1996), o que causa perda de partes do núcleo e leva a formação de corpos apoptóticos (SAVILL e FADOK 2000; GORCZYCA et al. 1993a,b), estes corpos apoptóticos apresentam uma menor quantidade de DNA, essa menor quantidade de DNA vai emitir uma fluorescência mais baixa, e daí são identificadas as células apoptóticas. Desta forma identificamos populações de células apoptóticas.

As células em cultura foram tratadas com drogas específicas para indução de morte celular, Stauroporina e Veniposídeo (VM26) nas concentrações indicadas, e incubadas, em placas de 12 poços, de aproximadamente 2cm de diâmetro, por 16 horas em estufa a 37 C e 5% de CO₂. Após incubação, as células e seu sobrenadante, foram ressuspensos em de HFS-PI (Tampão intercalante de DNA). A suspensão foi novamente plaqueada e incubada por um tempo médio de 3 horas, a 4 C.

Em seguida, foi feita a leitura em citômetro de fluxo. Para tanto, todas as células de cada placa foram suspensas no próprio tampão e transferidas para tubos de leitura.

Em média, 10.000 células foram selecionadas para leitura.



5 RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO DE CLONES DE *Tsg-5*

Para o estabelecimento de clones de células murinas transfectadas com vetores de expressão, utilizamos fibroblastos derivados de embriões de camundongo SV129 imortalizados espontaneamente. Estas células expressam baixos níveis do mRNA de *Tsg-5*, mesmo após estímulo com TNF, conforme mostrado em experimento de Northern Blot realizado em nosso laboratório, Figura 3 (ABRANTES et al. 2002 submetido J Biol Chem). Por esta razão essas células foram utilizadas para obtenção de clones que expressam *Tsg-5* constitutivamente, sob a forma de um transgene. Os clones IRF-1^{0/0} são clones deficientes para o fator de transcrição IRF-1.

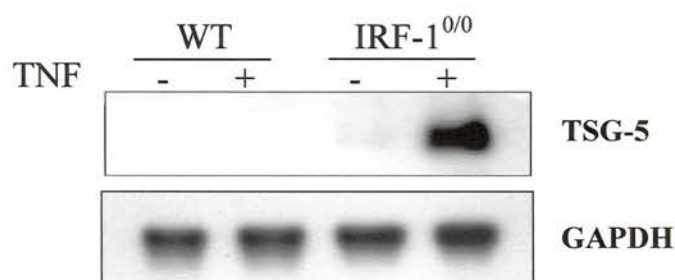


Figura 3: Northern Blot de fibroblastos de camundongo do tipo selvagem (WT) ou deficientes para o IFR-1 (IRF-1^{0/0}). As células foram tratadas com TNF (10ng/ml) durante 8 horas e, após extração do RNA total, 15 µg foram fracionados em gel de agarose e transferidos para membrana de nylon. A membrana foi hibridizada sucessivamente com uma sonda de cDNA para *Tsg-5* e GAPDH, marcadas com ³²P- dCTP. Após lavagem, as membranas foram expostas contra filmes de raio-X e obtidos os autoradiogramas mostrados.

Foram realizados dois experimentos de transfecção. No primeiro experimento transfectamos as células com os plasmídios pBKCMVTSG-5.2, que possui a forma de dois exons do cDNA de *Tsg-5*, e pBKCMVTSG-5.3, que possui a forma de três exons do cDNA de *Tsg-5*, ambos controlados pelo promotor do vírus CMV. Num segundo experimento realizado, foi utilizado o plasmídio pBactNEOTSG-5.3, contendo a forma de três exons do cDNA de *Tsg-5* e onde a expressão é controlada pelo promotor de - Actina (REIS et al. 1992).

Para verificarmos a expressão de *Tsg-5*, foi realizado um Northern Blot utilizando-se 15 g de RNA total dos diferentes clones. A Figura 4 mostra que, embora todos os clones, gerados no primeiro experimento, estivessem expressando o mRNA correspondente ao gene de resistência à neomicina, nenhum dos clones analisados expressava, em concentrações detectáveis, o mRNA de *Tsg-5*.

No segundo experimento, as células foram transfectadas com o plasmídio pBactNEOTSG-5. A figura 5 mostra um experimento de Northern Blot onde os níveis de mRNA para *Tsg-5* foram avaliados em 14 clones transfectados com o plasmídio contendo a forma de 3 exons, e um com o plasmídio vazio (V6), utilizado como controle. Nesses mesmos clones, tentamos determinar os níveis da proteína *Tsg-5* através da técnica de Imunohistoquímica empregando um anticorpo produzido em coelhos imunizados com dois peptídeos sintéticos que cobriam toda a sequência de aminoácidos de *Tsg-5*.

Apesar de termos utilizado diferentes protocolos, não conseguimos resultados esclarecedores e, assim, não foi possível correlacionar os níveis de mRNA com os níveis de proteína.

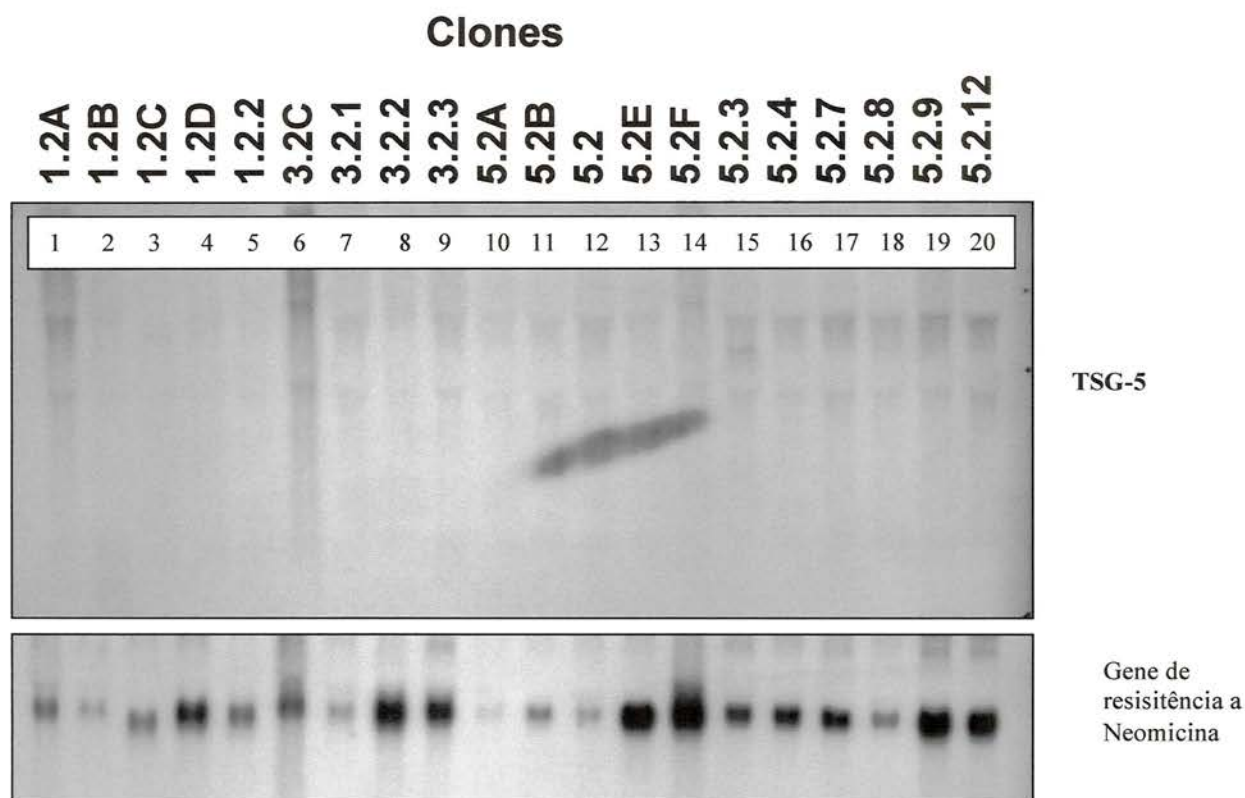


Figura 4: Northern Blot de clones transfectados com o plasmídio pBKCMVTSG-5.2 e .5.3 ou vazios.

Detecção do RNA de Tsg-5 em clones transfectados com o vetor de expressão pBKCMVTSG-5. MEFs foram transfectados com o plasmídio pBKCMV contendo ou não o inserto de cDNA de *Tsg-5*. Um total de 20 clones foram selecionados por resistência à neomicina (G-418), onde 5 correspondem as células transfectadas com o plasmídio pBKCMV (sem inserto-5 primeiras canaletas), 4 com pBKCMVTSG-5.2, (canaletas 6 a 9), e 11 com o plasmídio pBKCMVTSG-5.3 (canaletas 10 a 20). De cada clone, 15 µg de RNA total foram fracionados em gel de agarose e transferidos para uma membrana de nylon. A membrana foi hibridizada com a sonda para *Tsg-5* e, posteriormente, com a sonda para o gene de resistência à neomicina, ambas marcadas com ^{32}P dCTP. A membrana foi então exposta em filme de raio-X à -70 °C.

Clones

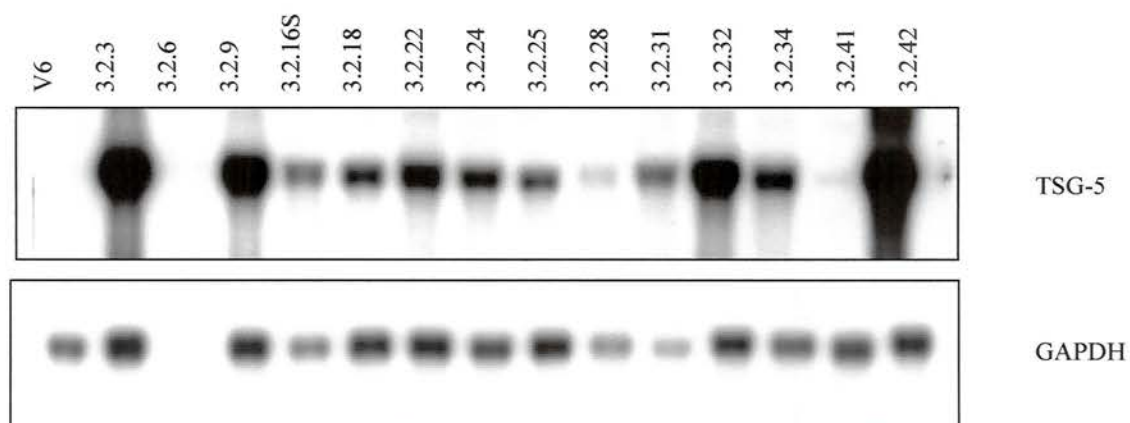


Figura 5: Expressão do transgene *Tsg-5* em clones transfectados com o plasmídio pBactNEOTSG-5.

Os clones, transfectados com o plasmídio, contendo ou não o inserto de *Tsg-5*, foram crescidos em placas de 10 cm de diâmetro e selecionados pela administração do antibiótico G-418. O RNA total foi extraído e, para cada clone indicado, 15 g de RNA foram fracionados em gel de agarose desnaturante. O RNA foi transferido para uma membrana de nylon e hibridizado sucessivamente com sondas de *Tsg-5* e GAPDH, marcadas com ^{32}P - dCTP. V6 corresponde a um clone transfectado com o plasmídio vazio. Os demais clones (3.2.3 a 3.2.42) representam clones transfectados com o plasmídio pBactNEOTSG-5.

5.2 MODULAÇÃO DA RESPOSTA A TNF

Uma vez isolados os vários clones, passamos a avaliar a resposta destes clones ao TNF. Em primeiro lugar, determinamos os níveis de mRNA para os genes IRF-1, KC/N51, IKB- β , *c-jun*, sabidamente indutíveis por TNF. Os 3 primeiros genes são sabidamente regulados, pelo menos em parte, via NF- κ B, enquanto *c-jun* é regulado via AP-1.

Conforme demonstrado na figura 6, níveis comparáveis de mRNA do fator de transcrição de IRF-1 e o inibidor de ligação de NF- κ B ao núcleo IKB- β (KARIN e BEN-NERIAH 2000) foram observados nos diferentes clones tratados com TNF (10ng/ml) por 60 minutos. Neste experimento, observamos uma diminuição dos níveis basais de mRNA para KC/N51 nos clones que apresentam expressão mais elevada de mRNA de Tsg-5. Da mesma forma, os níveis de mRNA para KC/N51 em células tratadas com TNF foi menor nos clones com maior expressão do mRNA de Tsg-5. Assim, embora a indução do gene KC/N51 pareça ser comparável em todos os clones comparando os níveis basais e após indução com TNF, parece ocorrer uma diminuição dos níveis totais de mRNA para KC/N51 nos clones com maior expressão de mRNA de Tsg-5.

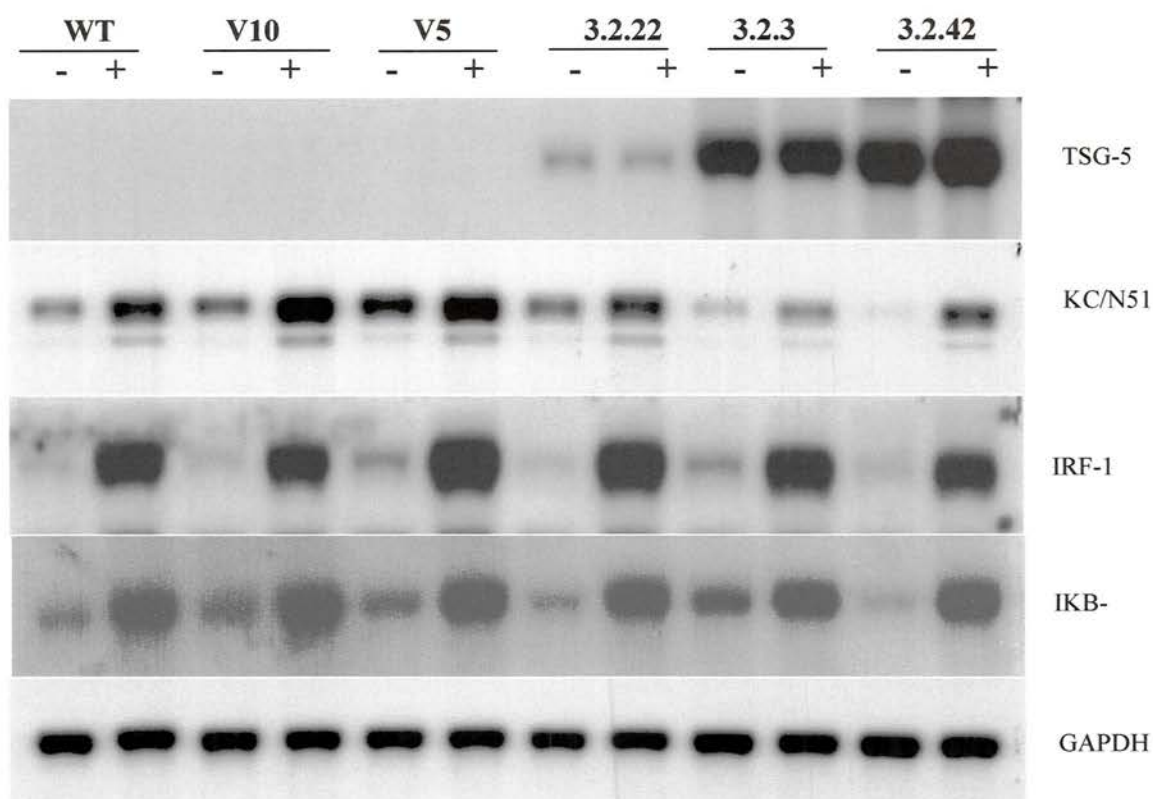


Figura 6: Efeito da expressão de *Tsg-5* na indução de genes por TNF. A figura mostra a análise dos níveis de mRNA, por Northern Blot, para genes induzidos por TNF. Os clones (WT= selvagem, V5 e V10= transfectados com plasmídio vazio, 3.2.22, 3.2.3 e 3.2.42= transfectados com o plasmídio contendo *Tsg-5*) foram tratados (+) ou não (-) com TNF (10ng/ml) durante 60 minutos, em placas de 10cm de diâmetro, em meio DMEM 10% SBF contendo G418. O Northern Blot foi realizado utilizando 15 g do RNA total de cada clone. Após fracionamento por eletroforese em gel, o RNA foi transferido para uma membrana de nylon que foi hibridizada, sucessivamente, com sondas para *Tsg-5*, KC/N51, IRF-1, IKB- e GAPDH.

O gene *c-jun*, que participa da formação do complexo AP-1, também foi utilizado para avaliar a interferência de *Tsg-5* na indução de outros genes também induzidos por TNF.

A figura 7 mostra um experimento de Northern Blot onde as células foram tratadas (+) ou não (-) com TNF (10ng/ml) durante 60 minutos. Foram utilizados 5 clones diferentes, sendo dois vazios (V5 e V10), um clone com média expressão do mRNA de *Tsg-5* (3.2.22) e dois clones com alta expressão do mRNA de *Tsg-5* (3.2.3 e 3.2.42). Observamos uma maior expressão de *c-jun* nos clones com maior expressão de *Tsg-5*, quando comparado aos clones vazios e ao clone com baixa expressão do transgene.

Sendo assim, é possível que a expressão de *Tsg-5* possa interferir na via de AP-1, um fator de transcrição, induzido por TNF, que está envolvido na proliferação celular e em alguns casos de apoptose (KARIN et al. 1997). Outra evidência de que *Tsg-5* possa estar interferindo na via de AP-1 é a de que, conforme descrito por RAMEH e ARMELIN (1992), a expressão de KC pode ser inibida por AP-1, o que estaria em concordância com os resultados observados nas Figuras 6 e 7, onde os clones com maior expressão do mRNA de *Tsg-5* apresentam redução na expressão de KC/N51 e aumento da expressão de *c-jun*.

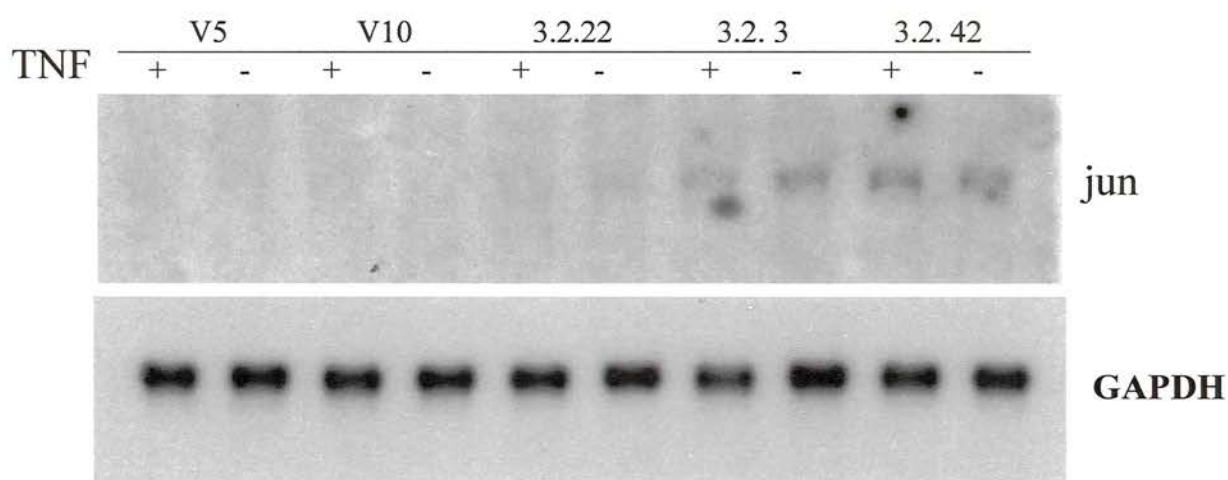


Figura 7: Expressão de *c-jun* em clones transfectados com o transgene *Tsg-5*. A figura representa um Northern Blot de *c-jun*. As células foram tratadas (+) ou não (-) com TNF (10ng/ml) durante 60 minutos. Foram utilizados cinco clones diferentes, dois são vazios (V5 e V10), um possui uma média expressão do mRNA de *Tsg-5* (3.2.22), e dois que possuem uma alta expressão do mRNA de *Tsg-5* (3.2.3 e 3.2.42). Do RNA total extraído, 15 g foram aplicadas em gel de agarose e transferidos para uma membrana de nylon. A membrana foi hibridizada com as sondas de *c-jun* e GAPDH marcadas com ^{32}P - dCTP. Após hibridização a membrana foi exposta contra um filme de raios-X.

5.3 ENSAIO DE ALTERAÇÃO DE MOTILIDADE ELETROFORÉTICA (EMSA)

Embora os níveis de mRNA para IRF-1 e IKB- tenham se mostraram não inalterados quando as células foram estimuladas por TNF, a queda dos níveis basais do mRNA para KC poderia estar relacionada com a expressão de *Tsg-5*. Como já foi demonstrado que NF- B tem um papel importante na regulação da expressão do gene de KC (OHMORI et al. 1995; QUAAZ et al. 1999), passamos a investigar se a ativação de NF- B estaria alterada nos clones que expressam níveis mais elevados de *Tsg-5*.

Na realização dos ensaios de EMSA utilizamos extratos proteicos derivados de clones transfectados com plasmídios vazios ou com inserto de *Tsg-5*. Os diferentes clones foram tratados, ou não, com TNF por 30 minutos ou, para um segundo experimento, tratados ou não com TNF durante vários tempos (15min., 30min., 1h, 2h e 3h), com o objetivo de se determinar a cinética de ativação de NF- B.

Como controles de especificidade da ligação de NF- B ao DNA, foram utilizados oligonucleotídeos frios 10, 50 ou 100 vezes mais concentrados, em relação a molaridade do oligonucleotídeo marcado, e ainda oligonucleotídeos frios mutados (1 e 3 bases mutadas), nas mesmas concentrações dos oligonucleotídeos consenso.

A figura 8 mostra um experimento de "EMSA" utilizando quatro clones, sendo dois clones transfectados com plasmídio vazio (V5 e V6), e dois clones expressando altos níveis de mRNA para *Tsg-5* (3.2.3 e 3.2.42). Os clones foram tratados, ou não, com TNF (10ng/ml) por 30 minutos. Neste experimento observamos que não há uma

diferença significativa entre clones controles, e os clones transfectados com *Tsg-5*, no que diz respeito à ativação de NF- B

Na figura 9 estão representados vários experimentos de "EMSA", utilizando três clones vazios (V2, V5 e V6) e três clones que expressam diferentes níveis de mRNA para *Tsg-5* (3.2.3, 3.2.32, 3.2.42). Uma cinética de indução com TNF foi realizada e, conforme observamos, a ativação de NF- B não se altera nos diferentes clones, transfectados, ou não, com *Tsg-5*. Pudemos observar um pico da atividade de "binding"(ligação) no tempo de 30 minutos.

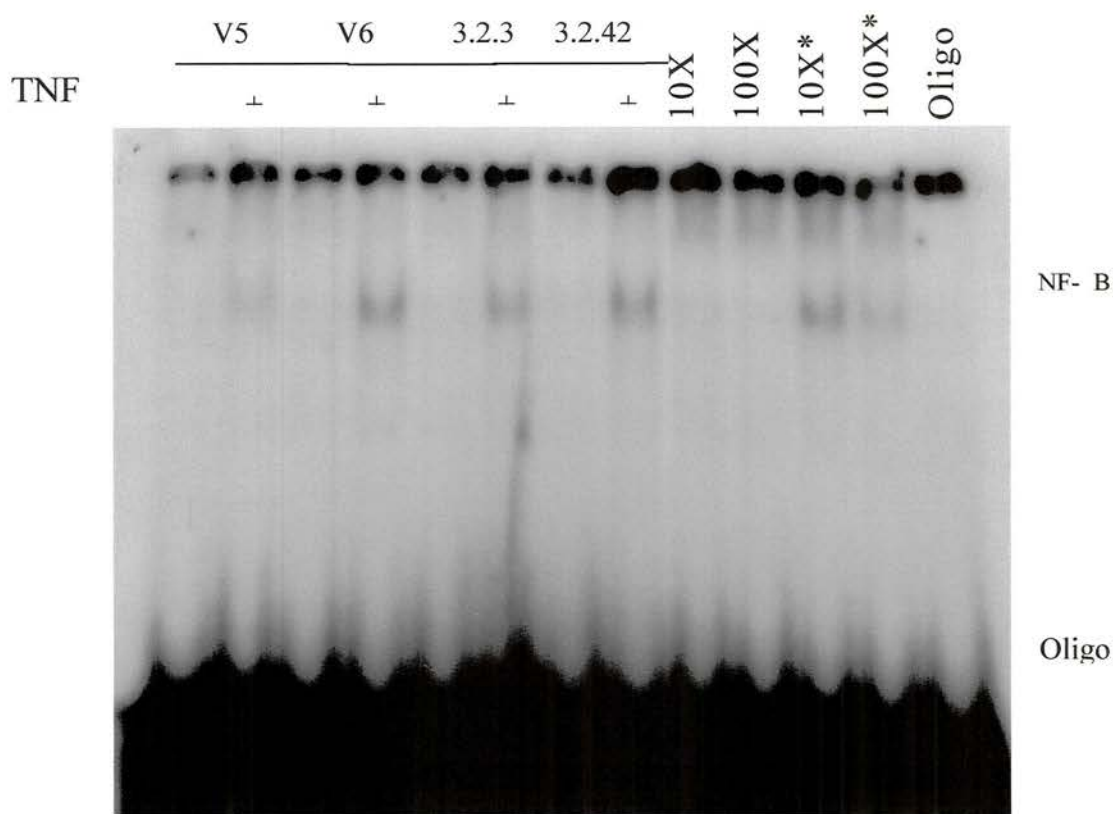


Figura 8: EMSA de clones vazios ou transfectados com o cDNA de *Tsg-5*. A figura mostra um experimento de EMSA realizado com dois clones transfectados com um plasmídio de expressão vazio (V5 e V6) e dois clones transfectados com o plasmídio contendo o cDNA de *Tsg-5* (3.2.3 e 3.2.42). Os clones foram tratados (+) ou não (-) com TNF (10ng/ml) por 30 minutos. A seguir foi feita a extração das proteínas nucleares, e 5 µg de proteína foram incubadas com o oligonucleotídeo marcado e fracionados em gel de poliacrilamida não desnaturante. Após a corrida, o gel era secado e exposto em filme de raios-X por tempo indeterminado. As canaletas identificadas por 10X e 100X correspondem à amostras incubadas com o oligonucleotídeo consenso não marcado, em concentrações 10 e 100 vezes superior à concentração do oligonucleotídeo marcado. As canaletas identificadas por 10X* e 100X* correspondem às amostras incubadas com oligonucleotídeos mutados não marcados em concentrações também de 10 e 100 vezes maiores que as concentrações do oligonucleotídeo consenso marcado.

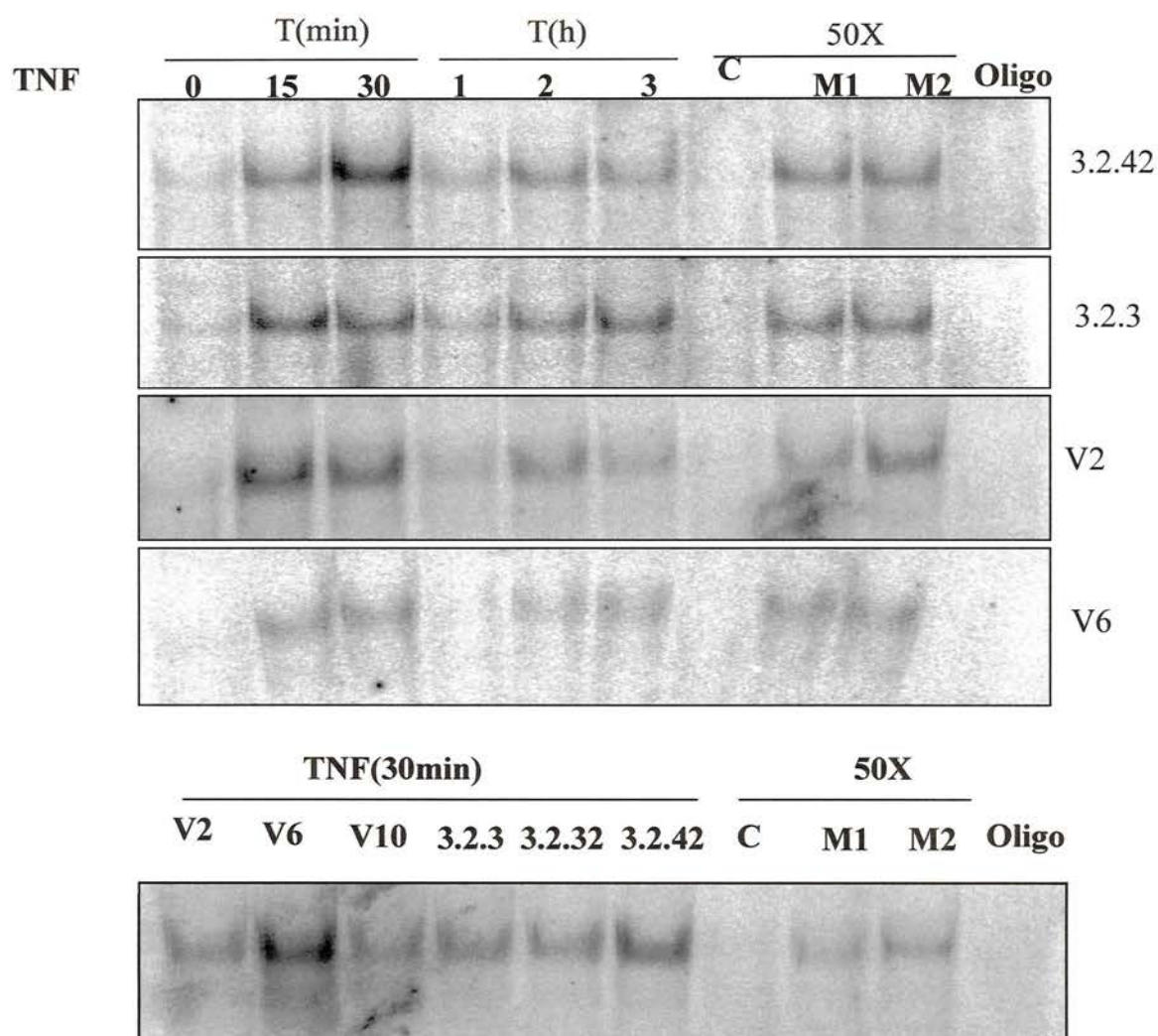


Figura 9: EMSA de clones vazios ou transfectados com *Tsg-5* em diferentes tempos de indução. A figura representa vários experimentos de EMSA realizados com diferentes clones, vazios (V2, V6 e V10) ou transfectados com o cDNA de *Tsg-5* (3.2.3, 3.2.32 e 3.2.42). Uma cinética de indução com TNF (10ng/ml) foi realizada nos diferentes tempos de 15min., 30min., 1hora, 2 horas e 3 horas. Os clones foram cultivados em placas de 10cm de diâmetro, em DMEM 10%e G418, e 5 g foram incubadas com o oligonucleotídeo marcado e fracionados em gel de poliacrilamida nativo. Após a corrida, o gel era secado e exposto em filme de raio-X por tempo indeterminado. Foram utilizados competidores (C, M1 e M2) nas concentrações de 50 vezes mais em relação ao oligonucleotídeo marcado, além de um oligonucleotídeo livre (oligo).

5.4 ENSAIO DE ENTRADA EM S POR INCORPORAÇÃO DE TIMIDINA

TNF possui, entre outras funções, atividade mitogênica (PALOMBELLA et al. 1988), especialmente para células não transformadas (VILCEK et al. 1986). Para avaliar o efeito da expressão de *Tsg-5* sobre a atividade mitogênica de TNF nos diferentes clones, utilizamos o ensaio de entrada em fase S do ciclo celular, visando determinar a síntese de DNA.

Na figura 10 apresentamos os valores relativos de incorporação de timidina, onde o índice de síntese de DNA foi obtido pela razão do valor de incorporação de ^3H -timidina, em CPM, nos clones não estimulados e seus respectivos valores nos clones tratados com TNF (10ng/ml por 12h) (basal/induzido). O gráfico representa a média de quatro experimentos realizados, cada um, em triplicata (total de 12 pontos por clone).

Observa-se uma grande variabilidade entre os clones, não havendo, entretanto, correlação entre os valores para os clones controles ou clones que expressam *Tsg-5*.

As diferentes cores representadas no gráfico indicam os diferentes níveis de expressão de *Tsg-5*, sendo na ordem: clones controles (azuis), clones de baixa expressão de *Tsg-5* (amarelos), clones de média expressão de *Tsg-5* (verdes), e clones de alta expressão de *Tsg-5* (vermelhos).

Como pode ser observado não há coerência na variação do índice de síntese de DNA, assim, nossos dados sugerem que a expressão de *Tsg-5* não interfere na síntese de DNA, e numa possível proliferação celular em resposta ao TNF.

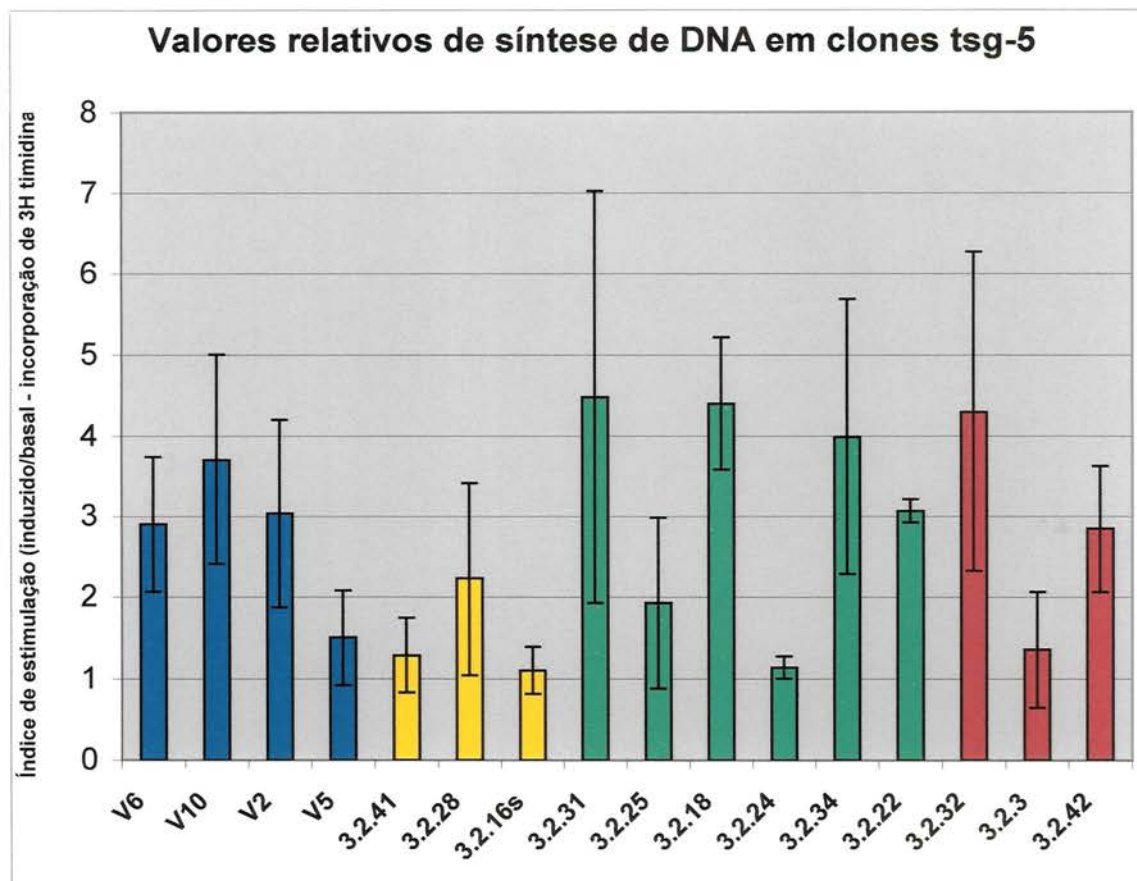


Figura 10: Gráfico de valores relativos de incorporação de timidina em diferentes clones carenciados e tratados com TNF. A figura representa os valores relativos de incorporação de timidina em clones controles ou transfectados com o cDNA de *Tsg-5*. Foram utilizados quatro clones vazios e doze clones transfectados com *Tsg-5*, apresentando diferentes níveis de expressão. A cor azul determina os clones vazios; a cor amarela os clones transfectados com *Tsg-5* e com baixa expressão do mesmo; a cor verde os clones com média expressão de *Tsg-5* e a cor vermelha os clones com alta expressão de *Tsg-5*. O experimento foi realizado com células cultivadas em DMEM 10%, um número aproximado de 7000 células. Após 24 horas do plaqueamento as células foram carenciadas em meio com 0,5% de soro. Passadas 24 horas do carenciamento as células foram tratadas com TNF (10ng/ml), e após 12 horas foi acrescentada ^3H - timidina e a leitura, no cintilador, foi feita após 12 horas de marcação.

5.5 ENSAIO DE APOPTOSE

TNF é uma citocina pró-inflamatória que possui a capacidade de desempenhar uma variedade de funções, dentre elas a capacidade de desencadear o processo de apoptose. Tal processo pode se dar graças ao recrutamento de uma variedade de fatores citoplasmáticos que se ligam aos receptores de TNF. Entre esses fatores, TRADD, FADD, RIP e TRAFs estão sabidamente envolvidos na cascata de eventos que levam à morte celular. Além disso, TNF também é capaz de ativar o fator de transcrição AP-1. Recentemente, foi sugerido que AP-1 pode estar envolvido na ativação da via de apoptose.

Algumas formas de apoptose requerem síntese de proteínas "de novo", e dados sugerem que a atividade de AP-1 é essencial para esta síntese. AP-1 sozinho não é suficiente para desencadear a apoptose, mas sua atividade parece necessária para alguns tipos de células ao iniciarem morte celular (KARIN et.al. 1997). Assim, seria importante determinar se os clones que apresentavam maior expressão de *c-jun* seriam também mais susceptíveis à agentes capazes de induzir apoptose.

Passamos então a investigar a sensibilidade dos diversos clones de células transfectadas e os respectivos controles à drogas que induzem apoptose. Inicialmente foram utilizadas as drogas Veniposídeo (VM26) e Staurosporina. O Veniposídeo é uma droga inibidora de topoisomerase II, atuando no mecanismo de replicação do DNA (HANDE 1998). Já a Staurosporina é uma droga que induz apoptose por pelo menos dois mecanismos, um dependente e outro independente de caspases (BELMOKHTAR et

al. 2001). Como Staurosporina possui uma ação pouco específica e, em nossos ensaios, foi extremamente tóxica, optamos por não utilizá-la em nossos experimentos.

A figura 11 mostra um experimento para determinação do índice de apoptose, calculado pela porcentagem de morte celular, onde foram utilizadas células do tipo selvagem (MEF WT), um clone transfectado com plasmídio vazio (V6) e outro transfectado com o plasmídio com inserto de *Tsg-5* (3.2.42). As células tratadas com VM26 (Veniposídeo) por 16 horas, foram marcadas pela incorporação de Iodeto de Propídio (PI) e analisadas por leitura em FACS. Os experimentos foram realizados em duplicatas ou triplicatas.

Os dados obtidos mostram que, quando tratados com VM26, o clone 3.2.42, que expressa alta concentração de *Tsg-5*, apresenta um maior percentual de morte, ou seja, índice apoptótico relação ao clone controle (V6).

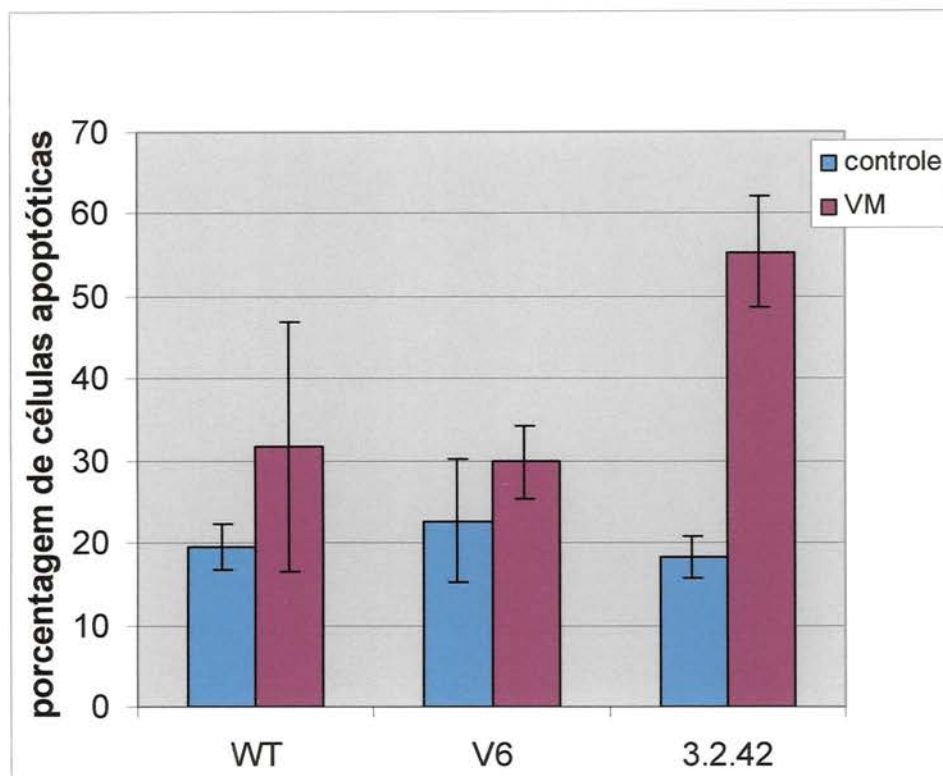


Figura 11: Porcentagem de morte celular em clones transfectados ou não com *Tsg-5*, tratados com VM26. A figura mostra um ensaio de apoptose, com leitura em FACs, após incorporação de iodeto de propídio (PI). As células foram tratadas com VM26 (10 M) por 16 horas. As células foram incubadas com PI e analisadas por citometria de fluxo. WT corresponde à cultura original de fibroblastos murinos imortalizados, V6 corresponde a um clone transfectado com o plasmídeo vazio, e 3.2.42 é um clone transfectado com o cDNA de *Tsg-5*. O experimento foi realizado em triplicata e o valor do desvio padrão está representado.

Pudemos observar também na figura 11, que enquanto o clone controle aumenta seu índice apoptótico em 1,5 vezes, aproximadamente, após tratamento com VM26, o clone 3.2.42 apresentou um aumento de 3 vezes no índice de morte celular.

A figura 12 mostra a utilização de Veniposídeo (VM26) num novo ensaio de indução de apoptose com quatro clones diferentes. Os clones 3.2.28 e 3.2.41 apresentam baixa expressão de *Tsg-5*, e os clones 3.2.42 e 3.2.3 apresentam alta expressão de *Tsg-5*. Os dados mostram que clones com concentrações mais elevadas de *Tsg-5* (3.2.3 e 3.2.42) mostram-se mais sensíveis ao VM26 do que o clone controle (V5).

A figura 13 mostra o resultado de um experimento onde procuramos comparar o efeito de diferentes doses de VM26 na indução de apoptose, buscando assim uma curva de dose-resposta. Para o clone controle (V6) obtivemos um aumento crescente na porcentagem de células em apoptose, proporcional ao aumento da concentração de VM26. Para o clone transfectado com o inserto de *Tsg-5*, houve um aumento inicial na porcentagem de células apoptóticas mas, após 5 M de VM26 foi atingido um platô.

Em conjunto, esses dados sugerem que os clones que expressam *Tsg-5* em concentrações mais elevadas apresentam uma maior sensibilidade ao Veniposídeo (VM26) na indução de morte celular programada.

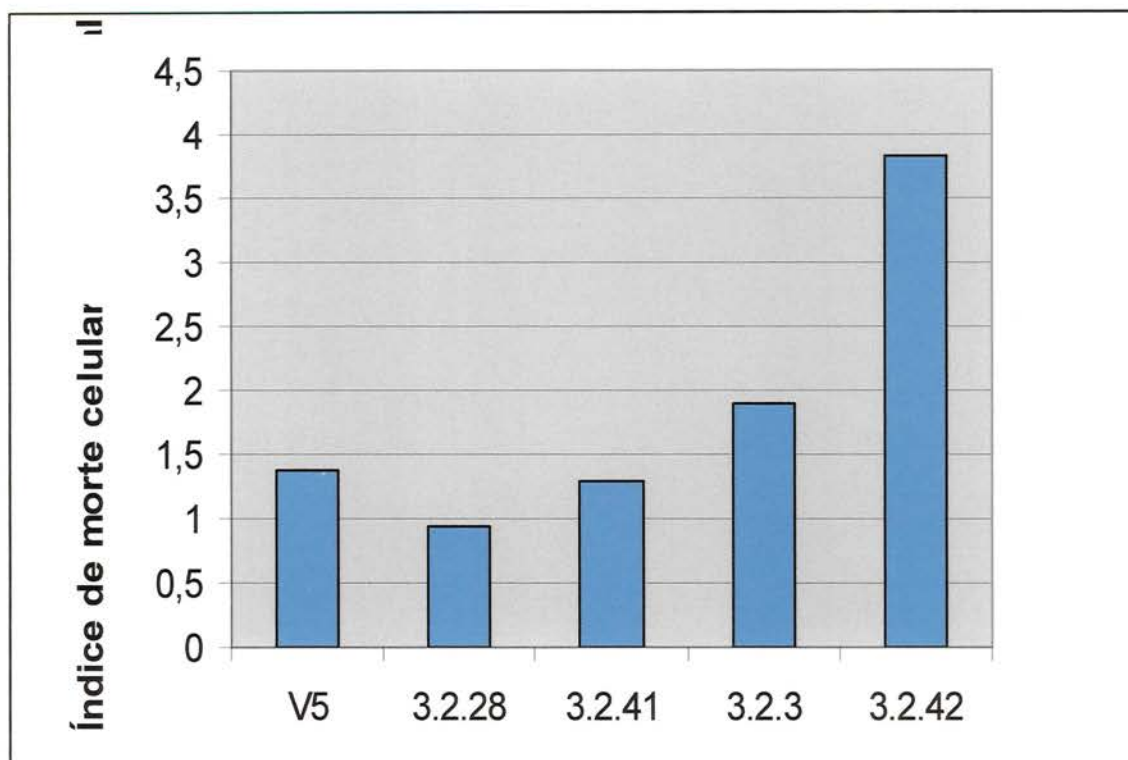


Figura 12: Índice de morte celular em clones com diferentes concentrações da expressão de *Tsg-5*, tratados com VM26. A figura mostra o ensaio de apoptose realizado utilizando clones transfectados com plasmídeo de cDNA de diferentes concentrações da expressão de *Tsg-5*, 3.2.28, 3.2.41, 3.2.3 e 3.2.42, onde os dois últimos possuem uma alta expressão do mRNA de *Tsg-5*. Utilizamos também um clone transfectado com um plasmídeo vazio (V5). A droga utilizada foi o Veniposídeo (VM26), um inibidor de topoisomerase II, na concentração de 10 μ M, durante um tempo de 16 horas. O experimento mostra o índice de morte celular, calculado pelo número de vezes que o mesmo clone aumenta seu índice de morte celular na razão entre seu basal e quando induzido por TNF α . O índice é determinado por leitura em FACs, de cada clone selecionado (induzido/basal). Para a obtenção deste resultado o experimento foi realizado em duplicatas. As células foram cultivadas em DMEM 10% e G418, e tratadas com VM26 e incubadas, a seguir, com iodeto de propídeo (PI), para sua incorporação de detecção de morte celular.

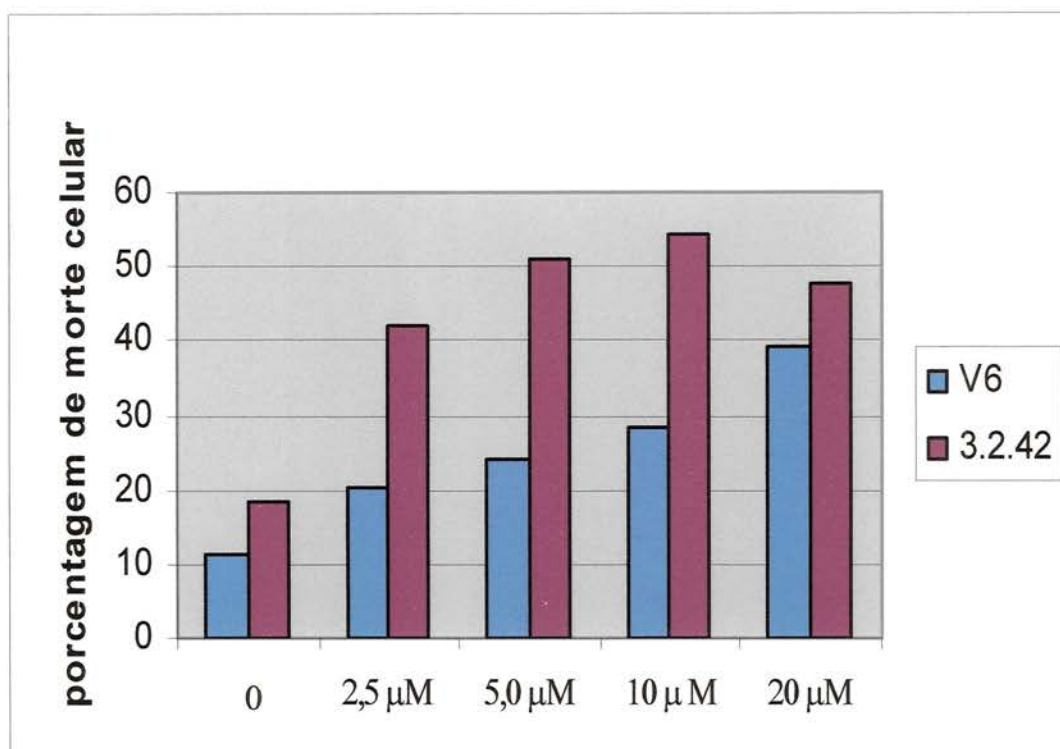


Figura 13: Gráfico de curva dose-resposta ao tratamento com VM26. A figura mostra o ensaio de curva dose resposta para a droga Veniposídeo (VM26). Foi utilizado um clone transfectado com plasmídeo vazio (V6) e um clone transfectado com plasmídeo contendo cDNA de 3 exons de *Tsg-5* (3.2.42). As diluições correspondem a 2,5 M, 5,0 M, 10 M e 20 M da droga veniposídeo. As células foram cultivadas em DMEM 10% e G418 e, após adesão, tratadas com VM26, durante 16 horas. A seguir foram incubadas com iodeto de propídio, para sua incorporação. A leitura é feita em FACs e, através dela, pode ser determinada a porcentagem de morte celular em cada clone, dependente da dose.

6 DISCUSSÃO

O TNF é uma citocina pró-inflamatória que exerce um importante papel na regulação da resposta inflamatória e do sistema imunológico. Desde a sua descoberta, na década de 70 (CARSWELL et al. (1975), vários grupos iniciaram seus estudos na busca do entendimento do seu mecanismo de ação. Uma abordagem importante tem sido a identificação dos novos genes induzidos por TNF. O objetivo principal do nosso trabalho foi caracterizar, funcionalmente, *Tsg-5*, um novo gene murino induzido por TNF, contribuindo assim para uma melhor compreensão do papel fisiológico desta citocina.

Hoje, sabemos que o gene *Tsg-5* está presente no genoma murino e que não possui um ortólogo humano. O gene codifica para um polipeptídeo de 40 aminoácidos que é expresso constitutivamente no timo e no ovário e, em resposta à injeção de LPS, é expresso no baço, no pulmão, e no cérebro (ABRANTES et al. 2002 J Biol Chem submetido).

Para o início da caracterização funcional de *Tsg-5*, optamos por investigar os efeitos da expressão constitutiva de *Tsg-5* na sinalização desencadeada por TNF, e ainda nos dois extremos das atividades biológicas de TNF, atividades mitogênicas e citotóxicas, ambas aparentemente mediadas pelos fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B (KARIN et al. 1997; BALDWIN 2001). Nossa estratégia de trabalho foi desenvolver clones de fibroblastos murinos que expressam *Tsg-5* constitutivamente sob a forma de transgene. Nestes clones, avaliamos o efeito da expressão de *Tsg-5* na ativação de genes

induzidos por TNF, na ativação de NF- κ B, na síntese de DNA em resposta ao TNF e na sensibilidade a agentes indutores de apoptose.

Através de ensaios de hibridização, por Northern Blot, determinamos os níveis de mRNA para alguns genes sabidamente induzidos por TNF como KC, IRF-1, I κ B- α , e c-Jun. Enquanto os 3 primeiros genes são ativados, pelo menos em parte, de forma dependente de NF- κ B (FUJITA et al. 1989; QUAAZ et al. 1999; POPPERS et al. 2000), o ultimo é ativado via AP-1, BAUD e KARIN (2001). Pudemos observar que a expressão de IRF-1 e I κ B- em resposta à TNF não variou nos clones com maior nível de mRNA de *Tsg-5*. No entanto, detectamos uma diminuição nos níveis de mRNA para KC/N51 em clones com maior expressão de *Tsg-5*. Esta diminuição foi mais pronunciada nos níveis basais e é possível que a razão entre os níveis basais e induzidos de KC seja a mesma em clones controles ou que expressam *Tsg-5* na forma de transgene.

Curiosamente, a alteração da expressão de KC parece ser independente de NF- κ B. Como mostrado nas figuras 8 e 9, a ativação de NF- κ B parece ocorrer de forma comparável tanto em clones controles como nos clones transfectados com o transgene, independentemente dos níveis de seus mRNA.

A expressão do gene *c-jun* é regulada pelo complexo AP-1, de qual *c-jun* é também um dos componentes (KARIN et.al. 1997). Como observado na figura 7, os clones com maior expressão do mRNA de *Tsg-5*, 3.2.3 e 3.2.42, tem seus níveis basais de *c-jun* aumentados e não foram detectadas, nesses clones, diferenças entre os níveis basais ou induzidos. Como *jun* é ativado por AP-1, a expressão de *Tsg-5* poderia estar desecandeando um "loop" que levaria a um acúmulo de *jun* nestes clones.

Segundo RAMEH e ARMELIN (1992), os níveis de mRNA para KC podem ser modulados pela ação do complexo AP-1. São correlacionados os níveis elevados de AP-1 em células tratadas com glicocorticóides, com níveis reduzidos de mRNA para KC (ARMELIN et al. 1996). Através desses achados, RAMEH e ARMELIN (1992) sugeriram que o aumento da expressão de AP-1 interfere na expressão de KC, diminuindo seus níveis de mRNA.

Assim, este conjunto de experimentos sugerem que os elevados níveis de mRNA de Tsg-5 poderiam estar relacionados com um aumento dos níveis de AP-1, o que seria responsável pelo aumento nos níveis basais de mRNA para *c-jun*, e, ainda, pela diminuição dos níveis basais de mRNA para KC.

Para produzir e manter a intrincada organização de organismos multicelulares, as células precisam obedecer a controles que regulam sua proliferação, diferenciação, ou morte. Em um dos extremos da ação de TNF está sua capacidade de induzir a proliferação celular e, no outro extremo, sua capacidade em induzir morte celular, quer seja por apoptose ou por necrose. Interessante notar que os mesmos componentes das vias de sinalização desencadeadas por TNF podem participar desses eventos aparentemente antagônicos, proliferação celular e apoptose (PALOMBELLA e VILCEK 1989). Assim, a ligação de TNF- aos seus receptores (TNFR1 e TNFR2) causa a ativação de dois principais fatores de transcrição, AP-1 e NF- B, os quais induzem genes envolvidos não apenas na resposta inflamatória, mas também, estão envolvidos na proliferação celular e/ou apoptose (KUWANO e HARA 2000). O fator de transcrição AP-1, por exemplo, pode induzir proliferação celular e também, está envolvido em algumas formas de apoptose, como as que exigem síntese de proteínas "de novo"

(KARIN et.al. 1997). Assim estudamos esses dois extremos da atividade biológica do TNF nos clones transfectados com o mRNA de *Tsg-5*.

Para a detecção do índice de síntese de DNA realizamos ensaios de incorporação de timidina. Neste ensaio as células foram cultivadas em ausência de soro para sincronização em G0, ou estado de quiescência. A carência do soro significa carência de fatores de crescimento. Assim as células entram todas numa mesma fase do ciclo, G0, a fase de repouso. O ciclo celular é retomado quando fatores de crescimento são novamente adicionados ao meio de cultura (VILCEK et al. 1986)

Os nossos resultados sugerem que não há correlação entre o índice de síntese de DNA, em resposta a TNF, e a expressão de *Tsg-5*. Diferentes clones, transfectados, ou não, com *Tsg-5*, apresentaram variação em sua síntese de DNA não relacionada com o nível de expressão do transgene.

Esses dados sugerem que *Tsg-5* não interfere nos mecanismos que governam a síntese de DNA, sendo assim estão em acordo com a observação de que a atividade de NF- κ B, um dos responsáveis pela ativação de uma importante via de proliferação celular desencadeada por TNF, é comparável em todos os clones testados.

O receptor 1 de TNF (TNFR1) desempenha, dentre outras atividades a capacidade de induzir morte celular. Esta atividade se dá através do recrutamento de diversas proteínas que passam a interagir com o seu domínio TRADD (TNFR1 associated death domain). Entre essas proteínas estão: RIP1, FADD e TRAF2, e ativador de MAPKinases. O mecanismo de ativação de apoptose por TNF, como já mencionado, envolve a ativação de enzimas proteolíticas denominadas caspases (BAUD e KARIN 2001). Já os mecanismos de morte celular que utilizam a via de sinalização dependente

de AP-1 parecem ser mediados por serina-treonina quinases como p38 e JNK (BAUD e KARIN 2001). E NF- κ B é capaz de regular, negativamente, JNK, garantindo citoproteção (DE SMAELE et al. 2001).

Como descrito anteriormente, a ativação de AP-1 parece ser um passo necessário para os mecanismos de morte celular (KARIN et.al. 1997). Assim, seria possível imaginar que os clones com maior expressão de AP-1 (figura 7) poderiam ter uma maior sensibilidade à estímulos apoptóticos.

Para testar esta hipótese, tratamos diversos clones controles ou que expressam diferentes níveis de mRNA para *Tsg-5* com a droga VM26 (Veniposídeo), um inibidor de topoisomerase II, que impede a replicação do DNA, levando à morte celular. Os dados obtidos em nossos estudos (Fig 11;12 e 13) mostraram que os clones com um alto nível de expressão do mRNA de *Tsg-5*, apresentam um maior percentual de células apoptóticas em relação aos clones controle, podendo chegar a um índice de quase 3 vezes mais apoptose que os clones controles. Os experimentos foram realizados com diferentes clones, o que torna menos provável a possibilidade de uma variação clonal. Especialmente na Figura 13, onde realizamos uma curva dose-resposta, podemos observar uma diferença importante na sensibilidade entre o clone controle e clone que expressa o transgene. Enquanto no primeiro a atividade da droga não chega a atingir o máximo de resposta na concentração de 20 M, no clone que expressa *Tsg-5* a droga atinge o máximo de atividade com 5,0 M.

Vale mencionar que experimentos em nosso laboratório demonstraram que a expressão de *Tsg-5* no ovário é regulada por TNF, uma vez que em camundongos deficientes para TNF ou para o TNFR1, a expressão de *Tsg-5* está comprometida

(ABRANTES et al. 2002 J Biol Chem submetido). Por imunohistoquímica, foi demonstrado que a expressão de *Tsg-5* está localizada nas células epiteliais do folículo e que os níveis de expressão constitutiva de *Tsg-5* no ovário são maiores durante a fase de maturidade sexual dos camundongos (ABRANTES et al. 2002 J Biol Chem submetido). Assim, seria possível especular que, no ovário, a expressão de *Tsg-5* poderia estar associada ao controle de morte celular que regula o processo involutivo dos folículos.

7 CONCLUSÕES

O gene de *Tsg-5* parece não interferir na indução de genes por TNF, como demonstrado pra IRF-1 e I κ B- .

A expressão basal do gene KC/N51 está bastante diminuída em dois clones que expressam maiores níveis de mRNA para *Tsg-5*. Os níveis de mRNA para KC/N51 em células tratadas com TNF também estão diminuídos, quando comparados com os demais clones também estimulados com TNF. No entanto, a relação entre os níveis de mRNA para *Tsg-5* nas células controle/células induzidas parece ser o mesmo em todos os clones.

Nos mesmos clones em que observamos a redução nos níveis basais ou induzidos de KC/N51, observamos uma elevada expressão basal de *c-jun*. Esses dados poderiam indicar que uma elevada expressão de *Tsg-5* poderia levar a um aumento de AP-1.

O gene de *Tsg-5* não interfere na ativação de NF- B por TNF.

O gene de *Tsg-5* não interfere na síntese de DNA estimulada por TNF.

Os mesmos clones que apresentaram maiores níveis de *c-jun* apresentaram também uma maior sensibilidade à VM26, um indutor de apoptose. Esses dados poderiam estar relacionados ao aumento dos níveis de AP-1.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. **Cellular and molecular immunology**. 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1997. p.249-77: Cytokines.

Abdollahi A, Lord KA, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. Interferon regulatory factor 1 is a myeloid differentiation primary response gene induced by interleukin 6 and leukemia inhibitory factor: role in growth inhibition. **Cell Growth Differ** 1991; 2:401-7.

Abrantes, E. F. Pires, E. G., Carvalho, A. F., Falconi, F. C., Savino, W., Reis, L. F. L. 2002. Identification, structural characterization, and tissue distribution of *Tsg-5*: a new TNF- stimulated gene. **J. Biol. Chem.** Submitted

Aggarwal BB, Samanta A, Feldman M. TNF receptors. In: Oppenheim JJ, Feldmann M, editors. **Cytokine reference**. New York: Academic Press; 2001. p.1619-32.

Amarante-Mendes GP, Green DR. The regulation of apoptotic cell death. **Braz J Med Biol Res** 1999; 32:1053-61.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. **Molecular biology of the cell**. 3rd ed. New York: Garland Pu; 1994. p.863-910: The cell-division cycle.

Armelin MC, Oliveira ML, Mercado JM, Sasahara RM, Valentini SR, Carvalho LH. Molecular genetic approach to cell proliferation control and neoplasia. **Braz J Med Biol Res** 1996; 29:911-9.

Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-KB. **J Clin Invest** 2001; 107:241-6.

Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and relatives. **Trends Cell Biol** 2001; 11:372-7.

Belmokhtar CA, Hillion J, Segal-Bendidjian E. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. **Oncogene** 2001; 20:3354-62.

Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. **Science** 1985; 229:869-71.

Brouckaert P, Fiers E. Tumor necrosis factor and inflammatory response syndrome. **Curr Top Microbiol Immunol** 1996; 216:167-87.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci USA** 1975; 72:3666-70.

Cidlowski JA, King KL, Evans-Storms RB, Montague JW, Bortner CD, Hughes FM Jr. The biochemistry and molecular biology of glucocorticoid-induced apoptosis in the immune system. **Recent Prog Horm Res** 1996; 51:457-91.

Church GM., Gilbert W. Genomic sequencing. **Proc Natl Acad Sci USA** 1984; 81:1991-95.

De Smaele E, Zazzeroni F, Papa S, et al. Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. **Nature** 2001; 414:308-13.

Erickson SL, de Sauvage FJ, Kikly K, et al. Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. **Nature** 1994; 372:560-3.

Faouzi S, Burckhard BE, Hanson JC, et al. Anti-fas induces hepatic chemokines and promotes inflammation by an NF-KB-indepdent caspase-3-dependent pathway. **J Biol Chem** 2001; 276:49077-82.

Fujita T, Reis LF, Watanabe N, Kimura Y, Taniguchi T, Vilcek J. Induction of the transcription factor IRF-1 and interferon-beta mRNAs by cytokines and activators of second-messenger pathways. **Proc Natl Acad Sci USA** 1989; 86:9936-40.

Gorczyca W, Gong J, Darkynkiewicz Z. Detection of DNA strand in individual apoptotic cell the in situ terminal deoxynucleodityl transferase and nick translation assays. **Cancer Res** 1993a; 538:1945-51.

Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. [Programmed death of cells] [Abstract]. **Patol Pol** 1993b; 44:113-9.

Gray PW, Aggarwal BB, Benton CV, Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. **Nature** 1984; 312:721-4.

Hande KR. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. **Eur J Cancer** 1998; 34:1514-21.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. **Nature** 2000; 407:770-6.

Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, et al. Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998; 95:7556-61.

Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. **J Biol Chem** 1995; 270:16483-6.

Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. **Curr Opin Cell Biol** 1997; 9:240-6.

Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. **Annu Rev Immunol** 2000; 18:621-63.

Krammer PH. CD 95's deadly mission in the immune system. **Nature** 2000; 407:789-95.

Kuwano K, Hara N. Signal transduction pathways of apoptosis and inflammation induced by the tumor necrosis factor receptor family. **Cell Mol Biol** 2000; 22:147-9.

Le J, Reis LF, Vilcek J. Tumor necrosis factor and interleukin 1 can act as essential growth factors in a murine plasmacytoma line. **Lymphokine Res** 1988; 7:99-106.

Lee EG, Boone DL, Chai S, et al. Failure to regulate TNF-induced NF-KB and cell death responses in A-20-deficient mice. **Science** 2000; 289:2350-3.

Marino MW, Dunn A, Grail D, et al. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997; 94:8093-8.



Miyamoto M, Fujita T, Kimura Y, et al. Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor IRF-1 that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. **Cell** 1988; 54:903-13.

Ohmori Y, Fukumoto S, Hamilton TA. Two structurally distinct kappa B sequence motifs cooperatively control LPS-induced KC gene transcription in mouse macrophages. **J Immunol** 1995; 155:3593-600.

Palombella VJ, Mendelsohn J, Vilcek J. Mitogenic action of tumor necrosis factor in human fibroblasts: interaction with epidermal growth factor and platelet-derived growth factor. **J Cell Physiol** 1988; 135:23-31.

Palombella VJ, Vilcek J. Mitogenic and cytotoxic actions of tumor necrosis factor in BALB/c 3T3 cells. **J Biol Chem** 1989; 264:18128-36.

Perkins ND. The Rel/NF-KB family: friend and foe. **TIBS** 2000; 25:434-40.

Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, et al. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock yet succumb to L monocytogenes infection. **Cell** 1993; 73:457-67.

Poppers DM, Schwenger P, Vilcek J. Persistent tumor necrosis factor signaling in normal human fibroblasts prevents the complete resynthesis of IKB- . **J Biol Chem** 2000; 275:29587-93.

Quaaz L, Li M, Beg AA. A critical role for the Rel A subunit of nuclear factor Kappa B in regulation of multiple immune response genes and in fas-induced cell death. **J Exp Med** 1999; 189:999-1004.

Rameh LE, Armelin MC. Downregulation of JE and KC genes by glucocorticoids does not prevent to G0/G1 transition in Balb/3T3 cells. **Mol. Cell. Biol** 1992; 12: 4612-21.

Reis LF, Le JM, Hirano T, Kishimoto T, Vilcek J. Antiviral action of tumor necrosis factor in human fibroblasts is not mediated by B cell stimulatory factor 2/IFN-beta 2 and is inhibited by specific antibodies to IFN-beta. **J Immunol** 1988; 140:1566-70.

Reis LF, Lee TH, Vilcek J. Tumor necrosis factor acts synergistically with autocrine interferon- and increases interferon- mRNA levels in human fibroblasts. **J Biol Chem** 1989; 264:16351-4.

Reis LF, Harada H, Wolchok JD, Taniguchi T, Vilcek J. Critical role of a common transcription factor, IRF-1, in the regulation of IFN-beta. **J Immunol** 1992; 140:1566-70.

Reis LF, Ruffner H, Stark G, Aguet M, Weissmann C. Mice devoid of interferon regulatory factor 1 IRF-1 show normal expression of type I interferon genes. **EMBO J** 1994; 13:4798-806.

Reisser D, Pance A, Jeannin JF. Mechanisms of the antitumoral effect of lipid A. **Bioessays** 2002; 24:284-9.

Rich T, Allen RL, Wyllie AH. Defying death after DNA damage. **Nature** 2000; 407:777-83.

Rothe J, Lesslauer W, Lotscher H, et al. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF- mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. **Nature** 1993; 364:798-802.

Rubin BY, Anderson SL, Lunn RM, et al. Tumor necrosis factor and IFN induce a common set of proteins. **J Immunol** 1988; 141:1180-4.

Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death *Nature* 2000; 407:784-8.

Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. **Oncogene** 2001; 20:2390-400.

Silva AM, Pires EG, Abrantes EF, Ferreira LR, Gazzinelli RT, Reis LF. Application of the differential display RT-PCR strategy for the identification of inflammation-related mouse genes. **Braz J Med Biol Res** 1999; 32 845-52.

Spencer W, Kwon H, Crépieux P, Leclerc N, Lin R, Hiscott J. Taxol selectively blocks microtubule dependent NF-KB activation by phorbol ester via inhibition of IKB-phosphorulation and degradation. **Oncogene** 1999; 18:495-505.

Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. **Science** 1995; 267:1445-9.

Tang G, Minemoto Y, Dibling B, et al. Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. **Nature** 2001; 414:313-7.

Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. **Immunol Today** 1992; 13:151-3.

Tartaglia LA, Rothe M, Hu YF, Goeddel DV. Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. **Cell** 1993; 73:213-6.

Vilcek J, Palombella VJ, Henriksen-DeStefano D, et al. Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. **J Exp Med** 1986; 163:632-43.

Vogt PK. Jun the oncoprotein. **Oncogene** 2001; 20:2365-77.

Wagner EF. AP-1-Introductory remarks. **Oncogene** 2001; 20:2334-5.

Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-KB pathway in the treatment of inflammation and cancer. **J Clin Invest** 2001; 107:135-42.

Yuan J. Transducing signals of life and death. **Curr Opin Cell Biol** 1997; 9:247-51.