

Larissa Cardoso Zanetti

**MODULAÇÃO GÊNICA DE *RIPK3* E *MLKL* E SEU IMPACTO NA
SENSIBILIDADE A MORTE POR NECROPTOSE**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de
Ciências da Saúde Albert Einstein para
obtenção do Título de Doutora em Ciências
da Saúde.

São Paulo

2021

Larissa Cardoso Zanetti

**MODULAÇÃO GÊNICA DE *RIPK3* E *MLKL* E SEU IMPACTO NA
SENSIBILIDADE A MORTE POR NECROPTOSE**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de
Ciências da Saúde Albert Einstein para
obtenção do Título de Doutora em Ciências
da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Weinlich

São Paulo

2021

Zanetti, Larissa Cardoso

Modulação gênica de RIPK3 e MLKL e seu impacto na sensibilidade a morte por necroptose / Larissa Cardoso Zanetti. -- São Paulo, 2021.
xvii, 104 f.

Tese (Doutorado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Gene modulation of RIPK3 and MLKL and its impact in the sensibility to death by necroptosis.*

1. MLKL [não DeCS]. 2. RIPK3 [não DeCS]. 3. Regulação da expressão gênica. 4. Fatores de transcrição. 5. Necroptose.

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Larissa Cardoso Zanetti

**MODULAÇÃO GÊNICA DE *RIPK3* E *MLKL* E SEU IMPACTO NA
SENSIBILIDADE A MORTE POR NECROPTOSE**

Presidente da banca: Prof. Dr. Ricardo Weinlich

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Profa. Dra. Andrea Laurato Sertie

Profa. Dra. Caroline Serrano do Nascimento

Profa. Dra. Clarissa Ribeiro Reily Rocha

Membros suplentes:

Prof. Dr. Welbert de Oliveira Pereira

Profa. Dra. Raquel de Melo Alves Paiva

Aprovada em: 04/08/2021.

Dedicatória

Ao meu avô João que sempre foi exemplo de alegria e trabalho duro. Ele que sempre brincava “Eu fui criado na enxada e meus neto na caneta”. O senhor não está mais aqui, mas esse título é para você, Vori.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por todas as oportunidades que tive pelo caminho e por toda força ao longo de todos esses anos.

Aos meus pais que sempre me apoiaram em todas as etapas e sempre me deram acesso a educação. Principalmente você mãe, sem você eu não estaria aqui hoje. A minha tia Maria que sempre me ajudou.

Ao meu orientador Ricardo que sempre foi mais do que apenas um orientador, foi um amigo, um conselheiro, soube ouvir, soube ser humano e sempre me direcionar o melhor caminho tanto na vida profissional quanto na vida pessoal. Sou imensamente grata por ter te encontrado nesta jornada, meu eterno obrigada por tudo que me ensinou, você é um ser humano incrível e eu te admiro muito. Espero levar essa amizade para vida toda.

Ao laboratório do Dr. Richard Sherwood por ter me acolhido e ter me ensinado tanta coisa em um ano. Especialmente Minsun e Ersin, sem vocês eu não teria conseguido. *Thank you very much guys!*

A todos os funcionários do Hospital Israelita Albert Einstein envolvidos direta ou indiretamente na realização desse projeto: o pessoal do Núcleo de Apoio ao Pesquisador, biblioteca e equipe Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, em especial à Martinha e a Cléia por todo companheirismo e trabalho duro, e a Bruna por todo apoio na citometria. A coordenação da pós-graduação, em especial a Laudiceia e a Jaci, sempre muito prestativas.

Aos colegas de grupo, da sala de alunos e de laboratório por dividirem comigo todos os altos e baixos da vida acadêmica, principalmente a Ariane por ter tido a determinação de continuar alguns experimentos, a Giulia Maria pelo tempo dedicado a iniciação científica e ao David por ter compartilhado comigo tantas horas de bancada e desespero.

Aos meus amigos que me aturaram todas as vezes que eu surtei durante esse doutorado, principalmente Anna, Letícia, Lana, Isadora e Marielton.

A Pro-UNIEMP (número processo: 2620-16) pelo apoio financeiro inicial.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para realização deste estudo (processo:

2017/25009-1) e pela bolsa estágio de pesquisa no exterior – BEPE (processo: 2019/13813-6).

A todos que cruzaram meu caminho e contribuíram para meu conhecimento científico ou me fizeram de certa forma aprender e evoluir como ser humano.

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xiii
Lista de abreviaturas	xiv
Resumo	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Necroptose: uma nova rota de morte celular.....	1
1.2 Processos fisiopatológicos envolvendo RIPK3 e MLKL.....	3
1.3 Modulação da expressão de RIPK3 e MLKL altera a sensibilidade à necroptose	5
1.4 Regulação transcricional de <i>RIPK3</i> e <i>MLKL</i> : um novo horizonte a ser explorado.....	7
1.5 Regulação da transcrição gênica: componentes cis-regulatórios e as etapas que regem a expressão dos genes	9
1.6 Fatores de transcrição: atuação dos fatores trans-regulatórios que orquestram a expressão gênica	12
1.7 Via de sinalização do interferon.....	14
1.8 Edição genômica e a técnica de CRISPR-Cas9.....	15
1.9 Objetivos.....	18
2 MÉTODOS	20
2.1 Análise <i>in silico</i> dos promotores de <i>RIPK3</i> e <i>MLKL</i>	20
2.1.1 Análise <i>in silico</i> dos promotores de <i>RIPK3</i> e <i>MLKL</i> e dos fatores de transcrição.....	20
2.2 Amplificação, clonagem e purificação dos construtos	24
2.2.1 Desenho dos oligonucleotídeos para clonagem	24
2.2.2 Extração de DNA genômico	26
2.2.3 Reação em cadeia da polimerase	26
2.2.4 Gel de agarose	27
2.2.5 Estratégia de clonagem	27
2.2.6 Digestão do vetor pGL4.20 [LUC2/Puro] e dos insertos amplificados via reação em cadeia da polimerase	27
2.2.7 Ensaio de ligação e transformação do vetor pGL4.20 [LUC2/Puro] e os diferentes insertos de <i>RIPK3</i> e <i>MLKL</i>	28

2.2.8 Validação do ensaio de ligação: <i>screening</i> das colônias que continham o construto esperado	30
2.2.9 Sequenciamento Sanger	30
2.2.10 Transformação em células competentes pelo método de choque térmico	31
2.2.11 Purificação de vetores	32
2.3 Ensaios de responsividade celular frente aos estímulos moduladores da expressão de <i>MLKL</i>	32
2.3.1 Cultivo celular	32
2.3.2 Estímulos moduladores de <i>RIPK3</i> e <i>MLKL</i>	33
2.3.3 Extração e quantificação de proteínas	33
2.3.4 <i>Western Blot</i>	34
2.3.5 Extração de RNA	35
2.3.6 Transcrição reversa	36
2.3.7 Análise da expressão gênica de <i>RIPK3</i> e <i>MLKL</i> pela reação de PCR em tempo real	36
2.4 Medidas de atividade do promotor	38
2.4.1 Transfecção celular por Lipofectamina 3000	38
2.4.2 Ensaios de Luciferase para avaliar atividade da região promotora	38
2.4.3 Ensaio de marcação intracelular para interferon gama por citometria de fluxo	39
2.5 Intervenção farmacológica nas vias de sinalização potencialmente envolvidas na modulação de <i>MLKL</i>	40
2.6 CRISPR <i>screening</i> – mapeamento das regiões regulatórias do promotor de <i>MLKL</i> murino	41
2.6.1 Inserção de GFP no gene de <i>MLKL</i> murino	42
2.6.1.1 Desenho do RNA guia para inserção de GFP no gene de <i>MLKL</i> murino	42
2.6.1.2 Clonagem do gRNA no vetor p2T-U6-sg2XBbsI-FE-HygroR	44
2.6.1.3 Desenho de <i>primers</i> para inserção de GFP no gene de <i>MLKL</i>	45
2.6.1.4 Amplificação dos braços homólogos de GFP	47
2.6.1.5 Nucleoporação	48
2.6.1.6 Citometria de fluxo e <i>Sorting</i>	48
2.6.2 Biblioteca de CRISPR	48
2.6.2.1 Desenho da biblioteca: CRISPR-Cas9 e CRISPRi	48
2.6.2.2 Clonagem das bibliotecas	52
2.6.2.3 Células MEF <i>MLKL</i> -GFP expressando Cas9	56

2.6.2.4 Produção de lentivírus	56
2.6.2.5 Infecção das células MEF com a biblioteca de CRISPR-Cas9 ou CRISPRi e <i>sorting</i> das células GFP negativas	57
2.6.2.6 Análise de dados	58
2.6.3 Validação dos gRNAs.....	60
2.7 CRISPR-Cas9: biblioteca de fator de transcrição	61
2.8 Análises estatísticas	62
2.9 Aspectos éticos e apoio financeiro	62
3 RESULTADOS	63
3.1 Responsividade das células alvo aos estímulos interferon gama e beta: indutores da expressão de <i>MLKL</i>	63
3.1.1 Responsividade do gene <i>MLKL</i> murino ao interferon gama	63
3.1.2 Responsividade do gene murino de <i>MLKL</i> ao interferon beta.....	65
3.2 Amplificação dos insertos para clonagem	67
3.3 Ensaios de Luciferase para medir atividade da região promotora.....	68
3.3.1 Atividade promotora basal do promotor de <i>MLKL</i> murino.....	68
3.3.2 Atividade promotora induzida por interferon gama	70
3.4 Vias de sinalização potencialmente envolvidas na regulação de <i>MLKL</i> murino	73
3.4.1 A regulação transcricional de <i>MLKL</i> murino por lipofectamina é inibida por <i>Ruxolitinib</i>	75
3.4.2 Responsividade dos fatores de transcrição ao estímulo por interferon gama	76
3.5 CRISPR <i>screening</i>	77
3.5.1 Correlação dos dados das bibliotecas de CRISPR	77
3.6 Resultados do Mageck e mapeamento dos RNAs guia	79
3.7 Validação dos RNAs guias selecionados	81
3.8 <i>Screening</i> da biblioteca de fatores de transcrição	82
4 DISCUSSÃO	84
5 CONCLUSÕES	92
6 REFERÊNCIAS	93
Abstract	
Apêndices	

Lista de figuras

Figura 1. Sinalização molecular após o estímulo por TNF	3
Figura 2. Regulação da transcrição gênica.....	11
Figura 3. Ligação do fator de transcrição ao DNA	13
Figura 4. Sistema CRISPR-Cas9.....	16
Figura 5. Predição da região promotora de MLKL murino	22
Figura 6. Ilustração da posição dos <i>primers</i> adotado para a clonagem de porções crescentes do possível promotor do gene MLKL murino.....	24
Figura 7. Mapa do vetor pGL4.20[luc2/puro] (promega)	28
Figura 8. Desenho experimental para clonagem	29
Figura 9. Esquema do <i>workflow</i> dos experimentos de vias de sinalização	41
Figura 10. Sequência do primeiro par de braços homólogos utilizados para fazer a inserção de gfp no gene de mMLKL	46
Figura 11. Dados de UCSC da versão genômica mm10	49
Figura 12. Dados de UCSC da versão genômica mm9	50
Figura 13. <i>Workflow</i> experimental dos screening com CRISPR-Cas9 e CRISPRi	58
Figura 14. Expressão de MLKL em células MEF e NIH3T3 após estímulo com IFN- γ	64
Figura 15. Expressão de MLKL em células MEF e NIH3T3 após estímulo com IFN- β	66
Figura 16. Análise dos amplicons das reações de PCR para amplificação das regiões do promotor de mMLKL	67
Figura 17. Atividade promotora basal de <i>MLKL</i> murino.....	69
Figura 18. Atividade promotora basal dos novos construtos	70
Figura 19. Atividade promotora induzida por IFN- γ	71
Figura 20. Marcação intracelular de IFN- γ em células transfectadas com lipofectamina 3000	72
Figura 21. Inibição da upregulação de <i>MLKL</i> por diferentes inibidores de vias de sinalização.....	74
Figura 22. Avaliação da expressão de MLKL em células transfectadas ou não com lipofectamina 3000	75
Figura 23. Expressão e/ou ativação de alguns fatores de transcrição.....	77
Figura 24. Correlação de Spearman dos dados da biblioteca de CRISPR <i>screening</i> para o promotor de <i>mMLKL</i> (sub-biblioteca A)	78

Figura 25. Correlação de Spearman do <i>screening</i> da biblioteca de CRISPRi (Sub-biblioteca B).....	79
Figura 26. Mapeamento dos gRNAs enriquecidos na análise dos resultados de mageck de CRISPR <i>screening</i> da biblioteca do promotor de <i>mMLKL</i>	80
Figura 27. Validação individual dos gRNA.....	82
Figura 28. Resultado do mageck da biblioteca de fator de transcrição	83

Lista de tabelas

Tabela 1. Exemplos do envolvimento da necroptose em modelos experimentais de patologias	4
Tabela 2. Sequências de referências utilizadas para os genes e para o mRNA de <i>RIPK3</i> e <i>MLKL</i> humano e murino	20
Tabela 3. Sequência dos <i>primers</i> utilizados para clonagem	25
Tabela 4. Sequência dos <i>primers</i> utilizados para qPCR	37
Tabela 5. Sequência dos gRNA escolhidos para validação individual	60

Lista de abreviaturas

3T3 SA	Fibroblasto embrionário murino (<i>Embryonic Fibroblast from Swiss Albin Mouse</i>)
BCR B	Receptor de célula B (<i>B cell receptor</i>)
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
cFLIP	<i>CASP8 and FADD-like apoptosis regulator</i>
CHIP	Imunoprecipitação de cromatina
cIAP	Inibidor celular de apoptose (<i>Cellular inhibitor of apoptosis</i>)
CMV	Citomegalovírus
CRISPR	Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente inter espaçadas (<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>)
CRISPRi	CRISPR por interferência
CT	<i>Cycle Threshold</i>
CYLD	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase</i>
DAI	<i>DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors</i>
DBD	Sítio de ligação ao DNA (<i>DNA bind domain</i>)
DD	Digestão dupla
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DNMT1	DNA metil-transferase
DNTP	Deoxirribonucleotídeo
DS	Digestão simples
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FasL	Fas Ligante (<i>Fas ligand</i>)
FW	<i>Forward (primer)</i>
hCMV	Citomegalovírus humano
HEK-293	Célula embrionária de rim (<i>Human Embryonic Kidney 293</i>)
HIV-1	HIV-tipo I
HLH	<i>Helix-loop-Helix</i>
hMLKL	MLKL humano
hRIPK3	RIPK3 humano

HSV	Vírus da herpes
HT-29	Célula de adenocarcinoma coloretal (<i>Colon colorectal adenocancer</i>)
IFNAR1	Receptor de interferon alfa e beta (<i>Interferon alpha and beta receptor subunit 1</i>)
IFN- β	Interferons do tipo β
IFN- γ	Interferons do tipo γ
IRF	Fator de regulação por interferon (<i>Interferon regulatory fator</i>)
ISGF3	<i>Interferon-stimulated gene factor 3</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
L929	Fibroblasto embrionário (<i>Embryonic Fibroblast</i>)
LMA	Leucemia mieloide aguda
LPS	Lipopolissacarídeos
mCMV	Citomegalovirus murino
MCS	Sítio de clonagem múltiplo (<i>Multiple cloning site</i>)
MEF	Célula embrionária de camundongo (<i>Mouse embryonic fibroblasts</i>)
miR	MicroRNA
MLKL	<i>Mixed lineage kinase domain-like protein</i>
mMLKL	<i>MLKL</i> murino
mRIPK3	<i>RIPK3</i> murino
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
Nec-1	Necrostatina-1
NF- κ B	<i>Canonical nuclear fator kappa B</i>
NIH3T3	Célula embrionária de camundongo (<i>Embryonic Fibroblast</i>)
Pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PVDF	Fluoreto de polivinilideno (<i>Polyvinylidene difluoride</i>)
Rev	<i>Primer reverso</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RIPK1	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein Kinase 1</i>
RIPK3	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein Kinase 3</i>

RNAPolI	RNA polimerase II
SiRNA	<i>Short interference RNA</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TCR	Receptor de célula T (<i>T cell receptor</i>)
TFs	Fatores de transcrição (<i>Transcription Factors</i>)
TLR	Receptores do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor necrosis fator</i>)
TNFR1	Receptor de TNF1
TRADD	<i>TNFR-associated death domain</i>
TRAF	<i>TNF receptor associated fator</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TSS	Sítio iniciador da transcrição (<i>Transcription start site</i>)
UCSC	<i>University of California, Santa Cruz</i>
UHRF1	<i>Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1</i>
UTR	Região não traduzida (<i>Untranslated Region</i>)
ZNF	<i>Zinc Fingers</i>

Resumo

Introdução: Necroptose é uma via bioquímica de morte celular recém-descoberta, independente de caspases, e com aspectos morfológicos similares ao de necrose. A ativação dessa via, que ocorre por diversos estímulos, entre eles receptores de morte e sinais mediados por TRIF, envolve uma cascata de fosforilação das quinases RIPK1 e RIPK3 e da pseudoquinase MLKL. A relevância da morte celular por necroptose já foi demonstrada em diversas condições fisiopatológicas, incluindo infecções bacterianas e virais, processos isquêmicos, câncer e doenças autoimunes. Em diversos destes modelos também foi descrito que os níveis de expressão de RIPK3 e MLKL sofrem modulação tanto positiva quanto negativa e que a intensidade de expressão destas moléculas se correlaciona diretamente à sensibilidade da célula à indução de morte por necroptose. Porém, até o momento, existem relatos escassos na literatura a respeito dos mecanismos que regulam a modulação destes genes, tanto em relação a quais são as vias de sinalização e fatores de transcrição envolvidos quanto à caracterização de suas regiões promotoras. **Objetivos:** Elucidar os mecanismos de modulação da expressão gênica de RIPK3 e MLKL, por meio do estudo de suas regiões promotoras e dos fatores de transcrição que as regulam. **Métodos:** Clonagem, ensaios de luciferase, CRISPR-Cas9 screening, western blot, reação em cadeia da polimerase, ensaios *in vitro*. **Resultados:** Definimos, para o promotor de MLKL murino, uma região mínima responsável pela atividade promotora basal, que também é ativada após estímulo com interferon gama, através de ensaios de luciferase. Adicionalmente, verificamos que a expressão de MLKL por interferon gama é mediada pela via da Janus Kinase, indicando que a via clássica de sinalização por interferon participa ativamente desta modulação. Esta sugestão foi reforçada com dados de screening por CRISPR-Cas9 mostrando que há uma região próxima ao início da transcrição do gene de MLKL rica em regiões regulatórias e com sítios de ligação de STAT1. Esta região, portanto, pode ser um elemento central na regulação da transcrição de MLKL frente ao estímulo com interferon gama através da via canônica de JAK-STAT. **Conclusão:** Identificamos regiões promotoras importantes para a expressão de MLKL murino tanto em condições basais como após estímulo de IFN- γ , e que a via de JAK-STAT participa deste processo.

Descritores: MLKL [não DeCS]; RIPK3 [não DeCS]; Regulação da expressão gênica; Fatores de transcrição; Necroptose

1 INTRODUÇÃO

1.1 Necroptose: uma nova rota de morte celular

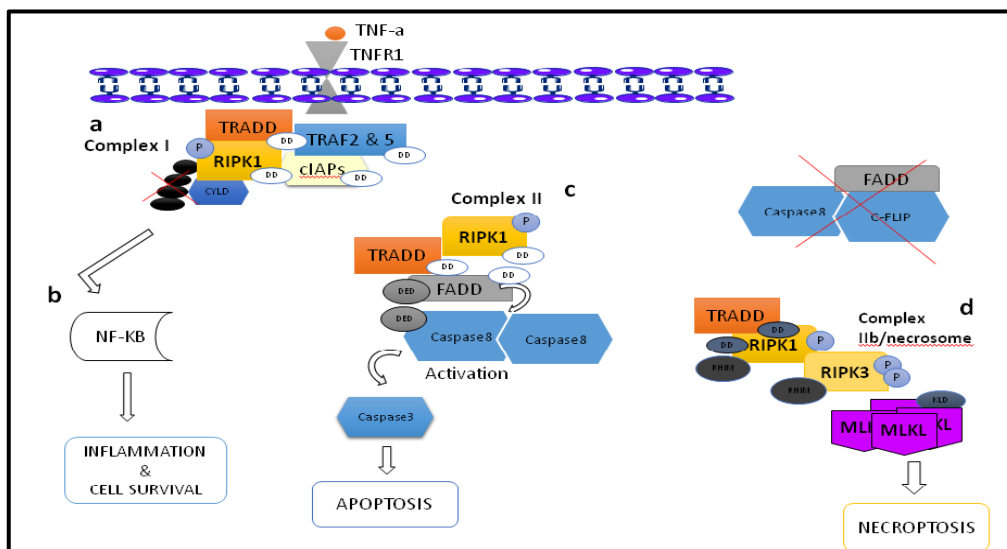
A classificação de morte celular é geralmente dividida em duas categorias, sendo uma ativa e controlada bioquimicamente, denominada apoptose, e a outra de forma passiva e/ou acidental, denominada necrose.

A morte celular por apoptose é coordenada pela ativação de cisteíno-proteases, denominadas caspases, e está associada ao processo de desenvolvimento embrionário e homeostase do organismo.⁽¹⁾ O fator de necrose tumoral (TNF – *tumor necrosis factor*), bem como outros ligantes da família dos ligantes de morte, tais como o Fas ligante (FasL – *Fas ligand*) e o *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), são capazes de induzir apoptose na maioria das células.⁽²⁾ O fenótipo de uma morte apoptótica normalmente ocorre de forma “silenciosa”, uma vez que as células mortas são eliminadas do organismo por fagócitos, sendo, portanto, conhecida como uma morte “limpa” por não gerar um processo inflamatório.^(3,4) Por outro lado, a morte necrótica é considerada resultado de um acidente celular biológico descontrolado e irregular, que normalmente desencadeia um processo inflamatório.⁽⁵⁾

Necroptose, por sua vez, é um mecanismo de morte celular regulado bioquimicamente, que pode ser induzido por alguns dos mesmos iniciadores do processo de apoptose.⁽⁶⁾ Um fator contrastante entre estas duas vias é o estado de ativação das caspases. Enquanto a apoptose é mediada por estas proteases, a execução de necroptose depende da inibição das mesmas.⁽⁷⁾ Opostamente à apoptose, o fenótipo da morte necroptótica gera um processo inflamatório similar ao da morte necrótica. Assim sendo, por ser uma morte celular mediada bioquimicamente tal como a apoptose, porém com uma morfologia semelhante à morte necrótica, esse tipo de morte celular, que teve sua descoberta em meados de 2012, foi denominada necroptose.^(8,9)

O arquétipo de indução de necroptose é o ligante de morte TNF, que tem sido classicamente usado para ilustrar como um mesmo ligante pode desencadear diferentes respostas, muitas vezes até antagônicas entre si. A estimulação do receptor de TNF, receptor de TNF1 (TNFR1), pela ligação do TNF ou por anticorpos agonistas, normalmente induz a formação de um complexo multi-protéico denominado complexo I,

que contém *TNFR-associated death domain* (TRADD), *TNF receptor associated fator 2* (TRAF2), TRAF5, inibidor celular de apoptose (cIAP1 – *cellular inhibitor of apoptosis 1*), cIAP2 e *receptor-interacting serine/threonine-protein Kinase 1* (RIPK1). Esse complexo leva a ubiquitinação de RIPK1 pelos cIAPs, que induz a estabilização deste complexo, permitindo o recrutamento e ativação da via canônica do *canonical nuclear fator kappa B* (NF-κB). Esta via induz a expressão de diversos genes ligados a sobrevivência e proliferação, incluindo os próprios cIAPs e também *CASP8 and FADD-like apoptosis regulator* (cFLIP ou CFLAR). Porém, dependendo da intensidade e da extensão da ativação do TNFR1, um segundo complexo se forma a partir do primeiro, desta vez no citosol, denominado complexo II. Isto ocorre quando há queda dos níveis de ubiquitinação do complexo I, causada pela ausência dos cIAPs ou pela ativação de deubiquitinases, tais como *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase* (CYLD) e A20, que causa a dissociação de RIPK1 e *fas-associated protein with death domain* (FADD) do complexo inicial. No citosol, o par RIPK1/FADD recruta a caspase-8, iniciando uma cascata de ativação de caspases, que culmina na ativação de caspase-3 e -7, que leva a célula à morte por apoptose. Na ausência ou inibição de FADD ou caspase-8, um complexo II alternativo (complexo IIb) é formado, onde RIPK1 recruta RIPK3, que se auto-ativa e ativa *mixed lineage kinase domain-like protein* (MLKL), molécula responsável pela desestabilização e ruptura da membrana celular através de um mecanismo ainda não elucidado completamente, levando a célula à morte por necroptose.^(7,10,11) (Figura 1).



(a) Formação do complexo I junto à porção interna do receptor TNFR1 após estímulo com TNF. (b) A estabilização do complexo I leva à indução da transcrição de genes pró-inflamatórios e de sobrevivência sob o comando de NF-κB. (c) Após a desestabilização do complexo I há a formação do complexo II, que leva à indução de apoptose pela ativação das caspases. (d) Quando há a inibição ou ausência de FADD, cFLIP ou caspase-8, o complexo II pode induzir necroptose pela ativação de RIPK1 e consequente ativação de RIPK3 e MLKL.

Figura 1. Sinalização molecular após o estímulo por TNF

Além dos ligantes de morte, TNF, FASL e TRAIL, diversas moléculas e compostos foram descritos como estimulantes da necroptose, tais como receptores de células T (TCR – *T cell receptor*) e células B (BCR – *B cell receptor*), receptores do tipo Toll (TLR3 e TLR4), receptores de reconhecimento viral, tais como *DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors* (DAI) e *retinoic acid-inducible gene I* (RIG-I), além de irradiação UV, irradiação ionizante, agentes quimioterápicos e de dano de DNA.^(12–15) Vale ressaltar que, para alguns iniciadores de necroptose, a participação de RIPK1 é dispensável e às vezes até mesmo antagônica.^(16–18) Sendo assim, RIPK3 e MLKL são as duas moléculas centrais na execução do processo de morte necroptótica.

1.2 Processos fisiopatológicos envolvendo RIPK3 e MLKL

Em teoria, da mesma forma que ocorre com a apoptose, o excesso ou falta de necroptose poderia desencadear diversos mecanismos fisiopatológicos. Com o advento de inibidores específicos de necroptose e camundongos nocautes para os genes RIPK3, RIPK1 e MLKL, esta hipótese foi confirmada por vários grupos. Na tabela 1 estão compilados alguns dos processos fisiopatológicos nos quais a desregulação da necroptose foi demonstrada, e como esta alteração impacta nestas

doenças, que incluem desde patologias vasculares e doenças inflamatórias até infecções e doenças neurodegenerativas.

A relevância fisiológica da necroptose ficou evidente após estudos demonstrarem que o fenótipo letal de camundongos deficientes em caspase-8, que morrem por volta do dia 10.5 (e10.5) do período embrionário, é revertido completamente quando os camundongos também são deficientes em RIPK3.^(6,19) O mesmo fenômeno ocorre para os genes FADD e MLKL, ou seja, deficiência em MLKL resgata o fenótipo letal de animais deficientes em FADD.⁽²⁰⁾

A importância da supressão da via de necroptose por caspase-8 não é restrita apenas ao período de desenvolvimento embrionário. A deleção da caspase-8 em tecidos adultos, tais como pele e intestino, induz morte celular com características necróticas, que gera perda de homeostase tecidual, inflamação grave, e pode levar o animal a óbito. A confirmação que esta morte celular era, de fato, necroptose foi feita pela deleção de RIPK3 nestes modelos, que reduziu drasticamente os níveis de morte e reverteu praticamente todos os sintomas associados.⁽²¹⁾ Da mesma forma, linfócitos T deficientes em FADD ou caspase-8 morrem por necroptose quando ativados ou estimulados por ligantes de morte.⁽²²⁾

Tabela 1. Exemplos do envolvimento da necroptose em modelos experimentais de patologias

Perda de homeostase tecidual	
Embrião	Deficiência de caspase-8 ou FADD é letal durante embriogênese. Letalidade revertida pela deleção de RIPK3 ou MLKL
Intestino	Deficiência de RIPK3 protege da colite induzida por deleção de FADD ou caspase-8
Pele	Deficiência de RIPK3 protege a pele de lesões que ocorrem na ausência de FADD e caspase-8
Sistema hematopoietico	Deficiência de RIPK3 reduz inflamação sistêmica e pan-citopenia na medula óssea. RIPK1 parece ser essencial para a sobrevivência de células tronco hematopoieticas
Patologias vasculares	
Isquemia miocárdica	Deficiência de RIPK3 protege funcionamento cardíaco e reduz a infiltração de células T
Rejeição ao aloenxerto renal	Deficiência de RIPK3 preserva o funcionamento renal em aloenxertos
Injúria cerebral traumática	Nec-1 reduz morte cortical
Arteriosclerose	Aumento na expressão de RIPK3 está relacionado com lesões em macrófagos nos estágios mais avançados da doença
Doenças neurodegenerativas	
Esclerose lateral amiotrófica	Nec-1 reduz morte do neurônio motor
Doença de Huntington	Nec-1 adia a perda da função motora induzida por ausência de caspase-8

continua...

...continuação

Doenças inflamatórias	
Inflamação sistêmica letal	Deficiência de RIPK3 protege contra o choque agudo ou hiperagudo causado por injeção de TNF ou TNF mais inibidor de pan-caspases, respectivamente
Pancreatite aguda	Deficiência de RIPK3 e MLKL reduzem os efeitos da pancreatite, enquanto a deficiência de RIPK1 aumenta
Infecções	
Salmonella Typhimurium	Deficiência de RIPK3 protege da gastroenterite
Citomegalovirus	Deficiência de RIPK3 protege contra infecções virais que ocorrem na ausência de caspase-8

Fonte: Adaptado de Weinlich R, Oberst A, Dillon CP, Janke LJ, Milasta S, Lukens JR, et al. Protective roles for caspase-8 and cFLIP in adult homeostasis. *Cell Rep.* 2013;5(2):340–8.⁽²¹⁾

Ch'en IL, Tsau JS, Molkentin JD, Komatsu M, Hedrick SM. Mechanisms of necroptosis in T cells. *J Exp Med.* 2011;208(4):633–41.⁽²²⁾

Yoon S, Kovalenko A, Bogdanov K, Wallach D. MLKL, the protein that mediates necroptosis, also regulates endosomal trafficking and extracellular vesicle generation. *Immunity.* 2017;47(1):51–65.e7.⁽²³⁾

Roderick JE, Hermance N, Zelic M, Simmons MJ, Polykratis A, Pasparakis M, et al. Hematopoietic RIPK1 deficiency results in bone marrow failure caused by apoptosis and RIPK3-mediated necroptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(40):14436–41.⁽²⁴⁾

Weinlich R, Oberst A, Beere HM, Green DR. Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(2):127–36.⁽²⁵⁾

1.3 Modulação da expressão de RIPK3 e MLKL altera a sensibilidade à necroptose

A presença de *receptor-interacting serine/threonine-protein Kinase 3* (RIPK3) é considerada como condição essencial para a indução de necroptose.^(22,25) Da mesma forma, a deleção de MLKL torna uma célula completamente insensível à indução deste tipo de morte celular.⁽¹¹⁾ De acordo com a literatura, RIPK3 e MLKL estão constitutivamente expressos na maioria dos tecidos, com exceção do fígado e do cérebro. Dado que o cérebro não expressa RIPK3, o efeito protetor da necrostatina-1 (nec-1) na isquemia cerebral foi por algum tempo considerado duvidoso ou resultado de uma ação *off-target* deste composto. Porém, dados mais recentes mostram que a isquemia é capaz de induzir a transcrição e tradução de RIPK3, tornando este tecido sensível à necroptose.⁽²⁶⁾ Da mesma forma, a expressão de RIPK3 foi observada em fígados de pacientes com cirrose alcoólica, ou esteato-hepatite não alcoólica, bem como em seus respectivos modelos murinos^(27,28) o que levou a uma mudança no conceito que o fígado era totalmente resistente a indução de necroptose.

Alterações na expressão de RIPK3 e MLKL foram observadas em outros tecidos e sob as mais diversas circunstâncias, alterando a sensibilidade destes à

indução de necroptose. Um aumento da expressão de RIPK3 foi visto em infecções virais incluindo HIV-tipo I (HIV-1), vírus da herpes (HSV), citomegalovírus humano (hCMV) e murinos (mCMV) quando comparado com células controle.^(17,29,30) Interessantemente, infecções virais são normalmente acompanhadas por uma resposta de interferon,⁽³¹⁾ e estudos demonstraram que tanto interferons do tipo I (IFN- β) e do tipo II (IFN- γ), mesmo na ausência de infecção, induzem elevação da expressão de RIPK3 e MLKL.^(32,33) Os mecanismos pelos quais a infecção viral ou o tratamento somente com interferons modulam essas moléculas não foi investigado nestes estudos.

Além da resposta a vírus, diversos estímulos, desde quimioterápicos até extratos de plantas, têm sido reportados como indutores da expressão de RIPK3. Por exemplo, em células de osteosarcoma foi observado um aumento significativo nos níveis de RIPK1 e RIPK3 após tratamento com *shikonin* de forma dose-dependente.⁽³⁴⁾ Da mesma forma, ácido palmítico induz o aumento de expressão de RIPK3 em cardiomiócitos⁽³⁵⁾ e induz necroptose em macrófagos.⁽³⁶⁾

Interessantemente, também foi observada a redução ou completa inibição da expressão de RIPK3, especialmente em tecidos tumorais ou cancerosos. Geserick et al.⁽³⁷⁾ constataram que a expressão de RIPK3 é muito baixa ou ausente em células de melanoma, quando comparada com a expressão em melanócitos primários e células nervosas. A redução da expressão proteica de RIPK3 foi também descrita em câncer de pulmão,⁽³⁸⁾ câncer de cólon⁽³⁹⁾ e em subtipos de melanoma metastático.⁽⁴⁰⁾ Em leucemia mieloide aguda (LMA) além da diminuição da expressão de RIPK3,⁽⁴¹⁾ também foi demonstrado que a expressão dessa molécula atua na supressão dessas células tumorais, em conjunto com a ativação do inflamassoma.⁽⁴²⁾

Da mesma forma, 85% das amostras de câncer de mama mostraram redução na expressão de RIPK3 se comparado com os tecidos normais adjacentes.⁽⁴³⁾ A expressão ectópica de RIPK3 foi capaz de reverter a insensibilidade destes tumores, bem como das linhagens provenientes de melanomas, a estímulos indutores de necroptose.^(37,43) Similarmente, algumas linhagens de melanoma apresentam redução na expressão de MLKL, e o mesmo é válido para câncer de ovário, que tem a expressão reduzida de MLKL associada com um pior prognóstico e sobrevivência global dos pacientes.^(43,44)

Em conjunto, estas observações sugerem que: 1) de fato, os níveis de expressão de RIPK3 e MLKL alteram a sensibilidade das células à indução de necroptose, e 2) a supressão da via de necroptose possibilita, ou ao menos, facilita a

progressão tumoral. Desta forma, tratamentos que levem a um aumento da expressão das moléculas envolvidas em necroptose em conjunto com agentes ativadores desta via, podem ser uma excelente oportunidade de se revolucionar o tratamento de câncer anteriormente refratários e de outras doenças que também se beneficiam da insensibilidade a esta via de morte.

1.4 Regulação transcricional de *RIPK3* e *MLKL*: um novo horizonte a ser explorado

As primeiras evidências da regulação transcricional de *RIPK3* foram demonstradas nos mesmos trabalhos que mostraram a inibição de sua expressão em alguns tipos de câncer, como foi parcialmente explorado na seção de modulação de *RIPK3* e *MLKL* acima. Nestes primeiros trabalhos foi observado que 85% das amostras de câncer de mama mostraram redução na expressão de *RIPK3* se comparado com os tecidos normais adjacentes,⁽⁴³⁾ sendo que o principal mecanismo descrito no artigo relativo à inibição da expressão deste gene foi a metilação do promotor na região adjacente ao sítio iniciador da transcrição (TSS – *transcription start site*).⁽⁴³⁾ O uso de agentes demetilantes restaurou a expressão de *RIPK3* e sensibilizou estas células a morte induzida por quimioterapia.

Alguns trabalhos vêm elucidando possíveis mecanismos moleculares envolvendo a regulação epigenética de *RIPK3*. Em diversos tipos de câncer, a mutação da isocitrato desidrogenase 1 (IDH1) gera um produto denominado 2-hydroxyglutarato (2-HG) que atua regulando a metilação de DNA através da inibição da demetilase TET2 e associação com a DNA metil-transferase (DNMT1), estimulando sua interação com o promotor de *RIPK3*, o que leva a uma hipermetilação, e redução da expressão de *RIPK3*.⁽⁴⁵⁾ A regulação da expressão de *RIPK3* em células cancerosas também foi atribuída ao fator de transcrição *Specific protein-1* (Sp1) e ao regulador epigenético *ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1* (UHRF1). Sp1 é um regulador positivo da transcrição de *RIPK3*, uma vez que sua interação com o promotor de *RIPK3* foi confirmada por imunoprecipitação de cromatina (CHIP), e a mutação do seu sítio de ligação, inibindo sua ligação ao promotor de *RIPK3*, diminuiu significativamente a expressão deste transcrito. UHRF1, contrariamente ao Sp1, atua

mantendo os níveis de metilação de *RIPK3*, regulando negativamente sua transcrição, dado que sua inibição aumenta os níveis de expressão de *RIPK3*.⁽⁴⁶⁾

Entretanto, o mesmo trabalho que demonstra que agentes demetilantes restauram a expressão de *RIPK3* em câncer de mama também relata que o mesmo não acontece com linhagens provenientes de câncer de cólon, demonstrando que o mecanismo de metilação não é o único que atua na modulação desse gene.⁽⁴³⁾

Um importante trabalho mostrou que a indução de necroptose em macrófagos pode ser induzida através de diferentes vias de sinalização que são sempre dependentes da sinalização via receptor de interferon alfa e beta (IFNAR1 – *interferon alpha and beta receptor subunit 1*). A ativação de IFNAR1 induz a migração para o núcleo do complexo STAT1/STAT2/IRF9, conhecido como complexo *interferon-stimulated gene factor 3* (ISGF3), que induz a transcrição de determinados genes. Este mecanismo, principalmente através do fator de regulação por interferon-9 (IRF9), resulta em uma constante ativação de *RIPK3*, uma vez que macrófagos IRF9-deficientes se tornaram resistentes a necroptose induzida por lipopolissacarídeo (LPS), IFN- β e TNF, com redução significativa dos níveis de fosforilação de *RIPK3*.⁽⁴⁷⁾

A regulação gênica de *MLKL*, ao contrário de *RIPK3*, não possui nenhuma evidência de regulação epigenética até o presente momento. Foi observado que o aumento de *MLKL* em hepatite autoimune é dependente de IFN- γ e ocorre através da fosforilação e ativação do fator de transcrição STAT1.^(48,49) Neste mesmo trabalho, a imunoprecipitação por CHIP identificou STAT1 associado ao promotor de *MLKL*. Outros grupos de pesquisa também demonstraram a importância não só do STAT1, como também do fator de transcrição IRF1 na indução da expressão de *MLKL* mediante estímulos com IFN-I e IFN-II em várias células de câncer.^(50,51) Adicionalmente, os mesmos trabalhos corroboraram o fato de ser uma regulação a nível transcricional, uma vez que o inibidor transcricional actinomicina-D reduziu significativamente os níveis de RNA mensageiro (mRNA) de *MLKL* ou quando STAT1 e/ou IRF1 foram nocauteados.

Um recente trabalho revelou através de um *screening* que inibidores com o domínio bromo (BET) atuam diminuindo a expressão de *MLKL*. Mais especificamente, é formado um complexo transcricional composto por *bromodomain protein* (BRD4), IRF-1, p-TEFb e RNAPolIII, que se associam ao promotor de *MLKL* estimulando sua expressão, e quando esse complexo é inibido por BET, a transcrição de *MLKL* é negativamente regulada.⁽⁵²⁾ Um micro RNA (miRNA) também foi

demonstrado como regulador pós-transcricional de *MLKL*, o miRNA has-miR-500a-3P se associa a 3' regiões não traduzidas (UTR – *untranslated region*) do mRNA de *MLKL*, inibindo sua fosforilação e translocação para membrana plasmática, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, em um processo de injúria renal aguda.⁽⁵³⁾

1.5 Regulação da transcrição gênica: componentes cis-regulatórios e as etapas que regem a expressão dos genes

Regulação ou modulação gênica é o processo que determina o momento, o número e quais os genes serão expressos e desempenharão determinada função nas células. Essa regulação é resultado de interações entre moléculas de DNA, RNA e proteínas, e em eucariotos é extremamente complexa.^(54,55)

Quando a expressão de um gene é requerida pela célula, é desencadeado um processo denominado “dogma central da biologia molecular” em que a informação contida em um trecho de uma molécula de DNA é transcrita em uma molécula de mRNA, em um processo denominado transcrição, e traduzida em unidades funcionais, denominadas proteínas, em um processo denominado tradução.^(56,57)

A regulação gênica pode ocorrer em diferentes níveis, sendo eles: transcricional (estrutural ou não), pós-transcricional, traducional e pós-traducional.

A regulação transcricional estrutural, ou epigenética, é caracterizada pelas alterações na acessibilidade do maquinário de transcrição à fita de DNA, que é dependente do estado de organização e compactação da cromatina.^(58,59) A cromatina por sua vez é composta pelo conjunto de longas moléculas de DNA associadas a histonas, que são proteínas que auxiliam na compactação do DNA.^(60,61) Tanto histonas, quanto a própria estrutura do DNA podem sofrer alterações químicas, sendo as mais frequentes a metilação em regiões do genoma ricas em CG (citosina e guanina),⁽⁶²⁾ e metilação e/ou acetilação de histonas.^(63,64) Essas alterações influenciam a expressão de determinados genes sem que haja alteração na sequência de bases do DNA.⁽⁶⁵⁾

Uma vez ocorrido o remodelamento da cromatina, há o início da fase de regulação transcricional não-estrutural, com a holoenzima RNA polimerase II (RNAPolII) se associando a uma região localizada a montante (*upstream*) ao gene em

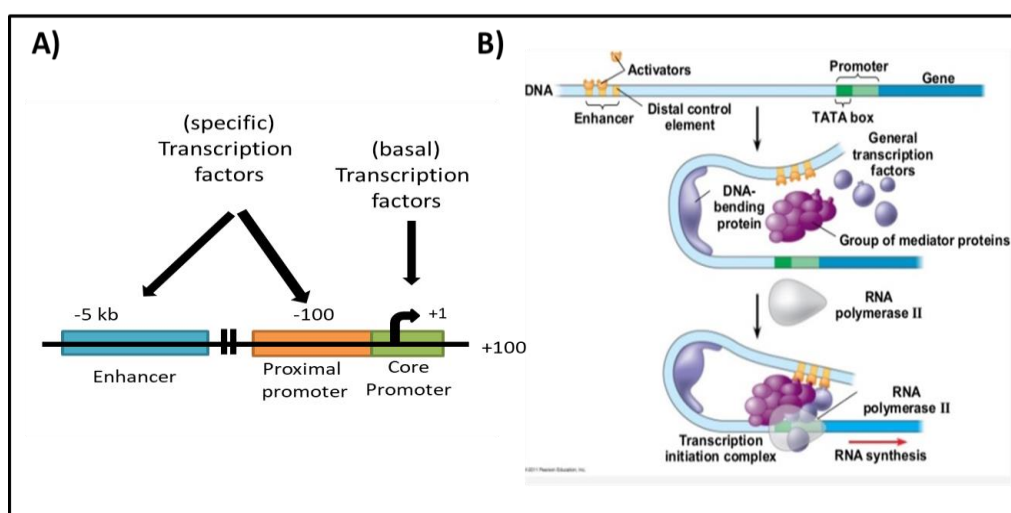
questão. Esta região, denominada região promotora, é composta por sítios de ligação (*binding site*) que auxiliam o reconhecimento e ancoramento da RNAPII e outros elementos regulatórios, tais como os fatores de transcrição (TFs – *transcription factors*) (Figura 2-A).^(66–69) Além da região promotora, outra região que contém sítios de ligação e pode atuar na regulação da expressão de um gene é chamada de região acentuadora, ativadora ou elemento potenciador (*enhancers*). *Enhancers* são sequências de DNA que podem estar próximas ou distantes ao promotor do gene em questão e, por meio da interação com a região promotora, podem atuar na modulação deste gene.^(55,70) As regiões de *enhancers* atuam através da formação de uma alça (*loop*), para que haja o contato da sua região com a região promotora, ou através da ligação de proteínas específicas (Figura 2-B).⁽⁷¹⁾ Antagonicamente ao *enhancer*, existem regiões denominadas silenciadores ou repressores (*silencers*) que atuam inibindo a transcrição de determinado gene, uma vez que, ao invés de se ligarem a TFs ativadores, se ligam aos TFs silenciadores/inibitórios.^(72,73)

A transcrição gênica segue um nível basal, ou seja, os genes são expressos nas células de forma constante. É justamente a presença ou ausência de elementos regulatórios como TFs e a atividade dos *enhancers* ou *silencers* que levam ao aumento ou diminuição da expressão desses genes em condições específicas.^(74,75) Este balanço de elementos regulatórios é extremamente importante para a regulação da expressão gênica e, portanto, estritamente controlado.

Regiões denominadas como cis-regulatórias são regiões não codantes do DNA, ou seja, que não codificam proteínas, tais como a região promotora e *enhancers*. Esses, por sua vez, atuam como sítios de ligação para elementos trans-regulatórios, como TFs, que regulam a abundância do RNA transcrito.⁽⁷⁶⁾ Mais detalhes acerca dos TFs estão descritos na próxima seção.

No momento da transcrição, a primeira base transcrita é denominada de TSS, e essa posição convencionalmente é numerada de +1. As bases *upstream* e *downstream* a ela são numeradas negativamente (ex: -2, -3) e positivamente (ex: +2, +3), respectivamente.^(77,78) Nesta região, em torno do TSS, usualmente se encontra a região central (*core*) do promotor, ou seja, a região mínima necessária por iniciar a transcrição.^(79,80) É nesta região que ocorre o ancoramento da RNAPII e dos TFs gerais, que são responsáveis pelo posicionamento da RNAPII e auxiliam no início da transcrição, como ilustrado na figura 2-A.⁽⁸¹⁾

A região *core* geralmente se estende por aproximadamente 40-60 pares de bases (pb) *upstream* ao TSS.^(69,79) Vários elementos moduladores da transcrição gênica reconhecem e se ligam a sequências específicas na região *core* do promotor, sendo elas o TATA-box, Iniciador (Inr), *Downstream Promoter Element* (DPE), *DownstreamCore Element* (DCE), a *TFIIB-Recognition Element* (BRE), e *Motif Ten Element* (MTE).^(69,82–84) Apesar de essas sequências serem descritas como regiões altamente conservadas, vale ressaltar, no entanto, que nenhuma dessas sequências são universais, ou seja, não são encontradas em todos os promotores, demonstrando mais uma vez a complexidade deste processo.



(a) Região promotora destacando a região de *enhancer*, promotor proximal e *core* do promotor em relação a distância do *transcriptional starting site* (TSS). (b) ilustração de como ocorre o *looping* da fita de DNA transcrita para sua associação com *enhancers* e fatores de transcrição.

Fonte: Adaptado de Ohler U, Wassarman DA. Promoting developmental transcription. *Development*. 2010;137(1):15–26. Figure 1, Cis-acting DNA transcription regulatory elements. p. 16.⁽⁸⁵⁾

Figura 2. Regulação da transcrição gênica

Adjacente à região *core*, encontra-se a região proximal do promotor,⁽⁷⁹⁾ caracterizada como a região onde ocorre a ligação de TFs específicos para a regulação daquele determinado gene, como representado na figura 2-A.⁽⁸⁶⁾ A extensão da região promotora total pode variar de 100 a 3000pb *upstream* ao gene.⁽⁸⁷⁾

Uma vez que a molécula de mRNA é transcrita, ela está sujeita a regulação pós-transcricional, que está relacionada às modificações na molécula de mRNA, sendo as principais a poliadenilação, que é a adição de uma cauda poli-A na extremidade 3', composta pela ligação de 80-200 resíduos de adenina, e o *capping* ou CAP 5'. Ambos atuam na estabilização do RNA, auxiliando sua exportação para o

citoplasma e sua ligação aos ribossomos.^(88–90) Além disso, há o mecanismo de *splicing*, responsável pela remoção das regiões não codantes do RNA (íntrons) e ligação das regiões codantes (éxons).⁽⁹¹⁾ Esse mecanismo pode acontecer de forma alternativa, gerando uma variedade de diferentes transcritos, mesmo que oriundos de um mesmo gene.⁽⁹²⁾

A regulação a nível traducional se refere às modificações que podem ocorrer durante a síntese proteica, que tem por consequência a parada da tradução, inibindo-a completamente ou mesmo formando proteínas incompletas ou truncadas.⁽⁹³⁾ Por fim, a regulação pós-traducional se dá pelas modificações químicas que ocorrem após a síntese proteica, podendo levar à ativação, reativação, inibição ou degradação das proteínas formadas, por mecanismos tais como enovelamento, pontes dissulfeto, fosforilação, ubiquitinação, sulfatação, metilação, glicosilação ou mesmo clivagem.^(94,95)

1.6 Fatores de transcrição: atuação dos fatores trans-regulatórios que orquestram a expressão gênica

A regulação transcricional é orquestrada por uma série de proteínas regulatórias denominadas TFs, que atuam na ativação ou inibição da expressão de determinado gene através de sua ligação aos sítios de ligação do DNA, seja em regiões promotoras, *enhancers* ou *silencers*, como já foi discutido acima.⁽⁹⁶⁾

Os TFs regulam, juntamente com outros elementos regulatórios, a taxa de transcrição de diferentes genes em diversos processos biológicos, principalmente em situações específicas, ou seja, que são requeridos de acordo com a necessidade da célula. Um exemplo é a reposta de células mamíferas mediante a uma infecção viral, em que o material genético do vírus ativa os TFs IRF-3 e IRF-7, e uma vez ativos, formam um complexo de transcrição em promotores de determinados genes, induzindo sua expressão, que consequentemente codifica proteínas com propriedade antivirais.^(97,98)

As sequências nucleotídicas em que os TFs se ligam ao DNA com alta afinidade e avidéz são denominadas domínios ou sítios de ligação no DNA (DBS – *DNA binding site*).^(99,100) Esses sítios de ligação são geralmente conservados entre as espécies e são usados para caracterizar e classificar o TFs em diferentes famílias.^(101,102) Entretanto, há diferentes graus de afinidade de um determinado TF à

diferentes sítios de ligação, o que dificulta a acurácia de representar um sítio de ligação usando sequências consensos. Sendo assim, esta afinidade é representada utilizando matrizes de frequência das bases nitrogenadas nas posições específicas da interação com o TF (PSFM – *Position Specific Frequency Matrices*).^(103,104)

Fatores de transcrição contêm três importantes domínios em sua estrutura, sendo eles o domínio de ligação ao DNA (DBD – *DNA bind domain*), responsável por sua ligação aos sítios específicos no DNA, o domínio de ativação (TAD – *transactivator domain*), responsável por sua interação com outros componentes do complexo iniciador da transcrição, servindo como um domínio ativador e, por último, o domínio de interação com outras proteínas, responsável pela sua associação com outros fatores, formando homo ou hetero-dímeros (Figura 3).^(105–107)

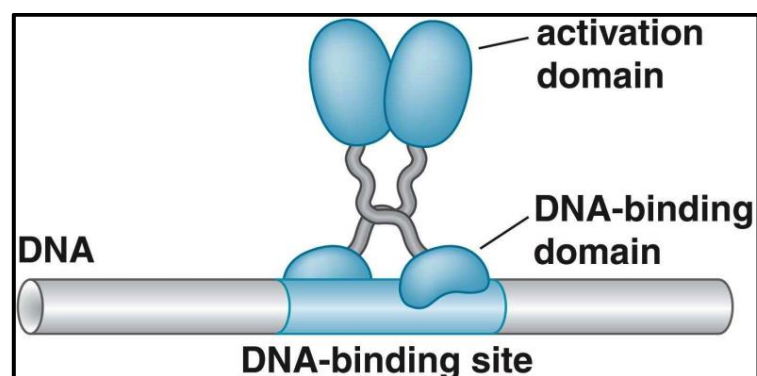


Ilustração da ligação de determinado fator de transcrição ao seu sítio de ligação ao DNA (*DNA-binding site*), e seu domínio de ativação.

Figura 3. Ligação do fator de transcrição ao DNA

De acordo com seu domínio de ligação, os TFs podem ser divididos em diferentes famílias/grupos, sendo os principais:

- *Helix-loop-Helix* (HLH), caracterizado por duas α -hélices conectadas por uma alça. Ex: *myoblast determination protein 1* (MyoD);⁽¹⁰⁸⁾
- *Helix-turn-helix* (HTH - homeodomínio), caracterizado por três α -hélices. Ex: Homeobox (Hox);⁽¹⁰⁹⁾
- *Zinc finger* (ZNF), caracterizado por duas α -hélices e uma folha β pregueada estabilizadas por um íon zinco. Ex: *Specific protein 1* (Sp1);⁽¹¹⁰⁾ e
- *Basic leucine zíper* (bZIP), caracterizada por uma α -hélice que faz contato com o DNA e o zíper de leucina, que serve para formação do dímero. Ex: *Activator protein* (AP-1 /Fos-Jun).⁽¹¹¹⁾

Como já citado na seção anterior, existem TFs ativadores e repressores, que atuam ativando ou inibindo a transcrição gênica, respectivamente.⁽¹¹²⁾ Esta diferença na execução dos TF pode ser resultante de sua interação com proteínas co-ativadoras ou co-repressoras, ou até mesmo pela sua interação com uma sequência de DNA específica.^(113–116) Além dessas interações, diversos TFs podem ser modulados por mecanismos pós-traducionais, sendo a família dos STATs um exemplo de TFs que precisam ser fosforilados para serem ativados e, conseqüentemente, conseguir se ligar ao DNA.^(117,118)

1.7 Via de sinalização do interferon

Interferons (IFNs) são citocinas centrais na modulação da resposta imune, especialmente frente a infecções virais e efeitos anti-tumorais. A família dos IFN se resume a três principais classes: IFN do tipo I que compreendem 13 subtipos de IFN (14 em camundongos), dentre eles alfa, beta e ômega, sendo que todos se ligam ao mesmo receptor na superfície da célula, conhecido como receptor de IFN do tipo I (IFNAR).⁽¹¹⁹⁾ A segunda classe de IFN, são os IFN do tipo II, que compreende apenas o IFN- γ , que por sua vez se liga ao receptor de IFN- γ (IFNGR).⁽¹²⁰⁾ A terceira classe são os IFN do tipo III, ou IFN- λ , também conhecidos como IL-28 e IL-29 e com funções semelhantes ao tipo I. Diferente do IFN tipo II, que é produzido por linfócitos T e células NK, o IFN-I pode ser produzido por todas as células nucleadas em resposta a infecções virais.^(119,120)

Os IFN são grandes reguladores da expressão gênica envolvidos em diferentes processos antivirais e inflamatórios. O receptor de IFN do tipo I possui duas subunidades, IFNAR1 e IFNAR2, e quando ativado é capaz de recrutar as tirosino-quinases (Tyk2) e Janus tirosino-quinase (Jak1), que, por sua vez, fosforilam STAT2 e STAT1. Uma vez fosforilados, estes TFs formam um complexo com o IRF9, também conhecido como complexo de fator gênico 3 estimulado por IFN (ISGF3), o qual é responsável por iniciar a expressão de genes responsivos ao IFN.⁽¹²¹⁾ Além deste complexo, IFNs do tipo I também podem induzir fosforilação e conseqüentemente dimerização e ativação de STAT3, STAT4, STAT5 e STAT6.⁽¹²²⁾

O receptor de IFN- γ (IFNGR) é composto pelas subunidades IFNGR1 e IFNGR2, que quando estimuladas pela ligação do IFN- γ , ativam Jak1 e

Jak2, resultando na homodimerização e fosforilação do STAT1, o principal fator de transcrição envolvido na ativação da transcrição gênica de genes responsivos ao IFN- γ .^(120,123)

Apesar da via de sinalização JAK-STAT brevemente descrita acima ser a mais estudada, hoje já se sabe que apenas a ativação desta via pode não ser suficiente para gerar todas as atividades biológicas desencadeadas por IFNs. Algumas destas vias, as quais denominamos de via de sinalização não-clássica ou via de ativação por IFN independente de JAK-STAT, podem ocorrer em paralelo ou independentemente da ativação de JAK-STAT.^(124–128) As evidências em torno desta temática ainda estão em desenvolvimento, com a necessidade de um melhor entendimento em que condições específicas estas vias são ativadas e qual a contribuição relativa das mesmas.

1.8 Edição genômica e a técnica de CRISPR-Cas9

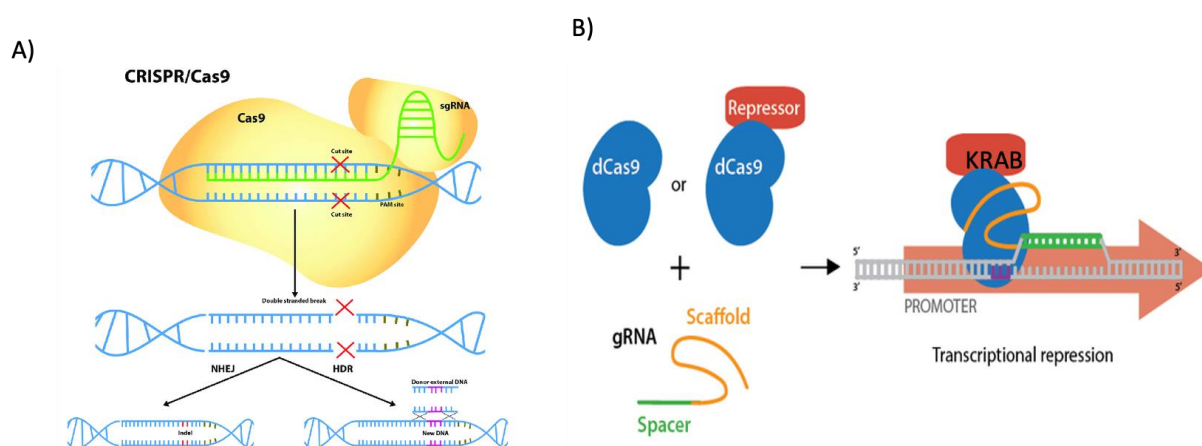
A habilidade de se editar genomas existe desde o início dos anos 1970, com o advento das enzimas de restrição,⁽¹²⁹⁾ posteriormente passando pela descoberta das técnicas com as nucleases dedos de zinco (*ZINC Finger*),⁽¹³⁰⁾ efetores da ativação da transcrição (TALENs – *transcription activator-like effector nucleases*)⁽¹³¹⁾ e mais recentemente, a técnica de CRISPR-Cas9.^(132,133)

O sistema repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente inter espaçadas (CRISPR – *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) consiste em um mecanismo de defesa presente em alguns tipos de bactérias, que reconhece e armazena pequenas sequências genômicas dos organismos invasores em seu próprio genoma de forma inter-espaçada e repetidas entre si. Esse armazenamento do genoma do invasor funciona como uma espécie de memória, de tal forma que quando a bactéria é infectada novamente pelo mesmo invasor, há o reconhecimento e clivagem destas mesmas sequências por uma nuclease guiada pelos fragmentos genômicos da primeira infecção. Esse sistema é denominado de CRISPR.^(134–137)

Baseado neste sistema imune, as cientistas Jennifer Doudna e Emmanuelle Charpentier dotaram-se de técnicas de engenharia genética para transpor este maquinário para um sistema que fosse capaz de ser manipulável e editar

genomas, surgindo assim a técnica de CRISPR-Cas9.⁽¹³²⁾ O sistema CRISPR-Cas9 contém dois principais componentes: a nuclease Cas9 e o RNA guia (gRNA). A Cas9 é capaz de clivar a dupla fita de DNA ao reconhecer uma sequência espaçadora denominada PAM (*proto-spacer adjacent motive*) que é responsável pelo recrutamento e ativação da Cas9 e situa-se duas a três bases adjacentes ao seu sítio de clivagem.⁽¹³⁸⁾ A sequência PAM é específica de acordo com a origem de cada Cas, por exemplo, em *Streptococcus pyogenes* a sequência PAM é 5' -NGG -3'.⁽¹³⁹⁾ O (gRNA) por sua vez é uma sequência de aproximadamente 20-22pb complementares a sequência alvo no genoma, o qual tem a função de guiar a Cas9 até o alvo para realizar a quebra da dupla fita do DNA e consequentemente a edição genômica.⁽¹⁴⁰⁾

Após a quebra da dupla fita de DNA, seu reparo é feito principalmente por dois principais mecanismos: recombinação homologa (HDR – *Homologous Direct Recombination*) e recombinação não homologa (NHEJ – *Non-Homologous End Joining*). A recombinação homóloga faz a reparação do DNA com base na informação contida em um DNA molde, e neste tipo de reparo, a sequência final é idêntica à sequência contida na sequência molde, ou seja, esse tipo de recombinação é utilizado para fazer inserções ou correções (*knock-in*).⁽¹⁴¹⁾ Já na recombinação não homóloga, as pontas do DNA são apenas unidas sem a presença de um molde, podendo na grande maioria das vezes gerar pequenas mutações como inserções, deleções e substituições, ou seja, este tipo de reparo é utilizado para mutações e perda de funções gênicas.⁽¹⁴²⁾ A figura 4 abaixo exemplifica o sistema CRISPR/Ca9 e os diferentes reparos do DNA.



Fonte: Cribbs AP, Perera SM. Science and bioethics of CRISPR-CAS9 gene editing: an analysis towards separating facts and fiction. Yale J Biol Med. 2017;90(4):625–34. Figure 1, CRISPR-Cas9 and CRISPRi mediated gene-editing mechanisms; p. 626.⁽¹⁴³⁾

Figura 4. Sistema CRISPR-Cas9

Com o avanço da técnica de CRISPR-Cas9 foram surgindo novas propostas para suas aplicações, das quais vamos ressaltar duas nesta seção: biblioteca de CRISPR e CRISPR por interferência (CRISPRi) (CRISPR para inativação).

As bibliotecas de CRISPR são amplamente utilizadas para estudos funcionais em larga escala afim de se melhor compreender uma série de processos biológicos por meio de estudos de ganho ou perda de função de genes individuais ou regiões regulatórias do genoma.⁽¹⁴⁴⁾ A ideia das bibliotecas de CRISPR é criar uma população de células com diferentes genes ou regiões modificadas em cada célula e analisar qual o impacto dessas modificações através de sequenciamento de nova geração (NGS – *new generation sequencing*) e análises fenotípicas, como por exemplo, ensaios de sobrevivência. Esses ensaios permitem identificar sequências essenciais ou pelo menos importantes para sobrevivência ou regulação gênica de uma determinada célula sobre condições normais ou induzidas, como por exemplo, por alguma droga de interesse. Dessa forma, em um único experimento, é possível estudar um grande número de alvos a fim de entender melhor o modelo de estudo a ser avaliado, e conseguir categorizar quais os melhores candidatos para serem validados individualmente posteriormente.^(145–147)

A inativação da regulação gênica por CRISPR, ou também conhecida como CRISPRi, é uma das aplicações que ocorrem em decorrência da mutação da nuclease Cas9, que ao ter seus sítios catalíticos silenciados, passa a ser considerada uma Cas9 inativa, ou “*dead*” Cas9 (dCas9).^(148–150) Para exercer sua função de inativadora/supressora da regulação gênica, essa dCas9 é acoplada com algum fator inibitório da transcrição gênica, sendo o mais comumente aplicado, o fator de inibição *Krueppel-associated box* (KRAB), formando então o complexo inibidor da transcrição gênica CRISPR-dCas9-KRAB,⁽¹⁵¹⁾ que atua regulando negativamente a iniciação da transcrição gênica quando próximo em até 1 kilobase (kb) de distância da região de início da transcrição.⁽¹⁵⁰⁾

Diante de todo cenário apresentado e apesar de já existir, como demonstrado acima: 1) uma literatura bastante extensa sobre a relevância da via da necroptose nas mais diversas patologias e processos fisiológicos; 2) um corpo de evidências crescente sobre a variação de expressão dos genes *RIPK3* e *MLKL* e como isso influencia em determinados processos fisiológicos e 3) uma correlação bastante forte quanto à sensibilidade das células à necroptose e os níveis de expressão de

RIPK3 e *MLKL*; a regulação transcricional desses dois genes ainda é muito pouco entendida. Quando iniciamos este projeto, não havia nenhum dado na literatura acerca da regulação transcricional não-epigenética de *RIPK3* e *MLKL* e, ao longo dele, alguns trabalhos foram publicados acerca do tema.

Apesar destas publicações, a definição da região promotora de *RIPK3* e *MLKL* parece variar de um trabalho para outro, e além disso, nenhum desses trabalhos editou o sítio de ligação de determinado fator de transcrição no promotor endógeno de determinada célula, para comprovar que aquele sítio e, conseqüentemente, aquele fator de transcrição realmente impacta na regulação de *RIPK3* e/ou *MLKL*.

Com isso, este projeto tem como finalidade desvendar os mecanismos pelos quais a expressão gênica de *RIPK3* e *MLKL* é modulada, no intuito de se compreender quais as vias bioquímicas, os TFs e as regiões promotoras que controlam este aspecto tão importante na vida e morte das células.

A determinação de como estes genes são modulados é de vital importância para o entendimento de como a sensibilidade aos estímulos necroptóticos pode ser alterada dependendo do estímulo presente. Isto abre a possibilidade de estratégias de intervenção nos casos onde o aumento ou a diminuição da expressão destes genes é desejado. Como exemplo, é possível citar o caso de tumores que não expressam *RIPK3* e que são resistentes contra estímulos indutores de necroptose. Estes se tornariam sensíveis aos mesmos caso saibamos como induzir a expressão de *RIPK3* nestes tecidos.

Além do escopo da morte celular, *RIPK3* e *MLKL* agem em outras vias de sinalização, tais como a indução de inflamassoma, o controle do tráfico de vesículas, a expressão de quimiocinas e a liberação de citocinas pró-inflamatórias.^(152,153) Sendo assim, o conhecimento a ser gerado neste projeto pode também possibilitar a manipulação destas vias.

1.9 Objetivos

1. Clonar a região putativa dos promotores em construtos com genes-repórter;

2. Estimular as células contendo estes construtos com diferentes estímulos que sabidamente levam a expressão destas moléculas;
3. Determinar a região promotora mínima do *MLKL* e do *RIPK3* *in silico* e por deleções sequenciais dos construtos;
4. Analisar *in silico* os sítios de ligação a fatores de transcrição nos promotores;
5. Elucidar os fatores de transcrição que realmente se ligam aos promotores;
6. Mutar pontualmente ou editar as regiões promotoras para alterar os sítios de ligação dos fatores de transcrição ao promotor;
7. Mutar os promotores originais em diferentes células e avaliar o impacto da modulação de *RIPK3* e *MLKL* após os diferentes estímulos;
8. Intervir nas vias de regulação dos fatores de transcrição possivelmente envolvidos (ou supressão dos mesmos) para determinar sua participação relativa na modulação da expressão gênica durante os diferentes estímulos.

2 MÉTODOS

2.1 Análise *in silico* dos promotores de *RIPK3* e *MLKL*

2.1.1 Análise *in silico* dos promotores de *RIPK3* e *MLKL* e dos fatores de transcrição

Para análise *in silico* das sequências que constituem os promotores de *RIPK3* e *MLKL* humano (h*MLKL*) e murino, foram utilizados dados provenientes do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e *University of California, Santa Cruz* (UCSC Genome Browser) (<https://genome.ucsc.edu/>). Os dois bancos de dados foram utilizados para comparação e confirmação dos dados. As sequências de referências utilizadas para análise dos promotores encontram-se resumidas na tabela 2.

Tabela 2. Sequências de referências utilizadas para os genes e para o mRNA de *RIPK3* e *MLKL* humano e murino

Sequências de referência	Sequências de referência para o gene de <i>RIPK3</i> e <i>MLKL</i>	
	Humano (<i>MLKL</i> e <i>RIPK3</i>)	Murino (<i>Mkl</i> e <i>Ripk3</i>)
Gene de <i>RIPK3</i>	NC_000014.9 (NCBI) uc001wpb.4 2 (UCSC)	NC_000080.6 (NCBI) uc007uav.2 2 (UCSC)
Gene de <i>MLKL</i>	NC_000016.10 (NCBI) uc002fdb.3 2 (UCSC)	NC_000074.6 (NCBI) uc009nme.2 (UCSC)
RefSeq mRNA (NCBI) de <i>RIPK3</i>	NM_006871.3	NM_019955.2
Refseq mRNA (NCBI) de <i>MLKL</i>	NM_001142497.2	NM_001310613.1

Para a predição das sequências dos promotores o *software* Gene2Promoter foi escolhido, o qual encontra-se disponível no *site* Genomatix-NGS Data Analysis & Personalized Medicine (<https://www.genomatix.de/>). O banco de dados Eukaryotic Promoter Database (EPD) também foi utilizado para consulta e comparação.

Para análise dos TFs que potencialmente se ligam aos promotores de *RIPK3* e *MLKL* foi utilizado o *software* MatInspector, também disponível no *site* do Genomatix e sua caracterização é descrita em Cartharius et al.⁽¹⁵⁴⁾

Para os ensaios de atividade dos promotores humano e murino, escolhemos como metodologia os ensaios de luciferase. Nestes ensaios, a região

predita de um determinado promotor é inserida em um plasmídeo logo à frente de um gene repórter, que passa a ficar sob a regulação desta região clonada. Assim, a expressão do gene repórter (em nosso caso a luciferase) passa ser uma medida de atividade daquela região do promotor clonada.

Em todos os casos, houve variação nas sequências preditas por cada uma destas ferramentas, sendo que, em geral, a ferramenta Genomatix apontou regiões maiores do que as da ferramenta EPD (Figura 5). As sequências que foram extraídas do Genomatix (Genomatix.de) e clonadas no vetor encontram-se no apêndice 1, juntamente com sua data de acesso ao banco de dados.

É interessante, porém, notar que toda a região prevista pela ferramenta EPD está contida na sequência prevista pela Genomatix, indicando que possivelmente a ferramenta EPD é bem mais restritiva ao apontar as potenciais sequências promotoras (Figura 5).

Como forma de entender se as regiões preditas *in silico* possuem elementos comuns a outras regiões promotoras, fizemos uma busca de sequências TATAbox e CAAT box, e como pode ser observado na figura 5, foram encontrados potenciais sequências destes elementos nos dois potenciais promotores, aumentando as chances de que a sequência predita seja realmente a região promotora destes genes.



(a) A região promotora destacada em azul corresponde a predição obtida por meio do banco de dados EPD, (b) A região destacada em laranja corresponde a predição obtida por meio do *software gene2promoter (genomatix)*, (c) A região destacada em amarelo corresponde ao *overlap* entre as duas predições citadas, e o possível *tatabox* destacado em vermelho.

Figura 5. Predição da região promotora de MLKL murino

Para aumentar o nível de segurança de que o promotor real estaria contido na sequência a ser clonada, *primers* foram desenhados de forma a incluir toda a região predita, adicionada de uma região flanqueadora na porção 5' da sequência. A predição de região promotora para *MLKL* murino (m*MLKL*) foi de 1.194pb e resolvemos clonar 1.581pb (*upstream* ao ponto de início de transcrição – TSS), ou seja, clonamos uma região de 387pb maior. Para h*MLKL*, resolvemos clonar 1.300pb (*upstream* ao ponto de início de transcrição – TSS), sendo uma região de 275pb maior que a predita.

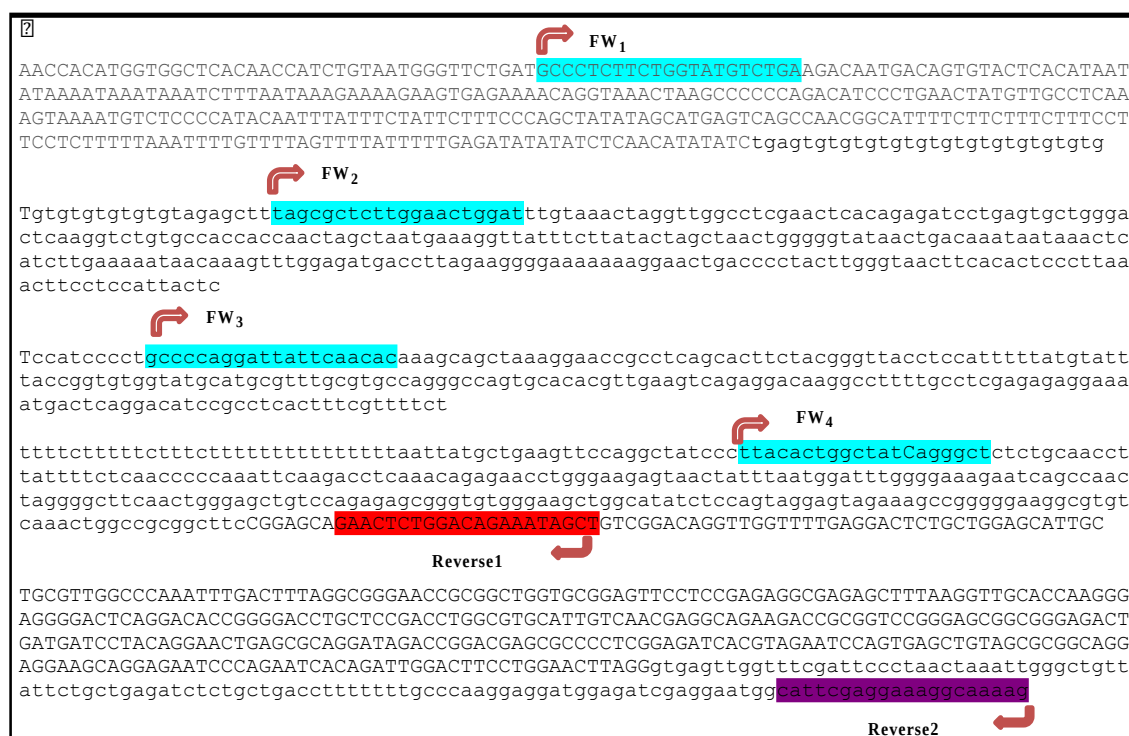
Similarmente ao que optamos fazer com *MLKL*, para garantir que toda região promotora real seria clonada, foi considerada uma região maior que a predita pelo Genomatix, sendo 1240pb (*upstream* ao TSS), 564pb maior que a região predita para *RIPK3* humano (h*RIPK3*) e 1224pb (*upstream* ao TSS), 562pb maior para

RIPK3 murino (*mRIPK3*). Essa variação da região flanqueadora se deu pela melhor posição de anelamento de *primers* nas regiões determinadas.

Um dos objetivos de nosso estudo, todavia, é determinar a mínima região que controla a expressão dos genes de *RIPK3* e *MLKL* durante sua expressão basal e também frente a estímulos, tais como o IFN- γ . Uma das possíveis estratégias seria clonar a sequência amplificada pelos *primers* citados acima em um vetor e, a partir deste construto, fazer deleções sequenciais no mesmo para obter sequências cada vez menores. Este tipo de abordagem é laborioso e demorado, além de ter um custo elevado.

Optamos, portanto, por uma estratégia mais simples, rápida e direta, que é desenhar vários *primers forward*, com 200-400pb de distância entre eles e fazer várias amplificações utilizando o mesmo *primer reverse*, o que resultaria em produtos de reação em cadeia da polimerase (PCR – *polimerase chain reaction*) (amplicons) sequencialmente menores em 200 a 400pb. A partir da clonagem simultânea destes fragmentos no vetor vazio, teríamos imediatamente clonados diferentes tamanhos de determinado promotor, evitando assim ter que fazer posteriormente o processo de deleção sequencial.

A figura 6 ilustra o descrito acima, com as sequências escolhidas para o desenho de *primers* para o promotor de *mMLKL*. É importante ressaltar que para o gene *mMLKL* foram desenhados dois *primers* reversos (Rev). Devido ao fato da sequência proteica de *MLKL* iniciar-se apenas no segundo exon do mRNA, optamos por desenhar um *primer* que se posiciona no início do primeiro exon e um segundo *primer* que se posiciona logo após o final do primeiro exon, após a região indicada pelo *overlap* dos *softwares* de predição utilizados. Desta forma, aumentamos nossa probabilidade de encontrar a região promotora real; caso a região entre os Rev não fosse importante, não seria necessário fazer a deleção desta região, por já termos clonado a região promotora utilizando o Rev mais distal.



As sequências em azul indicam o local de ligação dos *primers forwards*, e em vermelho e roxo estão representados o local de ligação dos dois *primers reversos*.

Figura 6. Ilustração da posição dos *primers* adotado para a clonagem de porções crescentes do possível promotor do gene MLKL murino

2.2 Amplificação, clonagem e purificação dos construtos

2.2.1 Desenho dos oligonucleotídeos para clonagem

Os oligonucleotídeos (*primers*) para PCR qualitativa foram desenhados por meio da utilização da ferramenta Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). Para PCR quantitativa foi utilizada a ferramenta do NCBI “*pick primers*” que utiliza o Primer3 e BLAST para gerar as sequências dos oligonucleotídeos. Além destas ferramentas, os oligonucleotídeos foram analisados pela *oligoAnalyzer tool* do *Integrated DNA technology* (IDT) (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) para checar as características dos *primers*, tais como chance de formar *hairpins*, *self-dimers*, *hetero-dimers*, além de mostrar em qual temperatura estes poderiam ocorrer.

Foram adicionados aos *primers* os sítios de restrição necessários para clonagem. Para tanto, foi adicionado na extremidade 5' o sítio de restrição de 6pb

de acordo com a enzima escolhida, seguido de 6pb aleatórias ricas em CG. Essa sequência extra é adicionada para funcionar como uma espécie de “ancoragem” providenciando apoio para as enzimas de restrição no momento da clivagem. Os *primers* desenhados estão contidos na tabela 3.

Tabela 3. Sequência dos *primers* utilizados para clonagem

Promotor/Posição	Sequência
mMLKL FW -1089	5' GCATGA GAG CTC GCC CTC TTCTGG TAT GTCTGA 3'
mMLKL FW -0761	5' GCATGA GAG CTC TAG CGCTCT TGG AACTGG AT 3'
mMLKL FW -0491	5' GCATGA GAG CTC GCC CCA GGA TTA TTC AAC AC 3'
mMLKL FW -0234	5' GCATGA GAG CTC TTA CACTGG CTATCA GGG CT 3'
mMLKL REV -0001	5' GAC GGG AAG CTT AGCTAT TTCTGT CCA GAG TTC 3'
mMLKL REV +0472	5' GAC GGG AAG CTT CTT TTG CCT TTC CTC GAA TG 3'
hMLKL FW -0930	5' GCATGA GAG CTC CTC CCA TTG GTT AAT TGG TGT 3'
hMLKL FW -0694	5' GCATGA GAG CTC TGA TGATGC AGG AGA CGA AG 3'
hMLKL FW -0413	5' GCATGA GAG CTC GAG GCA AAT AGT CTG TTG AGT 3'
hMLKL FW -0115	5' GCATGA GAG CTC CTATTCTGA ATC CCC AGC CC 3'
hMLKL REV +295	5' GAC GGG AAG CTT CACTCT GCT GACTGT ACC GGA 3'
mRIPK3 FW -0969	5' GCATGA GAG CTC TGT GTG TGC CGCTTA GTA GG 3'
mRIPK3 FW -0600	5' GCATGA GAG CTC ATT TAG TCA GGA GGC AGA TG 3'
mRIPK3 FW -0219	5' GCATGA GAG CTC CCA TCCTCC CTT CAT CAA AA 3'
mRIPK3 REV +0212	5' GAC GGG AAG CTT CTA GCG GCT TCCTGG AGT TA 3'
hRIPK3 FW -0959	5' GCATGA GGT ACC TTC CCA CAA CCT CCA GTC 3'
hRIPK3 FW -0761	5' GCATGA GGT ACC CCT CTG GAT GGG CTG ATA AA 3'
hRIPK3 FW -0469	5' GCATGA GGT ACC AGG TAC TTA AACTCT CAG TG 3'
hRIPK3 FW -0061	5' GCATGA GGT ACC AGG TGC TCA GGA AAC GCT AG 3'
hRIPK3 REV +0216	5' GAC GGG AAG CTT GCA CGA CAT CAG GCT GGA AG 3'
Primers utilizados para restrição da região promotora de MLKL murino:	
mMLKL FW 5.2	5' GCATGA GAG CTC AAGTCAGAGGACCAAGGCCTT 3'
mMLKL REV 7.1	5' GAC GGG AAG CTT AGCCCTGATAGCCAGTGTAA 3'
mMLKL REV 2.2	5' GAC GGG AAG CTT ATTCTGGGATTCTCCTGCTT 3'

Primers desenhados para a clonagem dos promotores de *MLKL* e *RIPK3* humano e murino. mMLKL: *MLKL* murino, hMLKL: *MLKL* humano, mRIPK3: *RIPK3* murino e hRIPK3: *RIPK3* humano. Em verde estão as bases aleatórias para o apoio da enzima de restrição, em vermelho o sítio de restrição para *SacI*, em roxo e ciano estão os sítios de restrição para *HindIII* e *KpnI*, respectivamente.

2.2.2 Extração de DNA genômico

Para extração de DNA genômico foi utilizado o kit *Purelink genomic DNA mini* (Invitrogen). Resumidamente, as células foram desaderidas da placa de cultivo utilizando-se o reagente tripsina 0,25% (Invitrogen), centrifugadas a 300g por 5min e ressuspensas em 200µL de *phosphate-buffered saline* (PBS). A essa solução foi adicionado 20µL de proteinase K, 20µL de RNase e 200µL do tampão de ligação. A reação foi incubada a 55°C por 10min para promover digestão de proteínas. Após a incubação, adicionou-se 200µL de etanol absoluto e a homogeneização foi feita por vortex. O lisado foi transferido para uma coluna de purificação e centrifugado a 10.000g por 1min a temperatura ambiente. Após a centrifugação, a coluna foi lavada duas vezes seguidas pelo tampão de lavagem e centrifugada a velocidade máxima por 3min. Após a última centrifugação, a coluna foi transferida para um novo microtubo onde adicionou-se 100µL do tampão de eluição, seguida por uma incubação de 1min a temperatura ambiente e centrifugada a velocidade máxima por 1min. O material foi quantificado pelo aparelho Nanodrop (Invitrogen) e armazenado a -20°C.

2.2.3 Reação em cadeia da polimerase

A amplificação dos fragmentos a serem clonados foi realizada pela PCR. O ciclo básico para iniciar a otimização das condições de PCR foi: 94°C por 3min + 40x (94°C por 30s, 51°C por 30s e 68°C por 90s) + 68°C por 10min + 4°C em *hold*.

As reações seguiram as seguintes concentrações: 2.5U *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen), 1X Tampão (-MgCl₂), 1.5mM MgCl₂, 0.2mM DNTPs (Invitrogen), 100uM de cada *primer* (Invitrogen), em um volume total de 49µL completados com água livre de RNase e DNase (Invitrogen). À esta reação foi adicionado 1µL de DNA genômico, totalizando 50µL/reação. Quando estas condições não conferiram resultados ideais, a concentração de MgCl₂ foi otimizada para uma melhor especificidade da enzima Taq Polimerase, de acordo com cada reação.

Para a purificação das reações, utilizamos o kit *QIAquick PCR Purification* (QIAGEN), com o intuito de eliminar residuais componentes da reação, como *primers*, DNTPs e tampão, que poderiam atuar inibindo ou diminuindo o rendimento e a qualidade de suas posteriores aplicações.

2.2.4 Gel de agarose

As amostras de DNA foram corridas em gel de agarose 1% com tampão TAE (Tris 40mM, Ac. Acético 19mM, EDTA 1mM PH 8,0). O marcador molecular utilizado foi o *1 Kb Plus DNA ladder* (Invitrogen) e o tampão de amostra foi o 6x DNA Load Dye (Invitrogen). Para revelação utilizamos *SYBR Safe DNA gel stain* (Invitrogen). A visualização e a documentação foram realizadas através do aparelho *ImageQuant 300* (GE Healthcare Life Sciences).

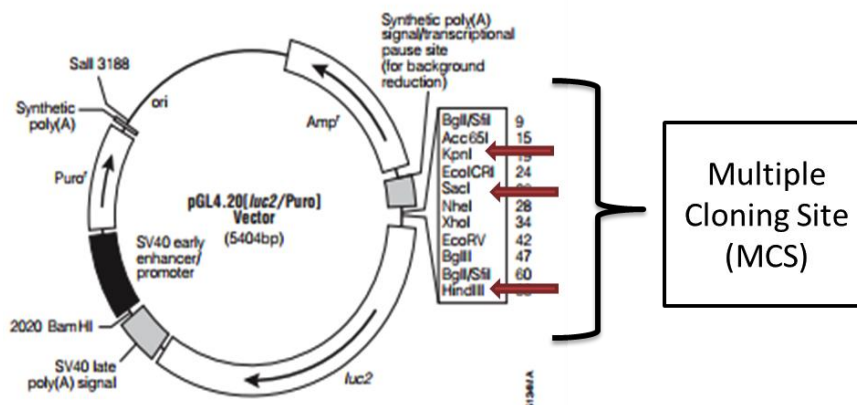
2.2.5 Estratégia de clonagem

A estratégia de clonagem escolhida para gerar os construtos de interesse foi através do desenho de vários *primers forwards*, com 200-400pb de distância entre eles, utilizando o mesmo *primer Rev*. Essa estratégia resultou em diferentes produtos de PCR sequencialmente crescentes em 200-400pb.

A partir da clonagem simultânea dos fragmentos no vetor pGL4.20 vazio, foram obtidos diferentes tamanhos da região promotora predita, evitando a necessidade de futuras deleções sequenciais.

2.2.6 Digestão do vetor pGL4.20 [LUC2/Puro] e dos insertos amplificados via reação em cadeia da polimerase

Para as reações de digestão do vetor pGL4.20[LUC2/PURO] e dos produtos de PCR, foram utilizadas as enzimas *HindIII* (5' A|AGCTT 3') e *SacI* (5' GAGCT|C3'), exceto para o promotor de *hRIPK3*, em que foi utilizada a enzima *KpnI* (5' GGTAC|C 3'), no lugar da *SacI*, todas provenientes da *New England Biolabs Inc*. Estas enzimas foram escolhidas com base no sítio de clonagem múltiplo (MCS – *multiple cloning site*) contido no vetor, como exemplificado no mapa do vetor (Figura 7).



As enzimas utilizadas para clonagem estão destacadas com flechas em vermelho na região de sítio de clonagem múltiplo (*multiple cloning site*), que consiste em uma região com diferentes sítios de restrição.

Figura 7. Mapa do vetor pGL4.20[luc2/puro] (promega)

As enzimas *HindIII* e *SacI/KpnI* contêm tampões diferentes, sendo que quando não estão na presença de seu tampão específico, atuam com apenas 50% de atividade. O protocolo seguido foi sugerido pela ferramenta NebCloner (<http://nebcloner.neb.com/#!/redigest>), que consistiu em uma digestão dupla (DD) contendo 1µL de cada enzima, 1000ng do DNA, 5µL de tampão 2.1 e água livre de DNase e RNase para um total de 50µL/reação. A reação foi incubada por uma hora a 37°C, e logo após esse período foi purificada através do kit de purificação *QIAquick PCR Purification* (QIAGEN), logo não sendo necessária a inativação por calor.

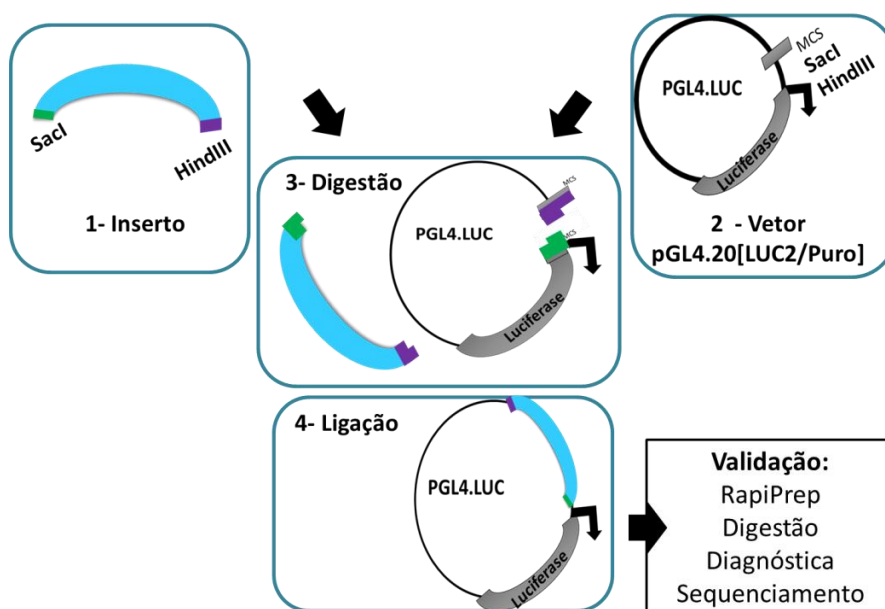
As amostras foram quantificadas pelo aparelho Nanodrop (Invitrogen), e então permaneceram a 4°C até a realização da reação de ligação.

2.2.7 Ensaio de ligação e transformação do vetor pGL4.20 [LUC2/Puro] e os diferentes insertos de RIPK3 e MLKL

Após a reação de digestão, o vetor pGL4.20 gerou em suas extremidades pontas coesivas de acordo com a enzima de restrição que digeriu cada extremidade. Da mesma forma, os insertos amplificados via PCR continham as mesmas pontas coesivas (já que foram digeridos com as mesmas enzimas). Consequentemente, as pontas geradas no inserto eram complementares as extremidades do vetor, podendo se complementarem e gerar o construto desejado, como exemplificado na figura 8. Para reação de ligação, utilizou-se a enzima T4 ligase,

que catalisa a ligação fosfodiéster do DNA, unindo a extremidade do vetor à extremidade do inserto.

Utilizamos a enzima T4 DNA ligase (1U/ μ L) (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. O protocolo consistiu na adição de 4 μ L do tampão 5X, 20ng de vetor, 60ng de inserto, 1 μ L de T4 ligase e água livre de DNase e RNase para completar a reação para 20 μ L. A reação foi incubada por 10min a temperatura ambiente, e logo em seguida bactérias supercompetentes TOP10 foram transformadas com 1 μ L da reação, e plaqueadas em placas contendo meio LB ágar com ampicilina, seguindo o protocolo de transformação cloreto de cálcio (CaCl_2) (descrito na próxima seção).



1- O inserto amplificado por PCR contendo os sítios de restrição em suas extremidades (exemplificado pelas cores verde e roxo). 2- Vetor pGL4[luc2/puro] contendo os mesmos sítios de restrição do inserto (aqui exemplificado pela *HindIII* e *SacI*). 3- Reação de digestão, criando as mesmas pontas coesivas no inserto e vetor, as quais são complementares. 4- Reação de ligação, que une as extremidades do inserto as do vetor, gerando o construto de interesse, seguida pelas etapas de validação (rapiprep, digestão diagnóstica e sequenciamento). É possível observar que após a clonagem, o inserto inserido fica *upstream* ao gene de luciferase, que servirá como a forma de leitura para mensurarmos a atividade do promotor.

Figura 8. Desenho experimental para clonagem

2.2.8 Validação do ensaio de ligação: *screening* das colônias que continham o construto esperado

Para realizar um primeiro *screening* rápido e escolher os clones que possivelmente possuíam o construto correto, utilizamos a técnica de RapiPrep. Para essa técnica, foram escolhidas 12 colônias de cada clonagem, as quais foram inoculadas em 2mL de meio LB contendo ampicilina e permaneceram a 37°C sob agitação constante por aproximadamente 16h. Deste pré-inóculo, 50µL foram transferidos para um microtubo onde adicionou-se 25µL de uma solução de fenol:clorofórmio (1:1) e 5µL de Azul de bromofenol (Azul de bromofenol e Glicerol). A reação foi vortexada vigorosamente para romper a parede das bactérias. Após uma centrifugação de 12.000g por 3min, 20µL do sobrenadante foram aplicados a um gel de agarose 1%.

Posteriormente, foi possível selecionar com base no tamanho do DNA plasmidial bacteriano, os clones que potencialmente continham o construto esperado, pois estes eram maiores, ou seja, continham um maior número de pb quando comparados ao DNA plasmidial selvagem.

Foram selecionados 3 clones que possivelmente continham o construto de interesse os quais foram purificados em escala pequena utilizando o kit *QIAprep Spin MiniPrep* (QIAGEN).

Com o construto amplificado e purificado, o último passo do *screening* foi realizar uma digestão diagnóstica, clivando o construto em uma digestão simples (DS) e em uma DD, com as mesmas enzimas de restrição utilizadas no protocolo de clonagem. Para as digestões diagnósticas, foram clivados 500ng de DNA para cada uma das reações, utilizando a enzima *HindIII* para DS e *HindIII* e *SacII/KpnI* para DD. As amostras que apresentaram resultados satisfatórios foram enviadas para sequenciamento para verificação da integridade da sequência clonada.

2.2.9 Sequenciamento Sanger

O sequenciamento foi realizado pelo Instituto Genoma Humano – USP, e para este serviço as amostras foram enviadas contendo 5µL de construto a uma concentração de 150ng/µL e 2,5µL de *primer* SeqFW ou SeqRV a 5uM. Os

primers utilizados foram desenhados para se ligarem antes (*SeqFW*) e depois (*SeqRV*) da região de MCS, com o intuito de se sequenciar todo inserto presente no construto.

A análise do sequenciamento foi realizada através do programa *Macvector*, com alinhamento global pelo *Clustalw*. Apenas as amostras que não apresentaram nenhuma alteração em sua sequência quando alinhada com a sequência referência foram selecionados para prosseguir para os próximos passos.

As amostras selecionadas foram purificadas pelo kit *QIAGEN Plasmid Maxi*, que permite a amplificação em larga escala.

2.2.10 Transformação em células competentes pelo método de choque térmico

Para transformação dos construtos e/ou das reações de ligação foram utilizadas células *E. coli* supercompetentes geradas neste projeto (dados e protocolo não mostrados). Para clonagem foi escolhida a cepa TOP10 e, para amplificação dos construtos e demais vetores utilizados, a cepa DH5 α foi utilizada.

Para transformação, as bactérias foram descongeladas no gelo, 1 μ L do vetor ou reação de ligação foi gentilmente adicionado a 50 μ L de bactérias em tubos de 1,5mL e encubados no gelo por 30min. Após esse período, os tubos foram transferidos para um termobloco a 42°C por 90 segundos e retornados para o gelo por 1,5min. Foi então adicionado 450 μ L de meio LB (*bacto-tryptone*, *bacto-yeast extract*, NaCl) sem antibióticos e os tubos foram incubados a 37°C por 30min sob agitação de 200 RPM. Decorrido este tempo, 50 μ L de bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB ágar (LB acrescido de 1,5% de ágar) contendo 100 μ g/mL de ampicilina e as placas incubadas a 37°C por aproximadamente 16h.

Os genótipos das cepas utilizadas estão descritos a seguir:

- **Top10:** F⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ ⁻
- **DH5 α :** F⁻ endA1 *glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20* ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(*r_K⁻m_K⁺*), λ ⁻

2.2.11 Purificação de vetores

Os plasmídeos utilizados foram purificados em pequena (mini-prep) e larga escala (maxi-prep), de acordo com a necessidade. Utilizamos o kit *Qiagen Plasmid purification*, seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante.

Brevemente, uma colônia de interesse foi inoculada em meio LB seletivo e crescida a 37°C por 16h. Após esse período, o inóculo foi centrifugado a 6000g por 15min, o *pellet* ressuspensionado em *buffer* P1, P2 (ambos atuam na lise bacteriana) e P3 (atua na precipitação) e centrifugado a 20000g por 30min. O sobrenadante foi aplicado em colunas QIAGEN-tip (fornecidas pelo Kit). Após duas etapas de lavagem o DNA foi eluído em *buffer* QF, precipitado com isopropanol e centrifugado a 3095g por 60min em tubo falcon de 15mL. O *pellet* formado foi lavado com 70% etanol e centrifugado sob as mesmas condições da centrifugação anterior. O *pellet* foi então ressuspensionado em água livre de DNase e RNase e quantificado pelo aparelho *Nanodrop* (Invitrogen). As amostras foram armazenadas a -20°C.

As quantidades dos reagentes utilizados variaram conforme a escala de purificação. Para o sequenciamento utilizamos kit de pequena escala e para clonagens e experimentos de cultura celular utilizamos larga escala.

2.3 Ensaios de responsividade celular frente aos estímulos moduladores da expressão de *MLKL*

2.3.1 Cultivo celular

As células utilizadas neste projeto foram mantidas em uma sala especializada apenas para cultura de linhagens celulares (que não tem contato com células primárias), em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Todas as células utilizadas foram mantidas em meio DMEM High glucose (Invitrogen) suplementado com 1% glutamina, 1% antibiótico penicilina/streptomicina (*GIBCO*), 10% Soro fetal bovino (*GIBCO*) e 1% de aminoácidos não essenciais (Invitrogen). As células utilizadas foram:

- MEF (Fibroblasto embrionário murino);

- NIH3T3 (Fibroblasto embrionário murino);
- 3T3 SA (Fibroblasto embrionário *from Swiss Albin Mouse*);
- L929 (Fibroblasto embrionário murino);
- HT-29 (Adenocarcinoma de colon colorectal humano);
- HEK-293 (Rim embrionário humano 293).

2.3.2 Estímulos moduladores de *RIPK3* e *MLKL*

As células embrionárias de camundongo (MEF – *mouse embryonic fibroblasts*), NIH 3T3, HEK-293T e HT-29 foram plaqueadas entre $0,5 \times 10^5$ a $1,5 \times 10^5$ células/poço (dependendo do tipo celular) em placa de 12 poços. Após 24h de aderência, essas células foram tratadas com diferentes estímulos já descritos na literatura como moduladores da expressão de *RIPK3* e/ou *MLKL*, sendo os testados até agora: IFN- γ murino (cat# 315-05- PeproTech), IFN- β murino (cat# 12405-1 PBL Assay), IFN- β humano (cat# PHC4244 GIBCO), IFN- β humano (cat# 11415-1 PBL assay), shikonina (cat# S7576 Sigma) e ácido palmítico (cat# P0500 Sigma).

Para todos os estímulos as células foram estimuladas ou não com diferentes concentrações das drogas citadas, e a extração de proteína e/ou RNA foram realizadas nos tempos: 0h (T0h), e/ou 16h e/ou 24h e/ou 36h após o tratamento.

2.3.3 Extração e quantificação de proteínas

Para extração de proteínas, transferimos para um tubo de 1,5mL o sobrenadante de cada poço e 200 μ L de PBS utilizado para lavar o poço. As células foram desaderidas pelo reagente tripsina 0,25% (Invitrogen) e então todo material recolhido do poço foi centrifugado a 250g por 5min a 4°C. Após a centrifugação, as amostras foram ressuspensas em tampão *radioimmunoprecipitation assay buffer* (RIPA) (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, 0,1% SDS, 0,5% Doc) contendo um coquetel de inibidor de proteases (Roche). A proporção utilizada foi de 100 μ L de tampão a cada 10^6 células.

As amostras foram quantificadas pelo kit *Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Fisher), e lidas por espectrofotometria no comprimento de onda de 650nm

(*Glomax Discover Promega*). Após a quantificação, as amostras foram preparadas para conter de 10-20µg de proteína, e seu volume final ajustado para 15µL, contendo tampão RIPA e tampão de amostra 6x (Azul de bromofenol, glicerol, SDS, 2M Tris-HCl).

Após o preparo, as amostras foram armazenadas a -80°C.

2.3.4 Western Blot

As amostras foram aquecidas a 100°C por 5min previamente a sua adição ao gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%. Foram corridos 5µL do marcador molecular *Kaleidoscope (Bio-Rad)* e 15µg de amostras por 120min a 100V. A transferência das amostras do SDS-PAGE para a membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), ativada com metanol, foi feita através de uma cuba de transferência resfriada no gelo por 80min a 295 miliamperes (mA). Após a transferência, a membrana foi bloqueada em uma solução 5% leite desnatado TBS-T (NaCl, Tris, Tween) por 1h.

Em seguida, a membrana foi cortada de acordo com o peso molecular das proteínas de interesse, e incubada com seu anticorpo primário contra a proteína de interesse em uma solução de 5% de leite desnatado em TBST. A incubação foi realizada por aproximadamente 16h a 4°C com agitação constante.

Para as proteínas fosforiladas, ao invés de 5% de leite desnatado em TBST utilizamos 3% de BSA em TBS-T para o bloqueio e para diluição dos anticorpos.

Os anticorpos primários utilizados e sua correspondente titulação foram:

- Anti-mouse MLKL (cat# AP14272 Abgent EUA), 1:1000;
- Anti-rabbit MLKL (cat# 14993S Cell Signalling), 1:1000;
- Anti-rabbit RIPK3 (cat# 15828 Cell Signaling), 1:1000;
- Anti-rabbit RIPK3 (cat# 374639 Santa Cruz Biotechnology), 1:100;
- Anti-mouse GAPDH (cat# MA515738 Thermo Fisher Scientific), 1:5000;
- Anti-mouse STAT1 (cat# SC-464 Santa Cruz), 1:200;
- Anti-mouse pSTAT1 (cat# SC-136229 Santa Cruz), 1:200;
- Anti-mouse STAT3 (cat# SC-8019 Santa Cruz), 1:200;

- Anti-mouse pSTAT3 (cat# 9145L Cell Signaling), 1:1000;
- Anti-mouse STAT5A/B (cat# SC-81524 Santa Cruz), 1:200;
- Anti-mouse c-JUN (cat# SC-74543 Santa Cruz), 1:200;
- Anti-mouse p-c-Jun (cat# SC-822 Santa Cruz), 1:200;
- Anti-FOS (cat# SC-166940 Santa Cruz), 1:200;
- Anti-rabbit JAK2 (cat# 3230S Cell Signaling), 1:1000;
- Anti-rabbit p-JAK2 (cat# 3774S Cell Signaling), 1:1000.

A titulação representa quantidade de anticorpo (μ L):quantidade da solução diluente (mL).

Após a incubação com o anticorpo primário as membranas foram lavadas com TBS-T por três vezes de 10min. Na sequência, a membrana foi incubada por 1h (evitando-se luz) com seu anticorpo secundário *anti-mouse* IgG (cat# 31430 Thermo Fisher, 1:5000), ou *anti-rabbit* IgG (cat#31460 Thermo Fisher, 1:5000), ambos acoplados a enzima peroxidase HRP.

Posteriormente à incubação, a membrana foi lavada novamente com TBS-T três vezes por 10min e revelada com a solução ECL (*Amersham ECL Prime Western Blotting Detection reagent – GE*). A documentação foi feita pelo fotodocumentador Chemidoc (Bio-Rad), e o tempo de exposição variou de acordo com cada proteína alvo.

A quantificação das bandas foi feita pelo *software* ImageLab, considerando a razão proteína alvo/proteína normalizador (*housekeeping*), e a plotagem dos gráficos foi realizado pelo programa *GraphPad*.

2.3.5 Extração de RNA

A extração de RNA foi executada pelo kit *PureLink RNA mini* (Invitrogen). Para lise celular seguimos o mesmo procedimento descrito para a extração de proteínas, entretanto, após a centrifugação de 250g por 5min, o *pellet* foi ressuspensionado em 300 μ L de tampão de lise fornecido pelo kit contendo 1% de 2-Mercaptoethanol, com vortexação vigorosa e, em seguida, as amostras foram armazenadas a -80°C.

Para a extração de RNA, seguimos as instruções do fabricante. Brevemente, após descongelar as amostras no gelo e vortexar vigorosamente, adicionou-se 300µL de etanol 70% às amostras, as quais foram homogeneizadas por vortexação, e o volume total transferido para uma coluna providenciada pelo kit. A coluna foi centrifugada a 12000g por 30 segundos, lavada com tampão de lavagem seguido de uma centrifugação a 12000g por 30 segundos, este processo foi repetido duas vezes. Para secar completamente a membrana da coluna, foi realizada uma centrifugação de 12000g por 2min e então a coluna foi transferida para um novo microtubo. Para eluição, adicionou-se 30µL de tampão de eluição ao centro da coluna, a qual foi incubada por 1min a temperatura ambiente e centrifugada a 12000g por 2min.

A quantificação foi feita pelo aparelho Nanodrop (Invitrogen) e sua integridade analisada em gel de agarose 1%. As amostras foram armazenadas em -80°C ou prosseguiram diretamente para transcrição reversa.

2.3.6 Transcrição reversa

Para a síntese de um DNA complementar (cDNA) a partir de uma molécula de mRNA foi realizada a técnica de transcrição reversa.

Este protocolo consistiu na adição de 1µL de oligo(dT) (Invitrogen) a 500µg/mL, 1µg de RNA, 1µL de DNTP a 1mM, completados para 13µL com água livre de DNase e RNase. A reação foi aquecida a 65°C por 5min, brevemente incubada em gelo, e após esta etapa, foi adicionado 4µL de tampão 5X e 2µL de *dithiothreitol* (DTT) 0.1M. Após vortexada, a reação foi incubada a 37°C por 2min, adicionando-se 1µL da enzima M-MLV RT (Invitrogen). O conteúdo foi incubado a 37°C por 50min e depois a reação foi inativada por 15min a 70°C.

Após o término, as amostras foram armazenadas a -20°C.

2.3.7 Análise da expressão gênica de RIPK3 e MLKL pela reação de PCR em tempo real

Os padrões relativos de expressão gênica foram determinados pela técnica de qPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*) utilizando-se *primers* específicos.

Para essa técnica, preparamos o *master mix* da reação adicionando 10µL de *SYBR Green master mix* (Invitrogen), 0,4µL de *primer forward* e *reverse* a 10uM completados com água livre de DNase e RNase para 18µL totais/amostra. Deste *master mix* foram transferidos 18µL para cada poço de uma placa ótica de 96 poços (*Applied Biosystems*), e então adicionou-se 2µL de cDNA a 5ng/µL. A placa foi selada com adesivo de filme ótico (*Applied Biosystems*).

As amostras foram analisadas em triplicatas e os *primers* utilizados estão contidos na tabela 4. O aparelho utilizado foi o *QuantStudio 6* (*Applied Biosystems*) e a ciclagem seguida foi a sugerida pelo fabricante: 95°C por 10min, 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos, por 40 ciclos.

Decorrida a reação, utilizou-se o *software QuantStudio V1.3* (*Applied BioSystems*) para estabelecimentos dos valores de *Cycle Threshold* (CT) que representa o limite da fluorescência para a fase exponencial de amplificação, na qual a detecção do sinal de fluorescência decorrente da reação é superior a fluorescência inespecífica emitida. Para determinar os níveis relativos de expressão gênica, aplicou-se o método *Comparative Cycle Threshold* (Ct). Para normalização dos valores de Ct da expressão do gene de interesse utilizou-se o cálculo de ΔCt , onde o valor do Ct da actina foi subtraído do valor de Ct do gene de interesse ($\Delta Ct = Ct \text{ gene interesse} - Ct \text{ gene endógeno}$). Por fim, os valores finais de expressão foram calculados utilizando a fórmula aritmética padrão de $2^{-\Delta Ct}$.

Tabela 4. Sequência dos *primers* utilizados para qPCR

Gene	Sequência
mMLKL FW	5' CTGGCAGAGAACGAATCTTGG 3'
mMLKL RV	5' TCCTCTTACACCTTCTTGTC CG 3'
mRIPK3 FW	5' AAGTTATGGCCTACTGGTGCG 3'
mRIPK3 RV	5' TCCGAACCCTCCTTTACCCA 3'
mActin FW	5' GTCATCCATGGCGAACTGGT 3'
mActin RV	5' GTCATCCATGGCGAACTGGT 3'
mSTAT1 FW	5' AGAGCCAGTCGTTTCAGCTC 3'
mSTAT1 RV	5' AGCAATCACCACACACAGCA 3'
mSTAT3 FW	5' TCTGTGTGACACCATTCATTGAT 3'
mSTAT3 RV	5' GACTCAAAGTCCCTCCTGC 3'
mSTAT5b FW	5' CCATGTCTGTGACCCAAAGTAA 3'
mSTAT5b RV	5' TCACAACCTACAGAGCCCGAA 3'
mFOS FW	5' CTACCATTCCCCAGCCGAC 3'
mFOS RV	5' ATCTGCGCAAAGTCCTGTG 3'
mJun FW	5' CCAGCAACTTTCCTGACCCA 3'
mJun RV	5' TTTACAGTCTCGGTGGCAGC 3'

2.4 Medidas de atividade do promotor

2.4.1 Transfecção celular por Lipofectamina 3000

Para transfecção celular os reagentes lipofectamina 3000 e DNA com o reagente P300 foram diluídos separadamente em meio Opti-MEM (Invitrogen). Após essas preparações, as duas diluições foram misturadas a uma proporção 1:1, incubadas a temperatura ambiente por 15min, e entregue às células em forma de gotejamento.

Para os ensaios de otimização, utilizamos o vetor pcDNA3-EGFP (*Addgene*), e a análise da eficiência da transfecção foi realizada 24h, 36h e 48h pós transfecção pelo microscópio de fluorescência FSX100 (*LifeScience*), e quantificada por citometria de fluxo (*LSFORTESSA BD*). O tempo de 48h pós-transfecção mostrou a melhor eficiência (dados de otimização não mostrados). Esse protocolo de cálculo da eficiência de transfecção através do vetor EGFP por citometria foi realizado para todas as linhagens usadas neste estudo.

2.4.2 Ensaios de Luciferase para avaliar atividade da região promotora

Para medir a atividade da região promotora através da expressão de luciferase, foi utilizado o kit *Dual Luciferase Reporter Assay System* (cat# E1910 *Promega*) seguindo as instruções do fabricante.

Resumidamente, o protocolo consistiu em plaquear $0,5 \times 10^5$ ou $0,25 \times 10^5$ de células NIH3T3 ou MEF em placas de 12 ou 24 poços, respectivamente. Após 24h de adesão celular, os poços foram transfectados com os construtos e após 12h foram estimulados ou não com IFN- γ . A dose e o tempo de estímulo foram escolhidos de acordo com o nível de expressão gênica/proteica (descrito acima). Após o tempo de estímulo, o meio dos poços foi descartado, lavado com PBS, e para desaderência das células foi utilizado o tampão de lise providenciado pelo kit. Após a lise, 20 μ L do lisado celular foram transferidos para placas brancas opacas, necessárias para experimentos de luminescência para evitar o *crosstalk* entre as amostras. O tampão de lise foi utilizado como branco, e a leitura das amostras foi realizada com o

aparelho GloMax Discovery (Promega) seguindo o *Dual Luciferase Reporter Assay protocol*, que contém o substrato luciferina, previamente estabelecido pela empresa e contido no aparelho.

Para transfecção celular dos construtos gerados, foi feita uma co-transfecção dos construtos que expressam Luciferase Firefly (pGL4) juntamente com o vetor controle contendo a Luciferase Renilla (pRL-SV40), ambos da *Promega*. Foi utilizado uma proporção de 1:10 para Renilla:Firefly. Após a mensuração das duas luminescências, a normalização dos dados foi gerada pela razão Firefly/Renilla de cada amostra e os dados foram analisados no *software* GraphPad calculando a média e desvio padrão das amostras.

2.4.3 Ensaio de marcação intracelular para interferon gama por citometria de fluxo

Para avaliar se o método de transfecção por lipossomo estava induzindo a expressão de IFN- γ em células MEF, realizamos um ensaio de marcação intracelular. Os reagentes de fixação e permeabilização utilizados (*FIX & PERM Cell reagentes*) foram adquiridos da Thermo Fisher.

Brevemente, aproximadamente 10^6 células foram plaqueadas em placa de 6 poços e após 24h de aderência, foram transfectadas com 250 μ L do complexo contendo DNA+lipofectamina, seguindo o mesmo protocolo de transfecção utilizado para ensaios de luciferase. Após 8 e 24h de transfecção as células foram coletadas, centrifugadas a 300g por 5min, seu *pellet* ressuscitado em 100 μ L de solução de fixação (reagente A, Thermo Fisher) e incubadas a temperatura ambiente por 15min. Após esse período, as células foram lavadas com 3mL de *staining buffer* (PBS, 0,1% NaN₃, 5% SFB) e incubadas por 20min contendo 100 μ L da solução de permeabilização (reagente B) adicionados de 5 μ L do anticorpo *APC Anti mouse-IFN γ* (*Biologend*) ou *APC mouse igG1* (*Biologend*), para controle do isótipo.

Decorrido esse período de incubação, as células foram lavadas com 3mL de *staining buffer* e o *pellet* ressuscitado em 500 μ L do mesmo tampão. As amostras foram analisadas no citômetro *Attune Nxt* (*Thermo Fisher*).

Previamente à coleta, foi adicionado nas últimas 6 e 12 horas de incubação para 8 e 24h do *timepoint*, respectivamente, as células o inibidor de transporte intracelular, comercialmente conhecido como *GolgiStop* (BD).

2.5 Intervenção farmacológica nas vias de sinalização potencialmente envolvidas na modulação de MLKL

Os inibidores farmacológicos a seguir foram utilizados nesta abordagem de inibição de vias de sinalização potencialmente envolvidas com a regulação de MLKL de acordo com nossos experimentos de TFs *in silico*. Abaixo encontra-se destacada a concentração utilizada, como também o alvo de inibição de cada um.

- **Ruxolitinib** (cat# SC-364729) 10uM: Inibidor de *Janus-associated kinases* (JAK); JAK 1, JAK 2 e JAK 3;
- **STATTIC/STAT3 inhibitor V** (cat# SC-202818) 1uM: Inibidor de STAT3;
- **Jak Inhibitor I** (cat# SC-204021) 10uM: Inibidor de JAK 1, JAK 2 e JAK 3;
- **SP600125** (cat# SC-200635) 10UM: Inibidor de *c-Jun N-terminal Kinases* (JNK); JNK1, JNK2 e JNK3;
- **STAT5 inhibitor** (cat# SC-355979) 10uM: Inibidor de STAT5.

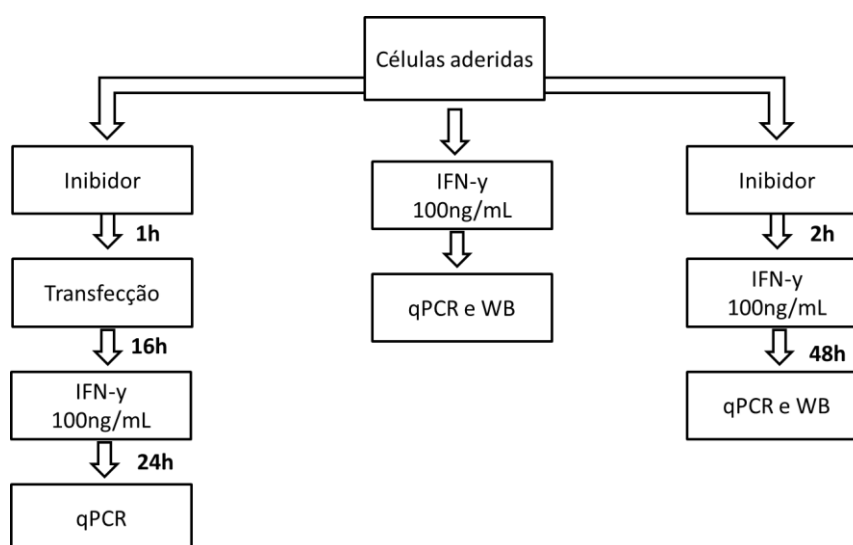
Em uma primeira abordagem, células MEF foram plaqueadas em placas de 12 poços em uma confluência de $0,5 \times 10^5$ por poço e após aproximadamente 24h de aderência as células foram tratadas com a concentração de cada inibidor farmacológico, como indicado acima. Após 1h de tratamento, as células foram ou não transfectadas com Lipofectamina 3000, e após 16h, 100µL de cada poço foi descartado e então adicionado 100µL de IFN-γ à 100ng/µL de. Após 24h do tratamento com IFN-γ e totalizando aproximadamente 48h de experimento, as células foram coletadas para extração de RNA.

Em uma segunda abordagem, seguindo o mesmo raciocínio, com exceção do método de transfecção, células MEF foram tratadas com inibidor

farmacológico, e após 2h foram estimuladas com 100ng/mL de IFN- γ . Após 48h de estímulo, as células foram coletadas para extração proteica.

E por fim, em uma terceira abordagem, além da inibição das vias, células MEF foram estimuladas com 100ng/ μ L de IFN- γ e a expressão gênica dos genes de STAT1, STAT3, STAT5, c-Jun, c-Fos e *MLKL* foram avaliadas.

Um esquema representando o *workflow* destes experimentos está representado na figura 9, abaixo.



Esquema para avaliação da participação de vias de sinalização na estimulação da expressão/atividade do promotor de *MLKL*.

Figura 9. Esquema do *workflow* dos experimentos de vias de sinalização

2.6 CRISPR *screening* – mapeamento das regiões regulatórias do promotor de *MLKL* murino

Esta parte do projeto foi desenvolvida no laboratório do Dr. Richard Sherwood, durante o período de doutorado sanduíche, na instituição de ensino *Harvard Medical School*, Departamento de Genética, em associação com o *Brigham and Women's Hospital*, ambos em Boston (EUA). A ideia inicial deste projeto era realizar esse *screening* em células humanas. Porém, mesmo após várias tentativas, a inserção de GFP em células humanas não foi satisfatória. Dessa forma, decidimos seguir com nosso modelo de *mMLKL* testando o *screening* em células MEF.

2.6.1 Inserção de GFP no gene de *MLKL* murino

2.6.1.1 Desenho do RNA guia para inserção de GFP no gene de *MLKL* murino

O protocolo para desenho e parte experimental da inserção de GFP em um gene foi publicado e descrito pelo laboratório do Dr. Sherwood.⁽¹⁵⁵⁾

O objetivo desse método era inserir o gene do GFP no gene do *mMLKL*, de forma que ambos os genes estivessem na mesma fase de leitura. Para isso, a primeira etapa foi identificar o códon de parada do transcrito de *mMLKL*, a fim de se criar uma fusão de GFP na região C-terminal de *MLKL*. Usando o navegador do genoma UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>), identificamos o códon de parada e, embora o *mMLKL* tenha transcritos diferentes, todos possuem o mesmo códon de parada.

A segunda etapa foi escolher uma sequência PAM próxima ao códon de parada. O RNA guia (gRNA) direcionado às regiões genômicas deve ter o formato **NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGG** ou **(N20)NGG** em que vermelho é o protoespaçador (gRNA) e azul é o PAM necessário no genoma e que não faz parte do protoespaçador. O NGG pode estar em qualquer uma das fitas, portanto a sequência **CCN(N20)** também é um alvo aceitável. Com o propósito de fazer uma proteína de fusão C-terminal, queríamos encontrar o NGG em qualquer fita do DNA alvo que estivesse mais próxima do códon de parada, pois a recombinação homóloga funciona melhor quando os braços de homologia estão o mais próximo possível da quebra da fita dupla. A única limitação era que precisávamos ter certeza de que o protoespaçador não continuaria a cortar após a recombinação homóloga. Na prática, significa que as sequências NGG antes ou contendo o códon de parada não devem ser usadas, mas as sequências NGG após o códon de parada e as sequências CCN imediatamente antes, incluindo ou após o códon de parada podem ser usadas.

Com isso em mente, encontramos o códon de parada *mMLKL*, bem como a sequência PAM mais próxima a ele, como podemos ver abaixo.

mMLKL

```
5'acacgtgtgccaggggttataggcacgtaccatcatgcctcatttgagattgggtttcaaagattgacaaggttagagtcct
gtgtgaggatgggttagggagcaggcagacccggcaaacaccgttcctgtgcctcatctactgcaggcgtcttcgtgttccc
agcttggtgtgtcggaacccgctcttgtctcacctctttcgttcattcataggaatcttgagagactgtctgcggtgaag
```


2.6.1.2 Clonagem do gRNA no vetor p2T-U6-sg2XBbsI-FE-HygR

A amplificação do gRNA foi realizada usando 25µL de 2x Q5 Ultrall Mastermix (M0544L NEB), 1,25µL de cada *primer* Fw e Rv (Primers sgRNA_60bp), 1µL de gRNA (20uM) e a reação completada com água para 50µL. A reação foi executada em um termociclador seguindo as seguintes etapas: 1x 98°C por 30 segundos, 30 x 98°C por 15 segundos, 62°C por 30 segundos, 72°C por 1min e com uma extensão final de 72°C por 5min. Após a reação, o produto oriundo da reação de PCR correspondendo a 137pb foi extraído e purificado de um gel de agarose 2% utilizando o kit de purificação QIAquick gel extraction (Qiagen) conforme normas do fabricante. Após a extração, a amostra foi quantificada por nanodrop (Thermo Fisher).

Primers utilizados:

010415_sgRNA_60bp_fw:

TAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACA
CCG

010415_sgRNA_60bp_rv:

GTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATGCTGTTTCCAGCATAGCTCTTA
AAC

O vetor utilizado para esta clonagem foi o p2T-U6-sg2XBbsI-FE HygR (criado pelo próprio laboratório do Dr. Sherwood). Em uma reação digerimos 6µg de vetor com 2,5µL da enzima de restrição BbsI (NEB), 5µL de tampão 2.1 e a reação foi completada para 60µL com água e incubada a 37°C por 16h. Após esse período a reação foi extraída e purificada de um gel de agarose 1% utilizando o kit de purificação QIAquick gel extraction (Qiagen) conforme normas do fabricante. Após a extração, a amostra foi quantificada por nanodrop (Thermo Fisher).

Para unir o fragmento de gRNA ao vetor, ao invés da clássica reação de ligação, utilizamos uma reação chamada de Nebuilder, que consistiu em uma reação de 330ng do vetor linear e purificado, 50ng do inserto de PCR purificado, 10µL de 2xNEBuilder *master mix* (NEB cat# E2621L) e completado com água para 20µL totais. Juntamente com esta reação, também incluímos uma reação para controle negativo, que continha todos os itens listados acima, exceto o inserto de PCR, dessa

forma também seria possível avaliar a qualidade do vetor digerido e qual a porcentagem do próprio vetor estava se auto-ligando, um controle que chamamos de “*background control*”. A reação foi incubada a 50°C por 1h em um termociclador.

Desta reação, 2,5µL foram transformados em 25µL de células NEB10beta quimicamente competentes (NEB). O protocolo de transformação brevemente seguiu os seguintes passos: incubação da mistura em gelo por 30min, choque térmico de 25-30 segundos a 42°C, incubação em gelo por 2-5min, agitador por 30min a 37°C e, em seguida, a reação foi semeada em placas com LB + ampicilina e incubadas a 37°C por 16h. Na manhã seguinte, 8 colônias foram coletadas e enviadas para sequenciamento de sanger para confirmar a clonagem com o *primer* pX330_seqfw. Quando correto, o construto foi amplificado em grande escala (maxiprep).

Primer pX330_seqfw: GAGGGCCTATTTCCCATGAT

2.6.1.3 Desenho de *primers* para inserção de GFP no gene de MLKL

O laboratório do Dr. Sherwood previamente descobriu que a inserção de GFP com braços de homologia de 75-80pb é suficiente para induzir *knock-in* com eficiência apreciável. Por conta do custo e da eficiência da reação de PCR, adicionamos esses braços de homologia usando duas rodadas de PCR, cada um dos quais adiciona 35-40pb de homologia ao GFP. Cada *primer* tem 60bp, que é o máximo permitido antes de um aumento de preço significativo.

Os braços de homologia foram projetados para codificar o gene de GFP na mesma fase de leitura que o gene de *mMLKL*, sendo que o gene de GFP terminaria imediatamente *downstream* ao *stop* códon de *mMLKL*. Além disso, os braços de homologia foram projetados de modo a não se sobreporem à sequência do gRNA em mais de 5pb de cada lado.

Para o braço dianteiro, o braço de homologia deve sempre incluir todo o último códon antes do códon de parada para permitir a fusão C-terminal na fase de leitura correta (*in frame*) do GFP. Para o braço reverso, a regra de não se sobrepor à sequência de gRNA em mais de 5bp significa que uma parte da UTR 3' será removida. Não descobrimos que este seja um problema para a expressão gênica, mas

limitamos a extensão dessa remoção projetando gRNAs o mais próximo possível do códon de parada (ver seção anterior) e projetando os braços de homologia com o máximo permitido de 5bp de sobreposição com o gRNA. A fase de leitura aberta de GFP sem ATG para a fusão C-terminal amplificado é mostrado abaixo. O primeiro par de braços para homologia tinha o seguinte formato (Figura 10):

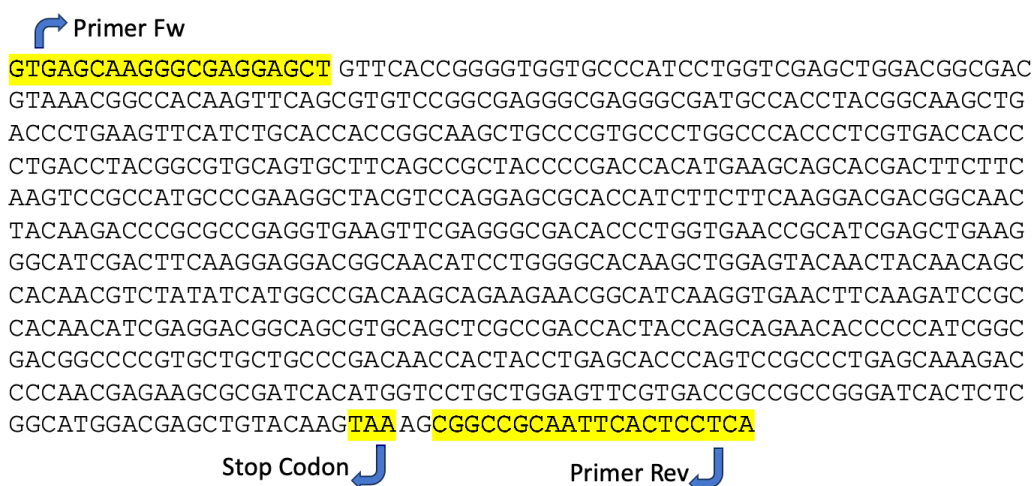


Figura 10. Sequência do primeiro par de braços homólogos utilizados para fazer a inserção de gfp no gene de mMLKL

Primers utilizados:

mMLKL_GFPHomologyarm_fw [MLKL pre-stop40bp] GTGAGCAAGGGCGAGGAGCT
mMLKL_GFPHomologyarm_rv [complemento reverso pós-parada de MLKL 40bp]
 TGAGGAGTGAATTGCGGCCG

O segundo par de braços homólogos se sobrepôs aos primeiros braços de homologia em 20-30bp e os estendeu em 30-40bp em cada extremidade - cada *primer* foi projetado para ter exatamente 60bp. Para determinar a quantidade de sobreposição a ser projetada com o primeiro par de *primer*, escolhemos a sobreposição mínima de modo que a região de sobreposição fosse estimada como tendo uma temperatura de anelamento maior que 65 graus usando a calculadora NEB Tm ([http://tmcalculator.neb.com/# ! /](http://tmcalculator.neb.com/#!/)) - usando as configurações padrão Q5. Seguindo essas instruções, obtivemos os seguintes *primers*:

acacgtgtgccagggttataggcacgtaccatcatgcctcatttgagatttgggtttcaaagattgacaagtttagagtcctgt
 gtgaggatggttagggagcaggcagacccggcaaacaccgttcctgtgcctcatctactgcaggcgtcttcgtgtccca

gcttggctgtgtcggaacccgctctgtctcacctcttttcgttcattcataggaatcttggagagactgtctgcggttgaaga
 atccacggacaagaagggtgtaaggagacaaagtggaacattgtccttcatactgttagcagcatcaactattgtctgggag
 caaatagctcttctcccttgcttgctgtctttttcttttacttgagatgggatctcacatgtagcccctgaaaactgtgtag
 aacaggtgtgctcaaactcaaggaaatctccagttctgcctcctgaatgtgtgaattaaaggcatagaccacc

Legenda: TAA = **códon de parada**, braços de homologia, **protoespaçador**

MLKL3′_GFPHDR_fw

GGAATCTTGGAGAGACTGTCTGCGGTTGAAGAATCCACGGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT

MLKL3′_GFPHDR_rv

GATGCTGCTAACAGATATGAAGGACAAATGTCCACTTTGTTGAGGAGTGAATTGCGGCCG

MLKL3′_HDRExt_fw

GGAACCCGCTCTTGTCTCACCTTCTTTTCGTTTCATTCATAGGAATCTTGGAGAGACTGTC

MLKL3′_HDRExt_rv

AGCAAGGGAGAAAGAAGCTATTTGCTCCCAGCAATAAGTTGATGCTGCTAACAGATATGA

2.6.1.4 Amplificação dos braços homólogos de GFP

Foram realizadas duas reações de PCRs sucessivas sem purificação entre si para amplificar o cassete do braço de homologia GFP. Utilizamos a enzima NEB Q5 UltraII Mastermix (M0544L) e o plasmídeo p2Lox-GFP-V5 como nosso molde de GFP.

PCR1: seguiu o mesmo padrão de reação de PCR já descrito acima, utilizando os *primers* MLKL3′_GFPHDR_fw e MLKL3′_GFPHDR_rv (ambos 20 uM) por 15 ciclos. O tamanho do produto PCR1 era de 820pb.

PCR2: Em seguida, realizamos uma segunda PCR usando a primeira reação de PCR como molde sem purificação e utilizando os *primers* MLKL3′_HDRExt_fw e MLKL3′_HDRExt_rv por 30 ciclos. O tamanho final do produto de 900pb foi purificado em 10µL de tampão de eluição utilizando o kit Qia Quick Purification (Qiagen).

2.6.1.5 Nucleoporação

Uma vez que o construto contendo o gRNA foi gerado e os braços homólogos foram amplificados, o próximo passo foi nucleoporar esses itens para dentro das células para que a inserção pudesse ocorrer.

Para a nucleoporação das células MEF, usamos uma mistura de 1µg do plasmídeo CBh Cas9-BlastR (o qual codifica a nucleasse Cas9), 10µL da amplificação purificada dos braços homólogos de GFP-MLKL e, 1µg do vetor p2T-U6-sg2XBbsI-FE HygR contendo o gRNA. Para este procedimento, 1 milhão de células MEF foram desaderidas e ressuspensas em 100µL de OptiMEM contendo esta mistura de DNA, homogeneizadas e transferidas para uma cubeta de nucleoporação. Usamos o programa CZ167 na máquina de nucleofecção Amaxa 4D (Lonza). Após a nucleoporação, deixamos as células repousarem na cubeta por 15min em temperatura ambiente antes do plaqueamento.

Após 24h iniciamos a seleção de Blastidina na concentração de 10µg/mL por 2 dias. Após a seleção, esperamos até que as células atingissem uma confluência de 80-90% para realizar uma análise de citometria e avaliar a porcentagem de células GFP positivas.

2.6.1.6 Citometria de fluxo e *Sorting*

A porcentagem de GFP de células MEF foi analisada usando FACSymphony (BD). As células foram ressuspensas em tampão FACS (Termo Fisher) e a estratégia de *gates* foi definida para adquirir 10 mil eventos por amostra. Quando necessário, essas células foram sorteadas usando o Moflo Astrios (Beckman).

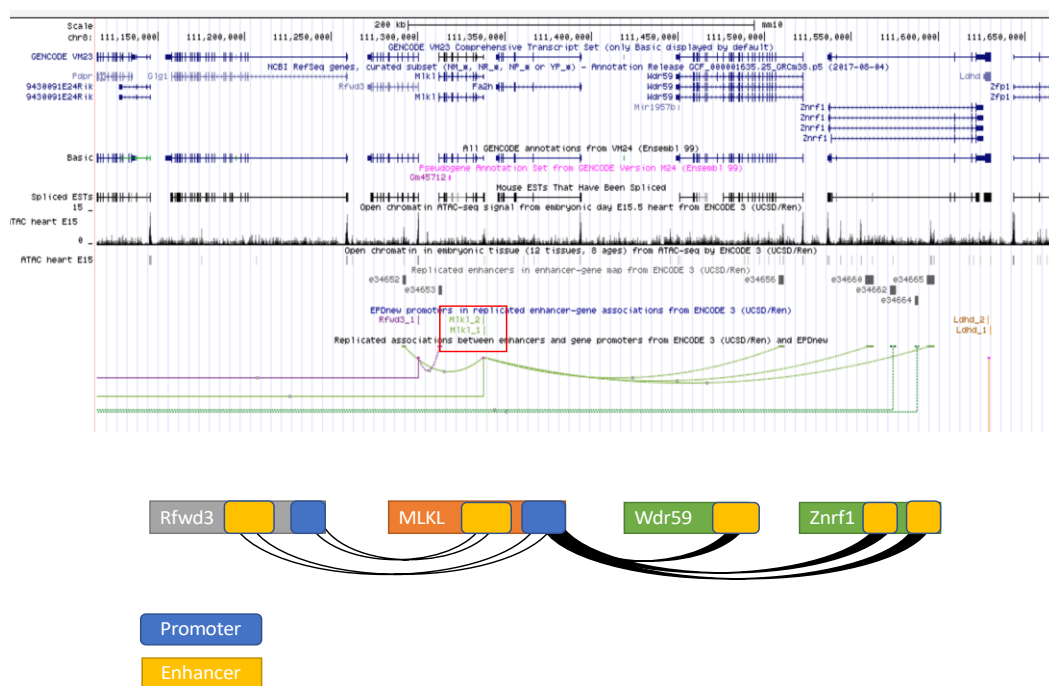
2.6.2 Biblioteca de CRISPR

2.6.2.1 Desenho da biblioteca: CRISPR-Cas9 e CRISPRi

Para iniciar o desenho da biblioteca, a primeira questão era qual região deveríamos ter como alvo em nosso *screening*. Para responder a essa pergunta,

usamos as duas versões mais recentes do genoma disponíveis no UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>). A versão *mm10* nos mostrou características do Eukaryotic Promoter Database (EPD), através das quais foi possível observar interações genômicas do promotor de *mMLKL* com genes vizinhos (Figura 11). Com base nisso, caracterizamos essas regiões como potenciais *enhancers*, sendo elas as regiões intrônicas dos genes *Rfwd3*, *Wdr59* e *Znrf1*, como podemos ver na figura 11.

Da mesma forma, outra característica importante foi observar se essas regiões coincidiam com regiões de atividade da cromatina em células de fibroblastos, a fim de ter mais certeza de que as mesmas regiões estariam presentes e ativas em nosso modelo de células MEF. A versão *mm10* não apresentou características de atividade da cromatina em fibroblastos, mas a versão *mm9* sim.



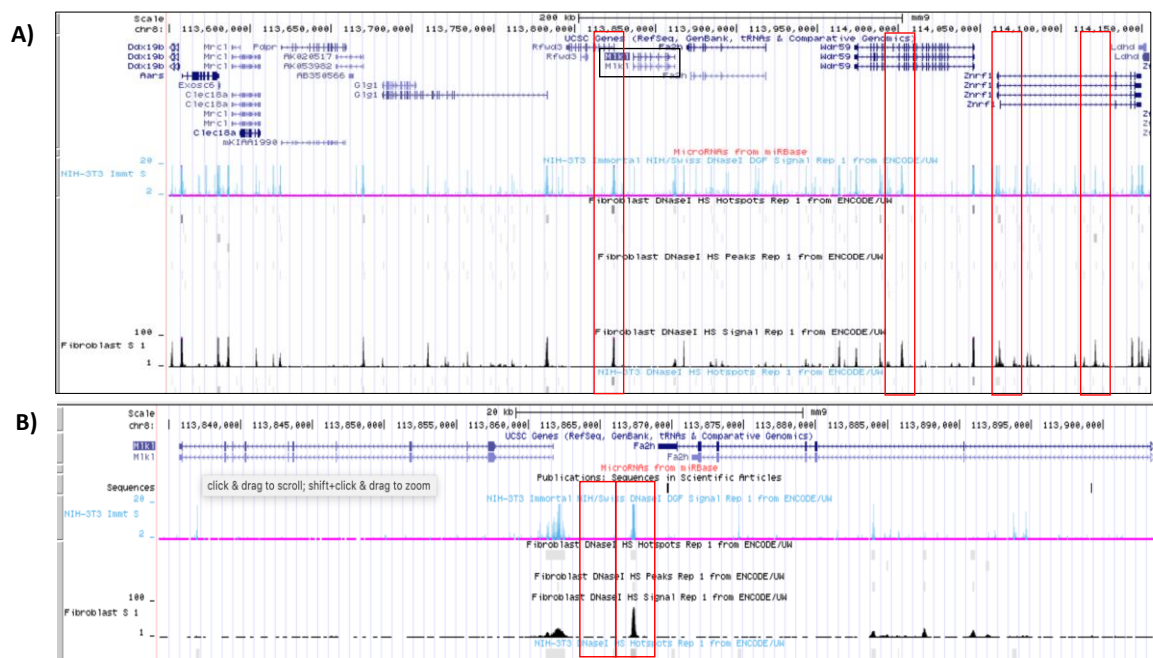
mm10

Captura de tela e uma representação da interação genômica entre os genes *Rfwd3*, *Wdr59* e *Znrf1* e *mMLKL* fornecida pelo banco de dados EPD.

Figura 11. Dados de UCSC da versão genômica *mm10*

Como podemos ver na figura 12-A, tínhamos dados de células NIH-3T3, fibroblastos imortalizados, e também de células de fibroblastos primários. Também podemos observar que os potenciais *enhancers* que observamos antes (genes *Rfwd3*, *Wdr59* e *Znrf1*) também apresentaram pico de sinal DNase I, um dos marcadores de atividade da cromatina (destacado no quadrado vermelho na Figura 12-

A), o que aumentou nossa confiança para rastrear esses genes em nossas células MEF. Com base nessa característica, também incluímos uma região sem anotação genômica próxima ao promotor *mMLKL* e antes do próximo gene (*Fa2h*) em nosso *screening* (representado pelo quadrado vermelho direito na figura 12-B) como um potencial *enhancer*. Além disso, incluímos uma região próxima ao promotor *mMLKL* sem atividade da cromatina como controle negativo (quadrado vermelho à esquerda na Figura 12-B). Como essa região está realmente próxima do promotor *mMLKL*, usamos essa região de controle negativo para testar se as possíveis características de regulação que encontramos no promotor *mMLKL* não são devido a um efeito fora do alvo em uma região próxima a ele.



A) Sinal DNase I de NIH-3T3 e células de fibroblastos primários. Potenciais *enhancers* encontrados na versão mm10 estão destacados com quadrados vermelhos B) O quadrado vermelho direito representa um *enhancer* adicional sem anotação genômica que incluímos em nosso *screening* e o quadrado vermelho esquerdo representa uma região de controle negativo que também incluímos.

Figura 12. Dados de UCSC da versão genômica mm9

Por fim, decidimos seguir com o promotor *mMLKL* previsto, uma região negativa próxima ao promotor *mMLKL* e quatro regiões de potenciais *enhancers* *Rfwd3*, *Wdr59* e *Znrf1* e uma sem anotação.

Decidimos estudar essas quatro regiões de potenciais *enhancers* com a ferramenta de CRISPR de interferência (CRISPRi) e estudar a região do

promotor de *mMLKL* com a ferramenta de CRISPR-Cas9 clássica (com atividade nuclease).

O CRISPRi é composto por um Cas9 sem atividade catalítica (dCas9) complexada com um domínio repressor denominado caixa associada a Krüppel (KRAB) mais o gRNA específico para uma região alvo. Este complexo dCas9-KRAB-gRNA se liga ao DNA complementar ao gRNA causando além de um bloqueio estérico que interrompe o alongamento do transcrito, uma repressão gênica por conta do domínio de repressão KRAB, resultando no silenciamento da transcrição.⁽¹⁴⁸⁾ Usando CRISPRi em vez do sistema de nuclease CRISPR clássico para estudar os potenciais *enhancers* nos ajudou a espaçar cada gRNA em torno de 1kb um do outro, pois CRISPRi atua dentro de uma janela de 1kb em torno da região alvo.⁽¹⁵⁰⁾ A diminuição da quantidade de gRNA tem impacto positivo nas aplicações subsequentes como por exemplo, número de células necessárias, reagentes necessários, custo com sequenciamento de nova geração, etc.

Em relação ao promotor *mMLKL*, decidimos utilizar o sistema CRISPR-Cas9 e ter como alvo toda região PAM 5' NG 3' na região promotora predita. Com este tipo de *screening*, poderíamos ter informações mais detalhadas de potenciais elementos regulatórios responsáveis pela ativação do promotor *mMLKL*.

Para criar uma biblioteca de gRNA para a abordagem CRISPRi, utilizamos o *site* de *design* Broad gRNA, usando a configuração padrão para um comprimento de gRNA de 20pb e tendo como alvo toda sequência PAM 5' NGG 3' para todos potenciais *enhancers* (<https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design>). Depois disso, espaçamos cada gRNA em torno de 1kb, conforme já explicado acima.

Para a biblioteca de CRISPR-Cas9 direcionada ao promotor *mMLKL*, usamos um *script* já estabelecido no laboratório do Dr. Sherwood tendo como alvo toda região PAM 5' NG 3', pois para esse *screening* utilizamos uma versão da enzima Cas9 que reconhece o PAM 5' NG 3'.

Portanto, após toda essa análise e desenho dos gRNAs, solicitamos a produção de uma biblioteca combinada da empresa *Twist Bioscience* contendo 2.000 gRNA: 816 gRNA direcionado ao promotor *mMLKL* (PAM 5' NG 3'), 1.051 gRNA direcionado aos potenciais *enhancers* (5' NGG 3') e 133 gRNA de controle contendo regiões não-alvo, controles positivos de GFP e a região de controle negativo. Os controles não alvo são controles que não tem como alvo nenhum gene murino, os

controles GFP são controles que tem como alvo a região de GFP, ou seja, funcionam como controles positivos, e os controles negativos são os controles que selecionamos com base na proximidade ao promotor, mas sem atividade de cromatina, como já descrito acima.

Todos gRNA continham uma sequência flanqueadora antes e depois de cada sequência do protoespaçador para posterior clonagem. A fim de separar todo o *pool* de gRNA direcionado ao promotor *mMLKL* do *pool* de gRNA direcionado aos *enhancers*, também anexamos no início de cada um desses dois grupos uma sequência flanqueadora específica para posterior amplificação e identificação. Desta forma, todo o gRNA direcionado ao promotor *mMLKL* seria amplificado por um *primer A* de sub-biblioteca, e todo o gRNA direcionado aos potenciais *enhancers* seria amplificado por um *primer B* de sub-biblioteca. Todos os controles foram divididos entre ambas as sub-bibliotecas. Mais detalhes sobre a etapa de clonagem são descritos abaixo.

A lista com a sequência completa de todos os gRNA utilizados neste projeto pode ser encontrada na pasta de armazenamento em nuvem OneDrive: https://1drv.ms/u/s!AkN_ZLT7xDvegldmcpw-AzNwyge-?e=WxMuOm

2.6.2.2 Clonagem das bibliotecas

A biblioteca foi ressuspensa em tampão TE a uma concentração de 10ng/μL. Conforme descrito anteriormente, nossa estratégia para clonar a biblioteca de gRNA combinada foi usar dois *primers* de sub-biblioteca a fim de pré-amplificar uma sub-biblioteca contendo os gRNA que teria como alvo PAM 5' NG 3' (CRISPR-Cas9) e um segundo que teria como alvo 5' NGG 3' (CRISPRi). Os controles foram divididos igualmente entre eles.

Para cada sub-biblioteca, usamos uma estrutura lentiviral diferente para clonagem: para a sub-biblioteca do promotor *mMLKL* (aqui também referida como Sub-biblioteca A), clonamos a biblioteca em um vetor CRISPR-V2-FE-SpG-PuroR (criado por nosso laboratório). Para a sub-biblioteca direcionada aos *enhancers* (aqui também referidos como Sub-biblioteca B), usamos o vetor pLenti-gRNA-FE-PPT PuroR (Addgene #52961 e modificado pelo nosso laboratório). Essa variação de vetores lentiviral é devido a presença ou ausência de Cas9 no vetor, porque lembrando, para o

sistema de CRISPRi não há atividade catalítica da enzima Cas9, por isso utilizamos o vetor pLenti-gRNA-FE-PPT, o qual não expressa a enzima.

Seguindo o mesmo protocolo de digestão descrito nas seções anteriores, digerimos 10µg de cada vetor com a enzima Bsmbl (NEB) a 37°C por 16h e extraímos e purificamos de um gel de agarose 1% o produto de 8,1kb.

Para a amplificação da biblioteca, primeiro realizamos um qPCR usando 1,25µL de biblioteca para determinar quantos ciclos de PCR deveríamos setar para uma amplificação completa da biblioteca. O protocolo para a reação de qPCR usou 7,5µL de *master mix* Q5, 0,375µL de *primer* para *forward* e reverso, 0,75µL de Evagreen, e a reação foi completada com água até 15µL.

A combinação de *primer* usada para esta reação foi o 122019_SubLibA_fw ou o 122019_SubLibB_fw combinado com 010415_sgRNA_60bp_rv.

Primers:

122019_SubLibA_fw: TTGGATGCAGGTCGAAAGGC

122019_SubLibB_fw: GCACGGACAAAGTACTAGCC

010415_sgRNA_60bp_rv: GTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATGCTG
TTTCCAGCATAGCTCTTAAAC

Após determinar a contagem do ciclo de qPCR, realizamos um PCR convencional (conforme descrito anteriormente) com 0,25µL de biblioteca com os mesmos *primers* acima, em uma reação total de 200µL com extensão de 1min e temperatura de anelamento (TA) de 65°C. Após a reação, o produto da PCR foi purificado em 50µL de tampão de eluição usando o kit de purificação de PCR (Qiagen). Esta primeira etapa de amplificação foi realizada apenas para pré-amplificar e separar as sub-bibliotecas em diferentes reações.

Depois disso, realizamos uma segunda qPCR usando 0,25µL de PCR1, $t_a = 72^\circ\text{C}$ com os seguintes *primers*: 010415_sgRNA_60bp_fw e 010415_sgRNA_60bp_rv.

Após a contagem de ciclos determinada por esta segunda qPCR, realizamos um segunda PCR convencional contendo 22,5µL de produto oriundo da PCR1 com a mesma combinação de *primer* acima (sgRNA_60bp fw e rv) em uma

reação total de 200µL com extensão de 1min e $t_a = 72^\circ\text{C}$. O produto de 160pb foi extraído e purificado de um gel de agarose 2% (kit purificação Qiagen).

O produto final continha as seguintes sequências:

TTGGATGCAGGTCGAAAGGCTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATAT
CTTGTGGAAAGGACGAAACACCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTAAGAGCT
ATGCTGGAAACAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTTAG

Legenda: *Primer Sub-Biblioteca (A ou B)*, *010415_sgRNA_60bp_fw*, sequência de *gRNA* (20-21pb), *010415_sgRNA_60bp_rv*

Para clonar o plasmídeo digerido com cada sub-biblioteca, realizamos uma reação de NEBuilder contendo 1µg de vetor, 90ng de produto de PCR, 50µL de 2x NEBuilder *master mix* (NEB cat#E2621L) e preenchido até 100µL com água. A reação foi incubada durante 1h a 50°C .

Após a reação do NEBuilder, realizamos uma purificação desta reação da seguinte maneira: agitamos a reação em vórtex e incubamos à temperatura ambiente por 15min, centrifugamos a 15.000g por 15min, removemos cuidadosamente o líquido sem perturbar o *pellet* e lavamos o *pellet* com 300µL de etanol 80% com uma centrifugação final a 15.000g por 5min. Após esta etapa, a maior parte do líquido foi removida com o auxílio de uma P1000 e a reação centrifugada a 15.000g por 1min. Todo o líquido restante foi removido com uma p200, e o *pellet* foi seco a temperatura ambiente por 3-5min, mantendo a tampa aberta. O *pellet* foi ressuspendido em 8,25µL de tampão de eluição (TE).

Após esse processo de purificação, 0,25µL de reação e 0,25µL de plasmídeo digerido como controle foram transformados em 25µL de células quimicamente competentes estáveis (H3040 NEB), e o protocolo de transformação foi realizado conforme descrito anteriormente.

Para uma boa variabilidade, esperamos o mínimo de 100 colônias para cada *gRNA*, então para a sub-biblioteca A (promotor *mMLKL*) que tem 879 membros (com controles), a diversidade mínima desejada exigiu 87.900 colônias e para a sub-biblioteca B (*enhancers*) que tem 1.121 membros (com controles), a diversidade mínima desejada exigia 112.100 colônias.

Após a transformação, realizamos um PCR de colônia em 16 colônias de cada sub-biblioteca usando a mistura principal da Polimerase Onetaq em uma reação total de 25µL, TA = 55°C, por 35 ciclos com os seguintes *primers*: pX330_seqfw e 111219_postPT_rv.

Primers:

pX330_seqfw: GAGGGCCTATTTCCCATGAT

111219_postPT_rv: CTAGGCACCGGATCAATTGC

A próxima etapa foi purificar todas as amostras que mostraram uma banda de 550pb (tamanho da banda indicando presença do gRNA) em um gel de agarose a 2% e enviá-las para sequenciamento de Sanger para garantir que havia uma boa diversidade entre os membros da biblioteca.

Após esta confirmação, os 8µL restantes da reação NEBuilder foram transformados usando células eletrocompetentes Endura (Lucigen). Para esta transformação, 100µL de células eletrocompetentes foram transferidas para uma cubeta de 1,0mm e, em seguida, 2µL do produto NEBuilder foram adicionados a cada cubeta. A eletroporação seguiu os parâmetros: 10uF, 600Ohms e 1800 Volts no equipamento Gene Pulser Xcell (BioRad). Imediatamente após a eletroporação, as células foram recuperadas em meio de recuperação de 975µL fornecido pelo mesmo kit, transferidas para um tubo *snap-cap* e incubadas a 30°C por 1h. A partir daí, 10µL foram plaqueados em placas LB+Amp em uma diluição de 40.000 vezes da transformação original para estimar a eficiência da transformação e garantir que a representação completa da biblioteca fosse preservada. O restante foi inoculado em 400mL LB+Amp, incubado sob rotação constante a 30°C por 18h e purificado em larga escala (maxiprep).

Essas preparações foram rotuladas CRISPR-V2-FE-SpG-MLKL-Lib-SubLib_A_PuroR (sub-biblioteca A) e pLenti-gRNA-FE-PPT-MLK-Lib-SubLib_B_PuroR (sub-biblioteca B).

2.6.2.3 Células MEF MLKL-GFP expressando Cas9

A partir da nossa célula MEF MLKL GFP+ criada anteriormente, criamos dois tipos diferentes de células: uma linhagem expressando a versão da nuclease Cas9 que reconhece a sequência PAM 5' NG 3' cuja expressão estava ligada a expressão de mCherry: Cas9-NG-mCherry. E uma segunda linhagem de MEF MLKL GFP+ expressando a versão da dCas9 (sem atividade catalítica) que reconhece a sequência PAM 5' NGG 3', acoplada com o supressor de transcrição KRAB, também conjugado com mCherry: dCas9-KRAB-mCherry.

Para gerar cada uma destas linhagens, 1 milhão de células MEF MLKL GFP+ foram nucleoporadas com 1µg do vetor transposase Tol2 e 1µg do vetor p2T_CAG_SpCas9NG_P2A_mCherry_BlastR ou p2T_CAG dCas9-KRAB-P2A-mCherry BlastR (ambos plasmídeos gerados pelo laboratório do Dr. Sherwood). Após a nucleoporação, estas células foram selecionadas com 10µg/mL de Blasticidina e as células duplo positivas para GFP e mCherry foram sorteadas (Moflo Astrios-Beckman). Este processo de *sorting* foi repetido até que a pureza da população GFP/mCherry+ alcançasse 100% de positividade.

2.6.2.4 Produção de lentivírus

Utilizamos um total de 3 placas de 10cm para cada sub-biblioteca. Para isso, transfectamos 6×10^6 células Hek293T/placa da seguinte forma: Tubo A continha 1,5mL de OptiMEM, 3,6µg de pMDLg/pRRE (cat# 12251 Addgene), 2,4µg de pRSV-Rev (Cat# 12253 Addgene), 1,2µg de pCMV-VSV-G (cat# 8454 Addgene) e 4,8µg de cada sub-biblioteca. O tubo B continha a mesma quantidade de optiMEM com 36µL de reagente de transfecção TransIT (Mirus). O tubo A foi adicionado ao tubo B, essa mistura foi incubada por 15min em temperatura ambiente e entregue às células em forma de gota a gota (*drop-wise*). O meio das células foi substituído após 8h por meio DMEM completo. Após 24h da transfecção, o sobrenadante foi coletado e o meio substituído. A mesma etapa foi repetida após 48h e 72h pós-transfecção. Após a coleta de todo o sobrenadante (72h) contendo lentivírus, a amostra foi centrifugada por 5min a 300g a 4°C, filtrada através de um filtro 0,45µm e concentrada com o reagente Lenti-X

concentrador (Takara). Após a concentração, o *pellet* foi suavemente ressuspensão em 4mL e armazenado em alíquotas de 1mL a -80°C.

Após 24h do congelamento, o lentivírus foi titulado através da seleção de células MEF com uma curva de puomicina para se obter um MOI de 0,5-1 (~ 30 - 50% de eficiência de infecção) de modo que apenas um gRNA estivesse presente em cada célula (dados não mostrados).

Com base no valor encontrado no experimento de titulação (dados não mostrados), a quantidade de lentivírus necessária para o experimento com as bibliotecas foi calculada escalando-o para quantidade necessária de acordo com a quantidade de células.

2.6.2.5 Infecção das células MEF com a biblioteca de CRISPR-Cas9 ou CRISPRi e *sorting* das células GFP negativas

Para infectar as células MEF alvo com as bibliotecas geradas, seria necessária uma representação de mais de 500 células por sgRNA, o que significava que um total de 500.000 (5×10^5) células infectadas eram necessárias (uma vez que cada sub-biblioteca tem próximo de 1000 gRNAs).

As linhagens MEF-MLKL-GFP-Cas9-NG-mCherry e MEF-MLKL-GFP-dCas9-KRAB-mCherry foram semeadas em triplicatas de 10cm em uma confluência de $1,15 \times 10^6$ /placa com 8µg/mL de polibrene e infectadas com o lentivírus produzido. As células foram então selecionadas por puomicina (1,5µg/mL) até que estivessem em torno de 70% confluentes. Em seguida, $\frac{1}{4}$ da placa foi congelada e $\frac{3}{4}$ foram divididos em duas novas placas de 10cm e denominadas como Rep 1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B.

Destas 6 placas, metade (3 placas de 10cm) foram tratadas com 100ng/µL de IFN-γ por 36h. Após 36h, coletamos o gDNA de 1/5 de cada placa (população total) e o restante foi separado para sortear a população negativa para GFP. As células sorteadas cresceram novamente por 3-4 dias em cultura e, em seguida, foram re-sortedas a fim de se obter uma população GFP negativa ainda mais pura. Após o segundo *sorting*, o gDNA das amostras foi coletado e prosseguiu-se para a preparação do sequenciamento.

O protocolo de preparação da biblioteca para sequenciamento pode ser encontrado no apêndice 2. Após a preparação da biblioteca, as amostras foram agrupadas e quantificadas pelo kit de quantificação de bibliotecas (Kapa) seguindo as instruções do fabricante e o sequenciamento de nova geração utilizando a plataforma Illumina (NGS) foi realizado no *Broad Institute* (Boston, EUA).

O *workflow* de todos esses experimentos está ilustrado na figura 13, abaixo:

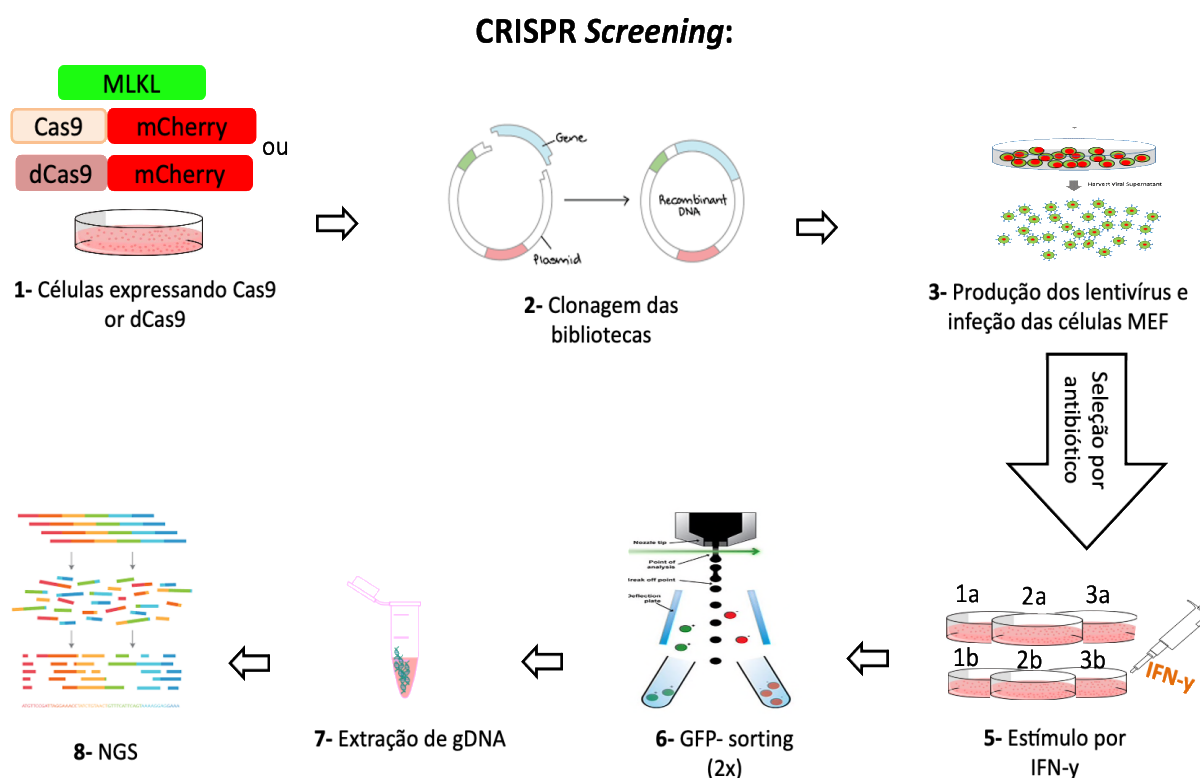


Figura 13. Workflow experimental dos screening com CRISPR-Cas9 e CRISPRi

2.6.2.6 Análise de dados

Os dados foram analisados por uma análise baseada no modelo do método CRISPR-Cas9 *Knockout* (Mageck) (*Model-based Analysis of Genome-wide CRISPR-Cas9 Knockout*), mais detalhes sobre o método podem ser encontrados em Li et al.⁽¹⁵⁶⁾ Mageck prioriza gRNAs, genes e vias de sinalização em CRISPR-Cas9 *screenings* de larga escala, identificando genes selecionados positivamente e negativamente em diferentes condições experimentais. Para a nossa análise, usamos os resultados de *log fold change* (LFC) e valor-p estático $<0,005$ para classificar todos

os gRNA enriquecidos positivamente na população GFP negativa quando comparada com a população inicial. As amostras foram separadas em amostras basais e amostras tratadas com IFN- γ para uma melhor visualização se havia diferença entre os grupos. Todas as tabelas de resultados de *output* do *mageck* podem ser visualizadas em OneDrive (https://1drv.ms/u/s!AkN_ZLT7xDvegldmcpw-AzNwyge-?e=WxMuOm).

Os códigos usados para analisar e gerar os resultados estão listados abaixo:

```
mageck test -k /users/Larissa/desktop/mageck/subA/MLKL_SubA_gRNA_count.txt -t
sorted_1a,sorted_2a,sorted_3a -c bulk_1a,bulk_2a,bulk_3a -n
/users/Larissa/desktop/mageck/subA/MLKL_subA_sample_A --paired --pdf-report --sort-
criteria pos --remove-zero both --control-sgrna
/users/Larissa/desktop/mageck/subA/control_gRNA.txt
```

```
mageck test -k /users/Larissa/desktop/mageck/subA/MLKL_SubA_gRNA_count.txt -t
sorted_1b,sorted_2b,sorted_3b -c bulk_1b,bulk_2b,bulk_3b -n
/users/Larissa/desktop/mageck/subA/MLKL_subA_sample_B --paired --pdf-report --sort-
criteria pos --remove-zero both --control-sgrna
/users/Larissa/desktop/mageck/subA/control_gRNA.txt
```

```
mageck test -k /users/Larissa/desktop/mageck/subB/CRISPRi_sgRNA_count.txt -t
CRISPRi_sort2a,CRISPRi_sort3a -c CRISPRi_bulk2a,CRISPRi_bulk3a -n
/users/Larissa/desktop/mageck/subB/MLKL_subB_sample_A --paired --pdf-report --sort-
criteria pos --remove-zero both --control-sgrna
/users/Larissa/desktop/mageck/subB/control_gRNA.txt
```

```
mageck test -k /users/Larissa/desktop/mageck/subB/CRISPRi_sgRNA_count.txt -t
CRISPRi_sort1b,CRISPRi_sort2b,CRISPRi_sort3b -c
CRISPRi_bulk1b,CRISPRi_bulk2b,CRISPRi_bulk3b -n
/users/Larissa/desktop/mageck/subB/MLKL_subB_sample_B --paired --pdf-report --sort-
criteria pos --remove-zero both --control-sgrna
/users/Larissa/desktop/mageck/subB/control_gRNA.txt
```

SUB_A se refere à sub-biblioteca do promotor MLKL e CRISPRi / SUB_B à sub-biblioteca dos *enhancers*. As amostras 1a, 2a e 3a se referem a amostras sem tratamento com IFN- γ , e as amostras 1b, 2b e 3b se referem a amostras tratadas com 100ng/mL de IFN- γ . O mapeamento de gRNA foi feito usando o

navegador do genoma UCSC e a correlação de Spearman foi analisada usando o GraphPad Prism 7.

2.6.3 Validação dos gRNAs

Para a validação dos gRNA individuais, seguimos o mesmo protocolo de clonagem já descrito, com a diferença de que clonamos todos os gRNAs em reações separadas, não em combinação, ou seja, em um *pool*. A produção de lentivírus também seguiu o mesmo protocolo descrito acima, porém em escala reduzida para uma placa de 6 poços sem etapa de concentração. Ao invés de concentração, usamos lentivírus sem nenhuma etapa de congelamento (fresco) para infectar as células-alvo em uma placa de 24 poços. Após a infecção, as células-alvo também foram selecionadas com puromicina até a seleção completa e citometria de fluxo foi utilizada para análise da porcentagem da população GFP negativa.

A fim de criar uma estratégia de validação dos principais gRNAs, decidimos selecionar alguns dos gRNA com resultados mais promissores baseado nos valores de LFC positivo classificados pelo Mageck, combinados com o valor significativo de $p < 0,005$. Decidimos escolher gRNAs para expressão basal e também para expressão de MLKL induzida por IFN- γ . Além disso, incluímos controles GFP positivos, controles não-alvo e controles negativos. Estes gRNAs estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Sequência dos gRNA escolhidos para validação individual

CRISPR-Cas9-promotor de <i>mMLKL</i>	
Expressão basal:	
805	GGA
486	GGA
245	ATC
510	GTCT
199	GGAG
341	TGGG
Expressão induzida por IFN:	
496	GAGGA
173	GGAG
155	AGTAA

continua...

...continuação

48 AAACGCATGCATACCACCC

Controles:

Sem alvo- GCCTGTACGCTAAATCGCG

Sem alvo- GTCGTCCCGTATCGTTACG

GFP pos control-GAAGGGCATCGACTTCAAGG

GFP pos control- GACGAGGGTGGGCCAGGGCAC

Controle negativo (gRNA 236) GGGCAAAAAAGGTCAGCAG

Controle negativo (gRNA 234) GAAAAGGTCAGCAGAGATCTC

CRISPRi- potenciais *enhancer*

Expressão basal:

ZNRF1_2_36 GAGGATCTGAGGGGTAGGGTC

WDR59_131 GGTCCCAGGGAAGGACCTGA

WDR59_134 GTAAGAAGGCAGGAATTGCC

ZNRF1_2_59 GCATTGAACAGTTCAAAGT

Expressão induzida por IFN:

ZNRF1_1_93 GCAGTGAATTTGTGGCTAGCC

ZNRF1_1_236 GTTTTTTTTTTTTTTTGCTTTT

RFWD3_3 GTCAATGTTACATGAGGCTTC

Controles:

Sem alvo- GCCTGTACGCTAAATCGCG

Sem alvo- GTCGTCCCGTATCGTTACG

GFP pos control-GAAGGGCATCGACTTCAAGG

GFP pos control- GACGAGGGTGGGCCAGGGCAC

Controle negativo: ZNRF1_1_1 GTACAGAACTTTCTACAGTTA

Controle Neg: no_annotation_1 GGCCCCATCTGTTTGGTTTC

2.7 CRISPR-Cas9: biblioteca de fator de transcrição

Outra abordagem que foi realizada foi um *screening* com a biblioteca de TFs. Já tínhamos a biblioteca em nosso laboratório, que compreende 12.000 gRNA tendo como alvo todos os TFs do genoma murino, com quatro gRNA por cada gene de fator de transcrição.

Seguimos o mesmo protocolo de clonagem acima, com a diferença de que clonamos a biblioteca no vetor lentiviral CRISPR-V2-FE, um vetor que expressa a enzima Cas9 que reconhece o PAM 5'NGG 3'. A produção de lentivírus seguiu o mesmo protocolo já descrito, porém escalando para placas de 15cm. A infecção das células MEF-MLKL-GFP-Cas9-NG-mCherry foi feita em duplicatas biológicas e cada

placa foi dividida em duas replicatas técnicas, totalizando quatro replicatas de 15cm ao final. Neste protocolo, não tratamos nenhuma replicata com IFN- γ .

Após a seleção, a biblioteca foi sorteada duas vezes para população GFP negativa da mesma forma que as bibliotecas anteriores e procedeu-se à preparação da biblioteca e NGS.

2.8 Análises estatísticas

Quando necessárias, as análises foram feitas pelo programa GraphPad Prism V7. O teste utilizado em cada experimento está destacado em sua respectiva legenda.

2.9 Aspectos éticos e apoio financeiro

Este projeto não envolveu procedimentos e não contém materiais biológicos que precisavam de aprovação em Comitês de Ética em Pesquisa. Sendo assim, este projeto foi dispensado de análise pelos referidos órgãos.

Apoio financeiro da Pro-UNIEMP (número processo SGPP: 2620-16) na fase inicial, FAPESP pelo apoio financeiro para realização deste estudo (processo: 2017/25009-1) e pela bolsa estágio de pesquisa no exterior – BEPE (processo: 2019/13813-6).

3 RESULTADOS

3.1 Responsividade das células alvo aos estímulos interferon gama e beta: indutores da expressão de *MLKL*

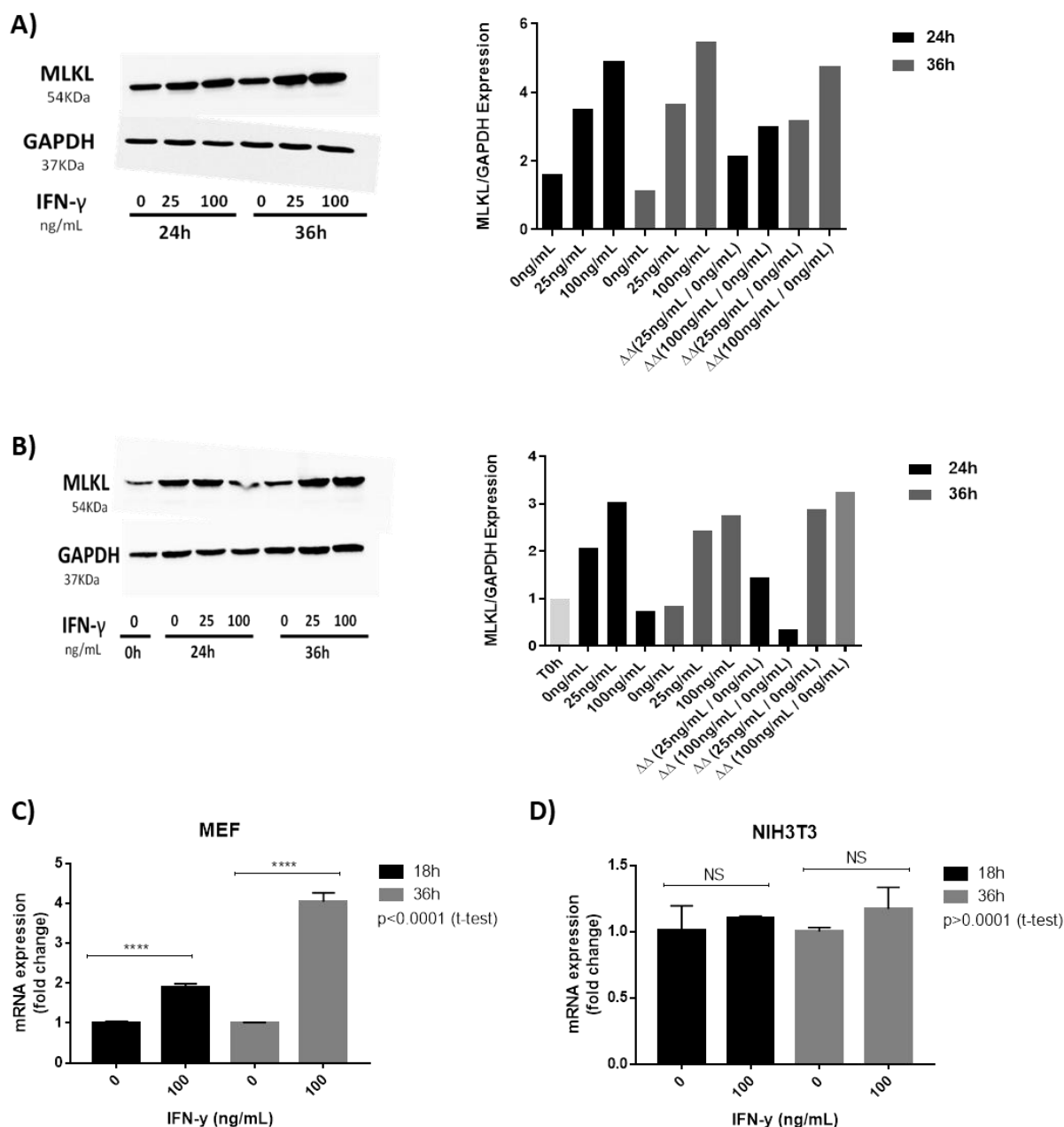
O primeiro passo para certificar que as células escolhidas possuíam intrinsecamente o maquinário de transcrição necessário (como TFs e vias de sinalização) para a modulação de *RIPK3* e *MLKL* foi analisar se os mesmos induziam a modulação endógena destes genes.

Testamos, como modelo de célula humana, a linhagem HT-29, por já haver evidências tanto em literatura como conhecimento prévio do nosso grupo que esta linhagem celular é responsiva à modulação de *MLKL*. Porém, devido a sua baixa eficiência de transfecção, mesmo após vários métodos testados, não conseguimos uma amplitude de modulação suficiente para utilizá-la como modelo (dados não mostrados). Por outro lado, tivemos resultados bastante satisfatórios com células murinas, principalmente em relação à modulação endógena de *MLKL*. Sendo assim, preferimos compilar os resultados obtidos em relação à modulação e os ensaios de luciferase em células humanas (tanto pra *RIPK3* e *MLKL*) e em células murinas para *RIPK3* nos apêndices 3 e 4. Os resultados encontrados em relação ao *mMLKL* estão presentes no corpo deste documento, nas próximas seções.

3.1.1 Responsividade do gene *MLKL* murino ao interferon gama

Células MEFs e NIH3T3 foram estimuladas com 25ng/mL e 100ng/mL de IFN- γ (*Preprotech*) por 24h e 36h e a expressão proteica e gênica de *MLKL* foram analisadas após este período (Figura 14). Em relação à MEF, é possível observar um aumento significativo da expressão proteica em 24h e 36h em ambas as doses (Figura 14-A). Por exemplo, após 36h de estímulo com 100ng/mL foi possível observar um aumento aproximado de cinco vezes na expressão de *MLKL*. Da mesma forma, o estímulo com IFN- γ é capaz de modular positivamente a expressão gênica de *mMLKL* (Figura 14-C), sendo que em 36h a variação chega a 400% em relação ao ponto 0h.

Além das células MEF, as células NIH3T3 também mostraram uma modulação positiva mediante o estímulo por IFN- γ (Figura 14-B). É possível observar um aumento de aproximadamente três vezes na expressão proteica em ambas as doses de 25ng/mL e 100ng/mL no intervalo de 36h após estímulo. Porém, de forma interessante, a expressão de mRNA de *MLKL* não parece ser modulada nestas células.

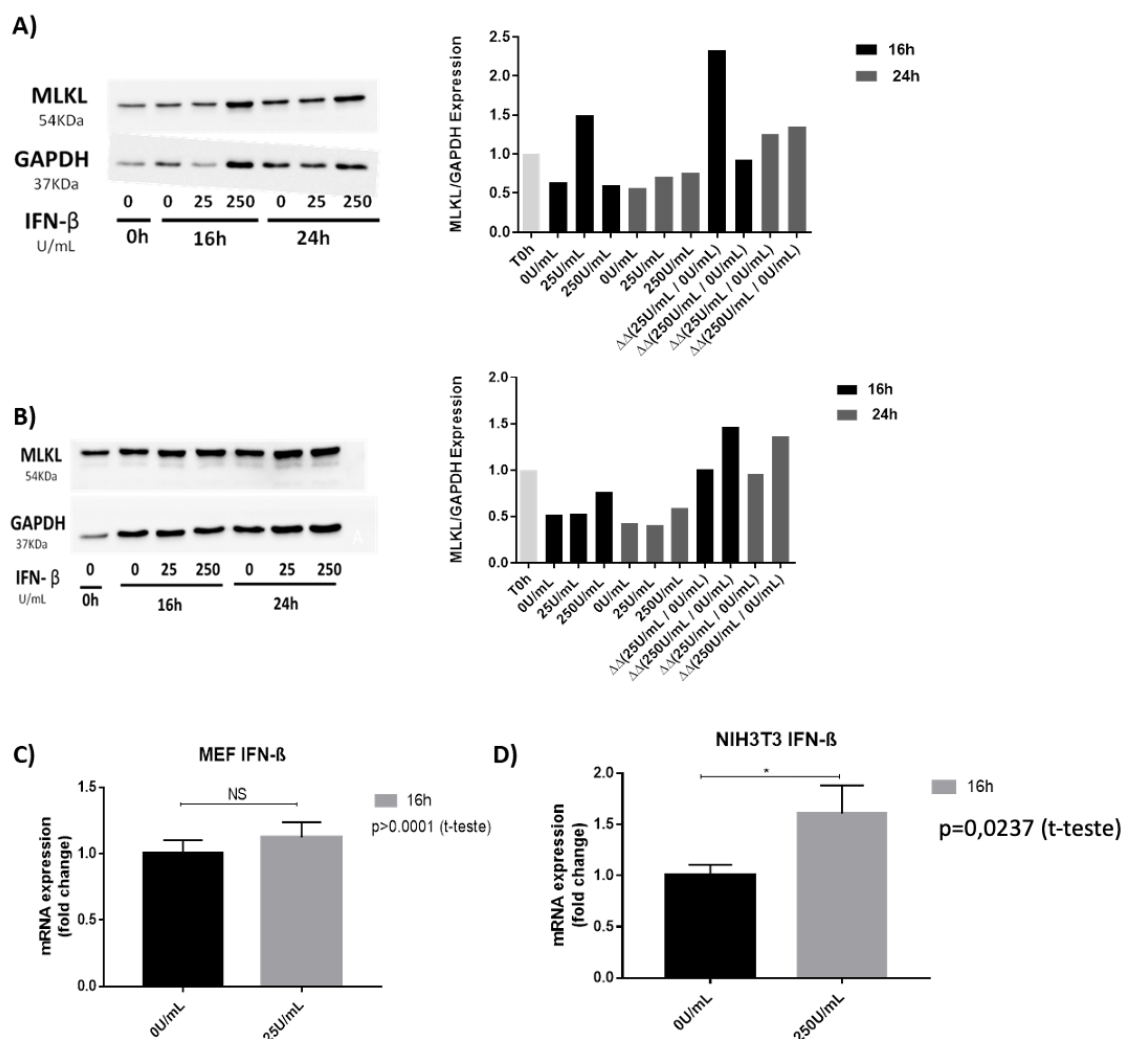


Análise por *western blot* e quantificação da expressão proteica de *MLKL* após 24h e 36h com e sem estímulo por IFN- γ em (a) MEF e (b) NIH3T3. A quantificação das bandas foi feita pelo *software* ImageLab (Bio-Rad). $\Delta\Delta$ representa a diferença de valor (*fold change*) entre as amostras estimuladas e não estimuladas no mesmo intervalo de tempo. A expressão de GAPDH foi utilizada como normalizador da expressão de *MLKL* nas diferentes condições experimentais. (c) e (d) quantificação da expressão do mRNA de *MLKL* por PCR quantitativa. Os dados foram normalizados pela expressão de b-Actina e representados em *fold change* (ou seja, quantas vezes o valor daquela amostra está aumentado em relação à condição controle). O teste estatístico utilizado foi o *t* de Student considerando $p < 0,0001$. ns = não significativo. n=3.

Figura 14. Expressão de MLKL em células MEF e NIH3T3 após estímulo com IFN- γ

3.1.2 Responsividade do gene murino de MLKL ao interferon beta

A seguir, MEF e NIH3T3 foram tratadas com 25U/mL ou 250U/mL de IFN- β (*PBL assay*) por 16h ou 24h, como se encontra representado na figura 15. É possível observar um aumento de duas vezes e meia na expressão proteica de MLKL em MEFs (Figura 15-A), porém apenas um efeito de uma vez e meia foi observado na modulação proteica de MLKL em NIH3T3 (Figura 15-B) no intervalo de 16h após estímulo. Para células MEF, o estímulo com IFN- β não resultou em nenhuma modulação significativa na expressão do mRNA, e NIH3T3 teve uma significância bem marginal com $p=0,0237$ (Figura 15-C e 15-D).



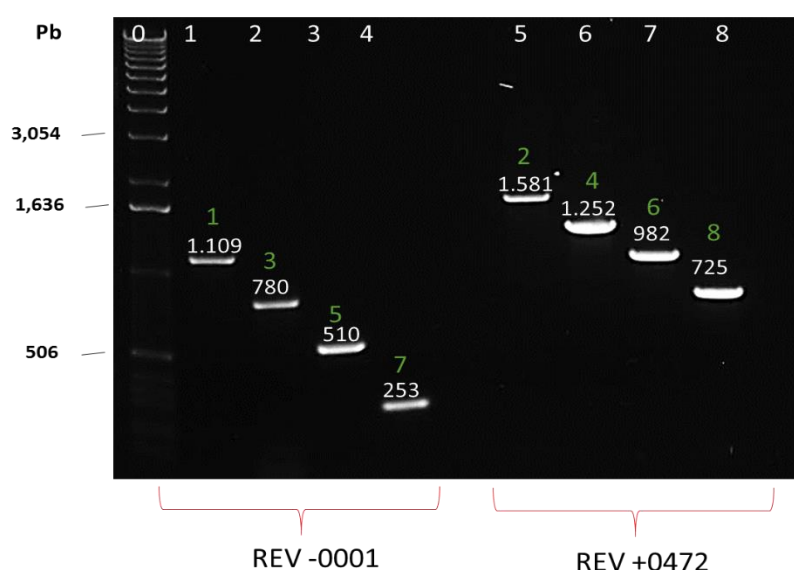
Análise por *western blot* e quantificação da expressão proteica de *MLKL* após 16h e 24h com e sem estímulo por IFN-β em (a) MEF e (b) NIH3T3. A quantificação das bandas foi feita pelo software ImageLab (Bio-Rad). $\Delta\Delta$ representa a diferença de valor (*fold change*) entre as amostras estimuladas e não estimuladas no mesmo intervalo de tempo. A expressão de GAPDH foi utilizada como normalizador da expressão de *MLKL* nas diferentes condições experimentais. (c) e (d) quantificação da expressão do mRNA de *MLKL* por PCR quantitativa. Os dados foram normalizados pela expressão de b-Actina e representados em *fold change* (ou seja, quantas vezes o valor daquela amostra está aumentado em relação à condição controle). O teste estatístico utilizado foi o *t* de Student considerando $p < 0,0001$. ns = não significante. n=3.

Figura 15. Expressão de MLKL em células MEF e NIH3T3 após estímulo com IFN-β

Diante destes resultados, o estímulo com 100ng/mL de IFN-γ por 36h foi escolhido para os experimentos de responsividade do promotor de *mMLKL*, descrito na seção de atividade da região promotora.

3.2 Amplificação dos insertos para clonagem

Como descrito em detalhes em Métodos, utilizamos um ciclo básico de amplificação com otimizações das melhores condições referentes à temperatura de anelamento, número de ciclos e concentração de $MgCl_2$ encontradas para cada reação de PCR. A figura 16 mostra os resultados obtidos com as reações otimizadas após a purificação. É possível notar que as reações foram otimizadas com sucesso, resultando em banda de amplificação única e de tamanho esperado.



As raias correspondem a: (0) marcador molecular 100pb (Invitrogen); (1-4) combinações de diferentes *primers forward* com o rev-0001; (5-8) combinações de diferentes *primers forward* com o rev+0472. (1,5) fw-1089; (2,6) fw-0761; (3,7) fw-0491 e (4,8) fw-0234. o número em cor branca acima de cada banda corresponde ao tamanho esperado de cada amplicon (pb) e o número em verde corresponde ao número da reação. As amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo e visualizados através de transiluminador UV.

Figura 16. Análise dos amplicons das reações de PCR para amplificação das regiões do promotor de mMLKL

Utilizando três testes sequenciais para a verificação da correta clonagem e sequência dos insertos (Rapiprep, Digestão Diagnóstica e Sequenciamento Sanger), foi possível determinar clones 100% homólogos à sequência referência para todos os insertos amplificados.

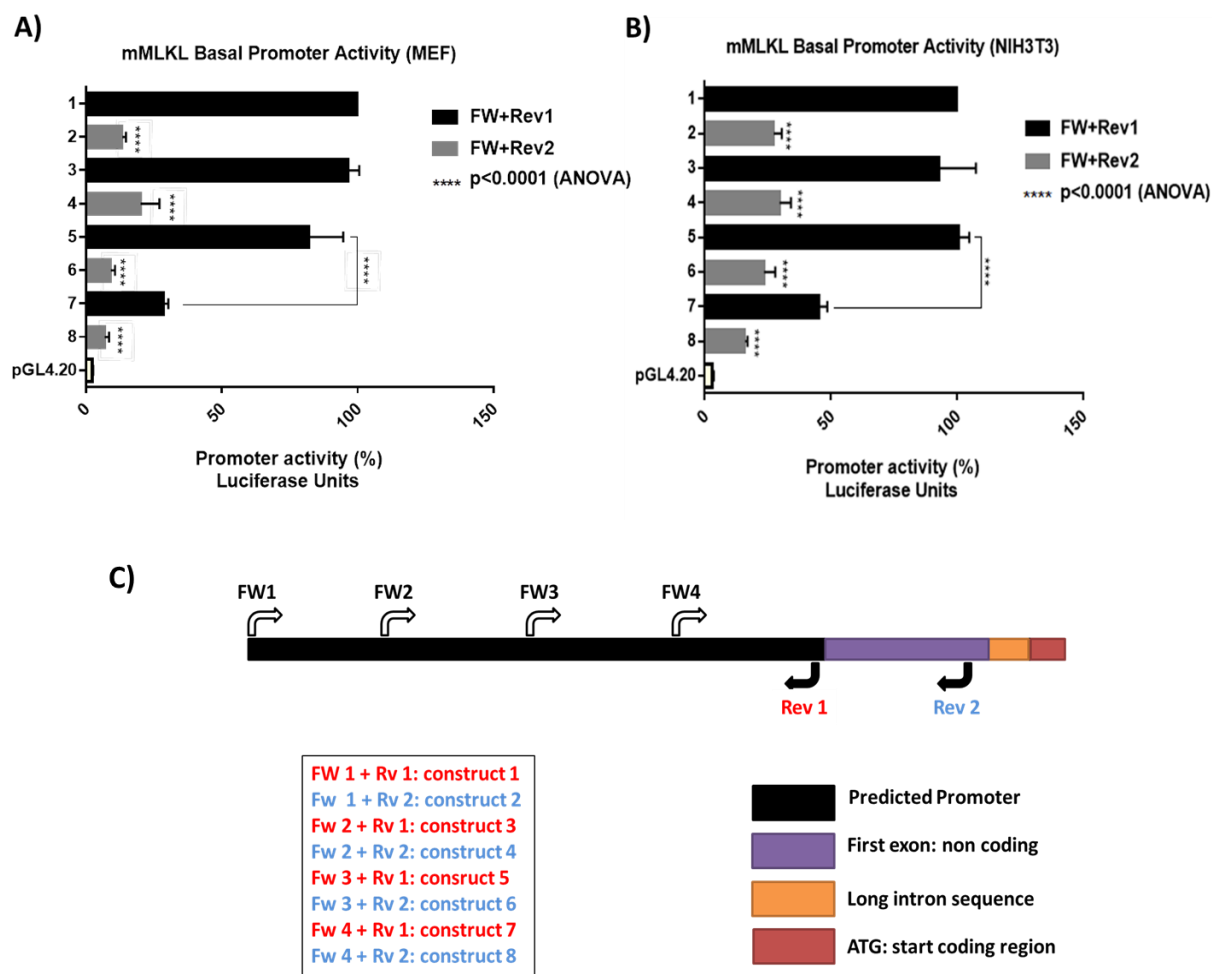
3.3 Ensaios de Luciferase para medir atividade da região promotora

3.3.1 Atividade promotora basal do promotor de *MLKL* murino

A atividade promotora basal de *mMLKL*, ou seja, a atividade que o promotor apresenta em condições basais da célula, sem nenhum estímulo para transcrição do gene, revelou resultados interessantes tanto para as células MEF como para as NIH3T3 (Figura 17). O esquema apresentado nesta mesma figura serve para um melhor entendimento da dinâmica da clonagem e comparação dos resultados obtidos.

A primeira observação relevante é que, de acordo com o *primer* Rev utilizado, obtivemos dois padrões diferentes de atividade do promotor. Quando utilizamos o *primer* Rev1, representados pelos números ímpares nas figuras 16 e 17, que exclui a região do primeiro exon não codante de *MLKL*, os construtos apresentaram uma atividade de promotor significativa, variando conforme o *primer forward* utilizado. Entretanto, quando utilizamos o *primer* Rev2, representados pelos números pares, que inclui esta região, os construtos apresentaram atividade de luciferase próxima a encontrada para o plasmídeo vazio controle.

A segunda observação importante é que há uma redução na atividade do promotor, de aproximadamente 50%, entre os construtos 5 e 7. Essa diferença foi estatisticamente significativa, com $p < 0,0001$ (ANOVA), sugerindo que a região contida no construto 5 e que não está presente no construto 7 é de suma importância para atividade basal do promotor de *mMLKL*.



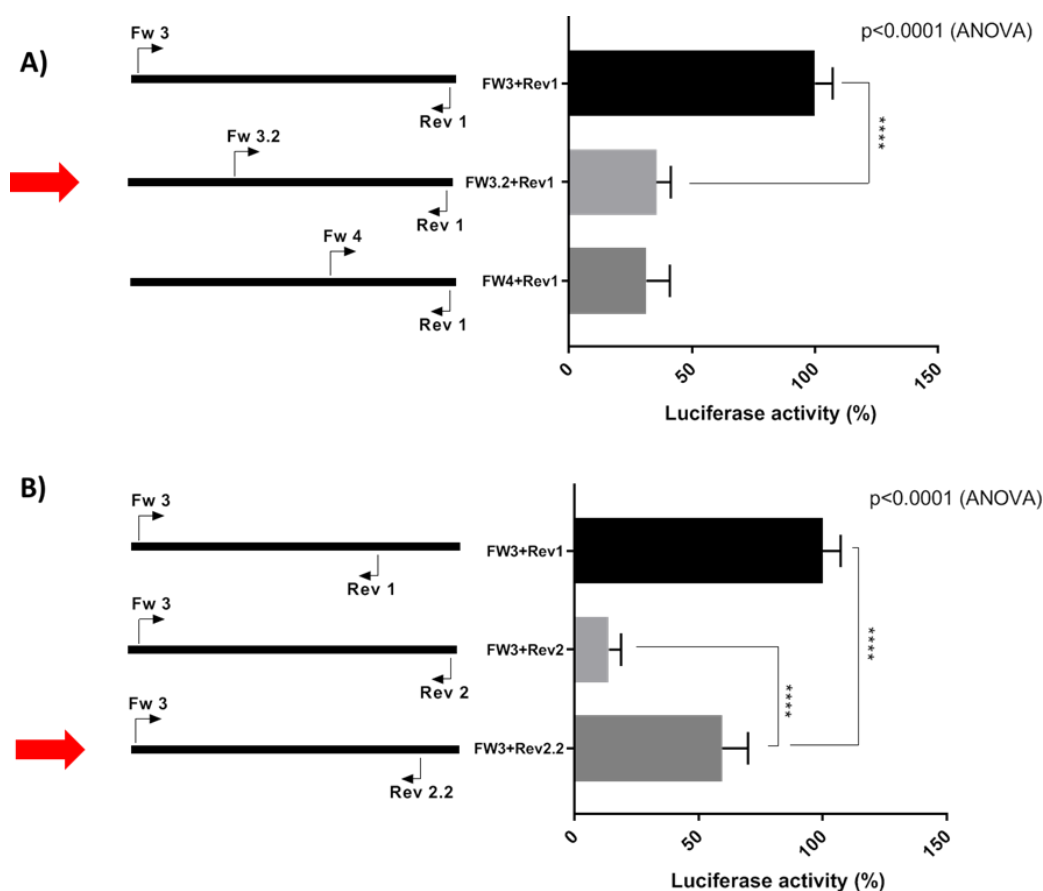
Atividade de luciferase em (a) MEF (n=4) e (b) NIH3T3 (n=3) representando a atividade promotora basal. Os números ímpares representam os construtos gerados com o reverso 1 e os números pares representam os construtos gerados com o reverso 2. Os dados foram transformados em porcentagem em relação ao construto 1. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA. (c) representação da região promotora do *MLKL* murino, apresentando os locais em que os *primers* foram desenhados para clonagem e criação dos construtos.

Figura 17. Atividade promotora basal de *MLKL* murino

Com base nestes dados, foi clonado um fragmento a partir de um *primer forward* desenhado no meio da região contida entre o construto 5 e 7, denominado de *forward 3.2*, gerando o construto 5.2. Além desta, também foi realizada uma clonagem excluindo um fragmento na porção 3' do promotor predito, substituindo o Rev 2, pelo reverso 2.2. Os resultados da atividade basal destas regiões, juntamente com a representação de suas posições na região do promotor estão compilados na figura 18. Os novos construtos estão representados com uma seta vermelha.

Como pode ser observado, a atividade promotora do *forward 3.2* combinado com o reverso 1 se assemelha à atividade do par 7, ou seja, da atividade promotora do *forward 4* combinado com o reverso 1 (Figura 18-A). Já a utilização do

primer reverso 2.2 com o forward 3 gerou uma atividade promotora intermediária entre as combinações do primer forward 3 com o reverso 1 e com o reverso 2 (Figura 18-B).



a) Atividade de luciferase do construto contendo o Fw 3.2 e o Rev1 juntamente com os construtos 5 e 7. b) Atividade do construto contendo o Fw3 e o Rev2.2, juntamente com os construtos 5 e 6. A seta vermelha indica os novos construtos. Os dados foram transformados em porcentagem em relação ao construto 5 e o teste estatístico utilizado foi ANOVA.

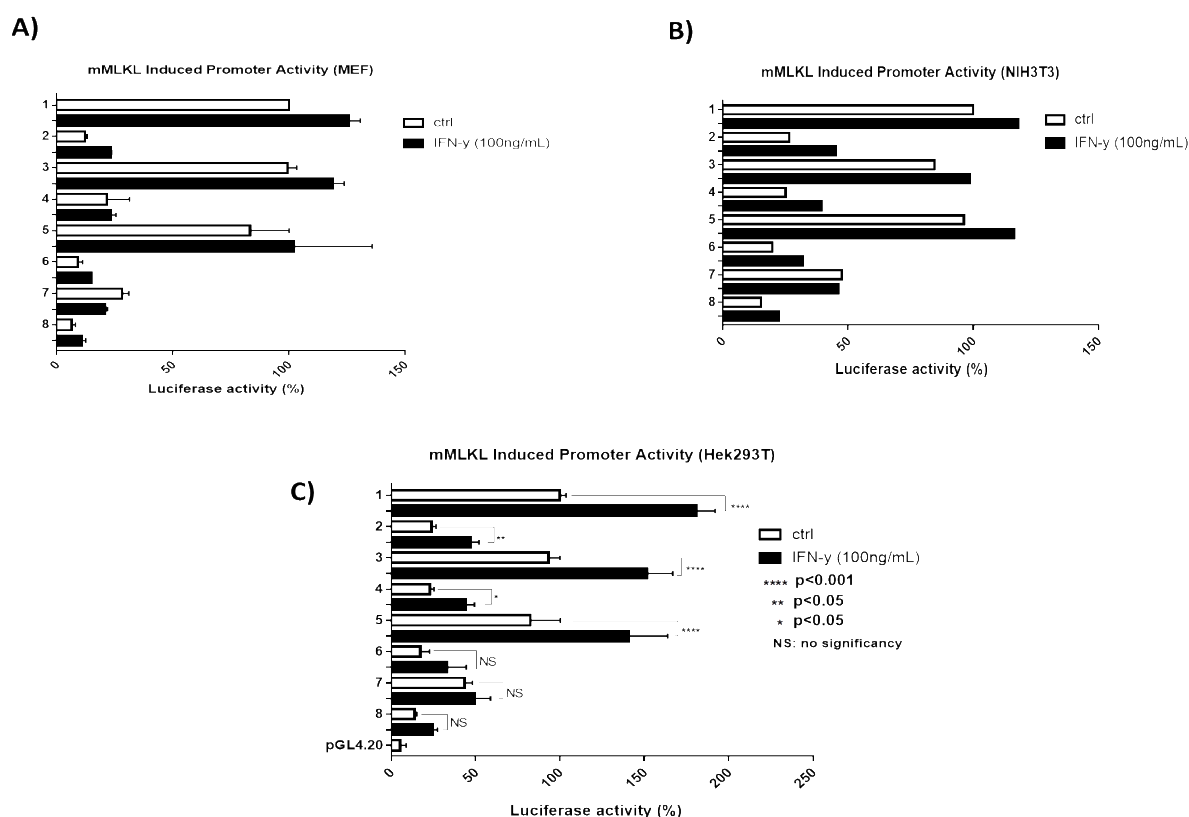
Figura 18. Atividade promotora basal dos novos construtos

3.3.2 Atividade promotora induzida por interferon gama

Após os dados obtidos com a atividade basal do promotor de *MLKL*, tínhamos interesse em elucidar qual a região do promotor seria ativada após o estímulo por IFN- γ . Para isso, após 16h da transfecção dos construtos, as células MEF, NIH3T3 e HEK293 foram estimuladas com 100ng/mL de IFN- γ , e os resultados encontram-se na figura 18.

É possível observar que em células MEF (Figura 19-A, duplicata experimental) e NIH3T3 (Figura 19-B, triplicata intra-experimental) o estímulo não induziu uma diferença significativa (multiple t test) de atividade de luciferase quando

comparado com o controle (atividade basal). Isso provavelmente se deu por conta da eficiência de transfecção destas células que foi por volta de 20-30% de eficiência (e por outros potenciais motivos discutidos abaixo). Entretanto, em células HEK293, conhecidas por serem de fácil transfecção, é possível notar uma diferença estatística entre as condições de estímulo com interferon e a atividade basal (Figura 19-C, replicata intra-experimental), sendo que nos construtos 1, 3 e 5, ou seja, com o reverso sem a região 5' UTR (rev1) esta diferença foi de aproximadamente o dobro da atividade basal.



Atividade de luciferase mediante estímulo por 100ng/mL de IFN-γ em (a) MEF (n=4), (b) NIH3T3 (n=3) e (c) HEK293 (n=3). O tempo de estímulo foi de 36h. Os dados foram transformados em porcentagem em relação ao construto 1 e o teste estatístico utilizado foi o multiple t test (PRISMA).

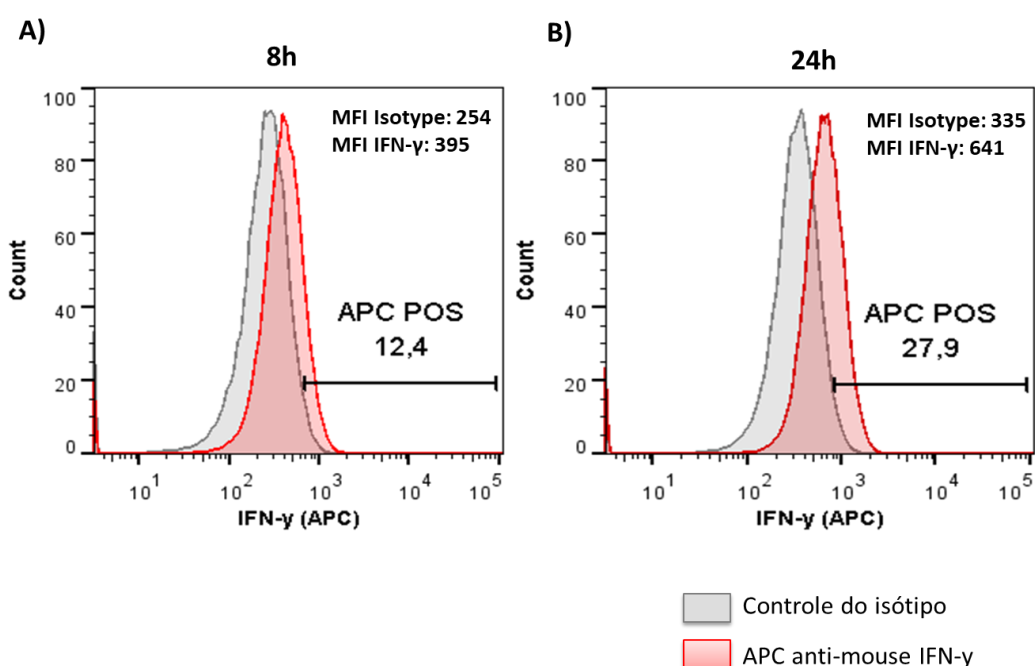
Figura 19. Atividade promotora induzida por IFN-γ

As células HEK293 foram utilizadas nestes experimentos devido a sua característica de alta eficiência de transfecção, e, portanto, pudemos observar que a baixa variação entre os construtos estimulados ou não, provavelmente se deve ao fato das células MEF e NIH3T3 terem uma eficiência de transfecção menor que a HEK293. Entretanto, os construtos que avaliamos nestes experimentos são murinos,

sendo importante realizar os experimentos em células murinas, para validar as observações realizadas em HEK293.

Outro fator interessante de se observar, é que a mesma região que apresentou atividade basal coincidiu com a região ativada após estímulo com IFN- γ . Para avaliar se havia alguma interferência de IFN- γ em nossos dados basais, investigamos se o método de transfecção estava induzindo de alguma forma a produção de IFN- γ . Foi possível observar por marcação intracelular de IFN- γ que células MEF apresentaram 12,4% (Figura 20-A) e 27% (Figura 20-B) de marcação positiva para IFN- γ nos intervalos de 8h e 24h após a transfecção, respectivamente. Além da representação por histograma, analisamos o MFI (média de intensidade de fluorescência, do inglês *Mediam Fluorescence Intensity*). Obtivemos como resultado após 8h de estímulo uma média de 395, que subiu para 641 em 24h.

Em conjunto, estes dados sugerem que o método de transfecção por lipofectamina 3000 pode estar induzindo a produção de IFN- γ em células MEF, um fator confundidor sobre a atividade basal do promotor de MLKL.



Células MEF marcadas com APC anti-*mouse* IFN- γ ou APC anti-*mouse* IgG1 (controle do isótipo) após (A) 8h e (B) 24h de transfecção com lipofectamina 3000, analisadas por citometria de fluxo. MFI: média de intensidade de fluorescência.

Figura 20. Marcação intracelular de IFN- γ em células transfectadas com lipofectamina 3000

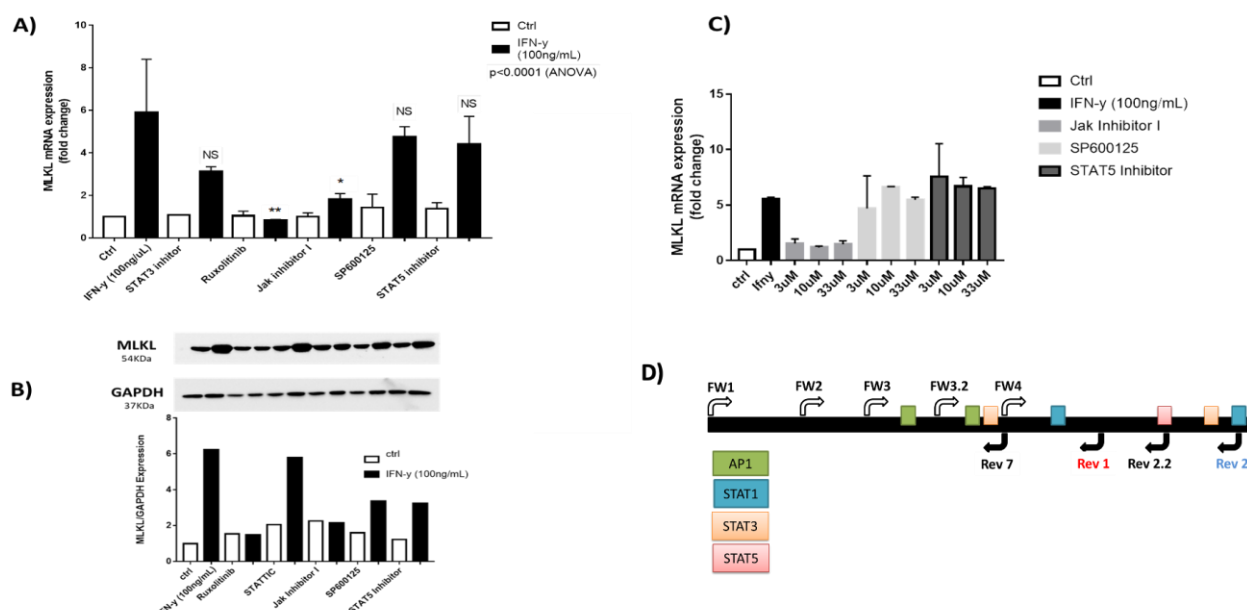
3.4 Vias de sinalização potencialmente envolvidas na regulação de *MLKL* murino

Através de uma predição *in silico* pelo software Genomatix, foram selecionados potenciais TFs que poderiam estar envolvidos na regulação de *mMLKL* com base no seu *score* de matriz de similaridade. Isso significa que os TFs que possuíam uma maior similaridade entre seu sítio de ligação e a região do promotor de *mMLKL* teriam uma maior chance dele verdadeiramente se ligar ao promotor em questão. O resultado inicial desta análise foi uma lista bastante extensa dos possíveis candidatos, mesmo com parâmetros bastante restritivos. Para ilustrar esta diversidade, uma lista com apenas os TFs que estão presentes em ambos os promotores de *MLKL* humano e murino está apresentada no apêndice 5, tabela 1.

Porém, levando em consideração o *score* da matriz de similaridade, como também os dados na literatura acerca das vias de sinalização envolvidas na morte por necroptose e/ou na regulação de *MLKL*, conseguimos escolher os primeiros candidatos a serem considerados para análises experimentais. Dentre eles, estão os fatores *STAT1* (já relatado na literatura como regulador transcricional de *MLKL*,^(48,49,51,52) *STAT3*, *STAT5* e *AP-1* (Apêndice 5, Figura 1). Para investigar se estes TFs estão realmente envolvidos nesta regulação, inibidores de diferentes vias bioquímicas envolvidas com a ativação destes fatores foram utilizados (Figura 21).

O tratamento de células MEF com a droga *Ruxolitinib*, inibidor reversível de *Jak1* e *Jak2*, moléculas que regulam a atividade de *STAT*, inibiu completamente o aumento de *MLKL* induzido por *IFN-γ*, tanto a nível transcricional (Figura 21-A) quanto a nível proteico (Figura 21-B). Um outro inibidor da mesma via de sinalização, *Jak Inhibitor I*, que inibe reversivelmente *Jak1*, *Jak2* e *Jak3* apresentou a mesma ação de inibição da indução de *MLKL* frente a *IFN-γ*. Entretanto, para inibição transcricional (Figura 21-A), *Jak Inhibitor I* demonstrou um menor potencial de inibição, quando comparado à inibição por *Ruxolitinib*.

Além destes agentes, foram testados inibidores específicos para as proteínas da família dos *STATs*, que encontram-se *downstream* à ativação de *Jak* frente ao estímulo com *IFN-γ*.⁽¹⁵⁷⁾ A adição de *STATTIC*, inibidor seletivo de *STAT3* e do inibidor seletivo de *STAT5*, não resultou em diferença estatística na inibição da indução de *MLKL* após estímulo com *IFN-γ*, tanto a nível de mRNA quanto a nível de proteína (Figura 21-A).



Células MEF foram tratadas com diferentes inibidores das vias de JAK, STAT e JNK e a expressão de *MLKL* foi medida a nível de (a) mRNA e (b) proteína. (c) Diferentes concentrações de um mesmo inibidor foram testadas para certificar que o resultado não era proveniente de uma baixa concentração. (d) sítios de ligação para fatores de transcrição através de análise in silico. Os dados de qPCR foram normalizados pela expressão de β -actina e para *western blot* foi utilizada a expressão de GAPDH. O teste estatístico utilizado para expressão gênica foi o ANOVA, considerando $p < 0,0001$. ns = não significante. Para expressão proteica este experimento é representativo de $n=2$.

Figura 21. Inibição da upregulação de *MLKL* por diferentes inibidores de vias de sinalização

Além da via de Jak/STAT, também utilizamos o inibidor SP600125, que inibe a fosforilação de c-Jun, impedindo que este forme um dímero com c-Fos e forme o fator de transcrição AP-1.⁽¹⁵⁸⁾ Entretanto, esta inibição também não demonstrou resultados significativos acerca da regulação de *MLKL* (Figura 21-A).

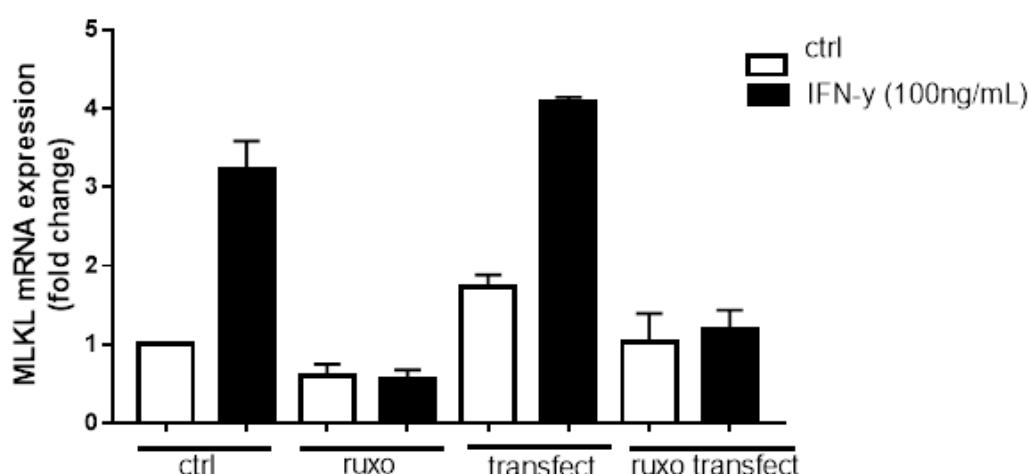
Para nos certificarmos que as vias de STAT5 e JNK realmente não estavam envolvidas e que não era apenas porque não estávamos utilizando uma concentração suficiente dos inibidores, fizemos um ensaio utilizando três diferentes concentrações de STAT5 inhibitor, inibidor de STAT5 e SP600125 (Figura 21-C). Este resultado nos confirmou que estas vias realmente não estavam envolvidas na regulação de *MLKL*, uma vez que mesmo utilizando uma concentração de 3uM, 10uM ou 33uM os resultados não apresentaram diferenças relevantes em relação às células estimuladas com IFN-γ sem a presença dos inibidores. Resolvemos realizar este ensaio também para *Jak Inhibitor 1*, apenas para nos certificarmos se a inibição apresentada seria mais ou menos precisa com diferentes concentrações. Para STAT5 não foi possível fazer este ensaio, uma vez que já estamos utilizando sua concentração máxima tolerada pelas células, pois todas as concentrações maiores que 1uM foram completamente citotóxicas para as nossas células.

Com base nos resultados demonstrados, podemos sugerir que a regulação de *MLKL* frente ao estímulo com IFN- γ segue a via canônica de sinalização celular por IFN- γ , que envolve a ativação de Jak1 e 2, e que não depende de STAT3, STAT5, JNK e AP-1.

3.4.1 A regulação transcricional de *MLKL* murino por lipofectamina é inibida por *Ruxolitinib*

Para continuar testando a hipótese de que a transfecção por lipofectamina estaria induzindo a produção de IFN- γ em células MEF, realizamos um ensaio com o inibidor *Ruxolitinib* utilizando o estímulo extracelular de IFN- γ como controle. Neste experimento, podemos observar que mesmo sem a adição de IFN- γ , o controle transfectado apresentou uma maior tendência a expressão de *MLKL* comparado ao controle não transfectado (Figura 22).

Além disto, células estimuladas com IFN- γ e transfectadas também apresentaram uma maior tendência a expressão de *MLKL* quando comparado com as células apenas estimuladas por IFN- γ . Em ambos os casos, o inibidor de Jak1 e Jak2 inibiu a indução de *MLKL* (Figura 22). Este resultado corrobora com nossos dados de marcação intracelular e reforça que a transfecção por lipofectamina induz a expressão de IFN- γ em células MEF.



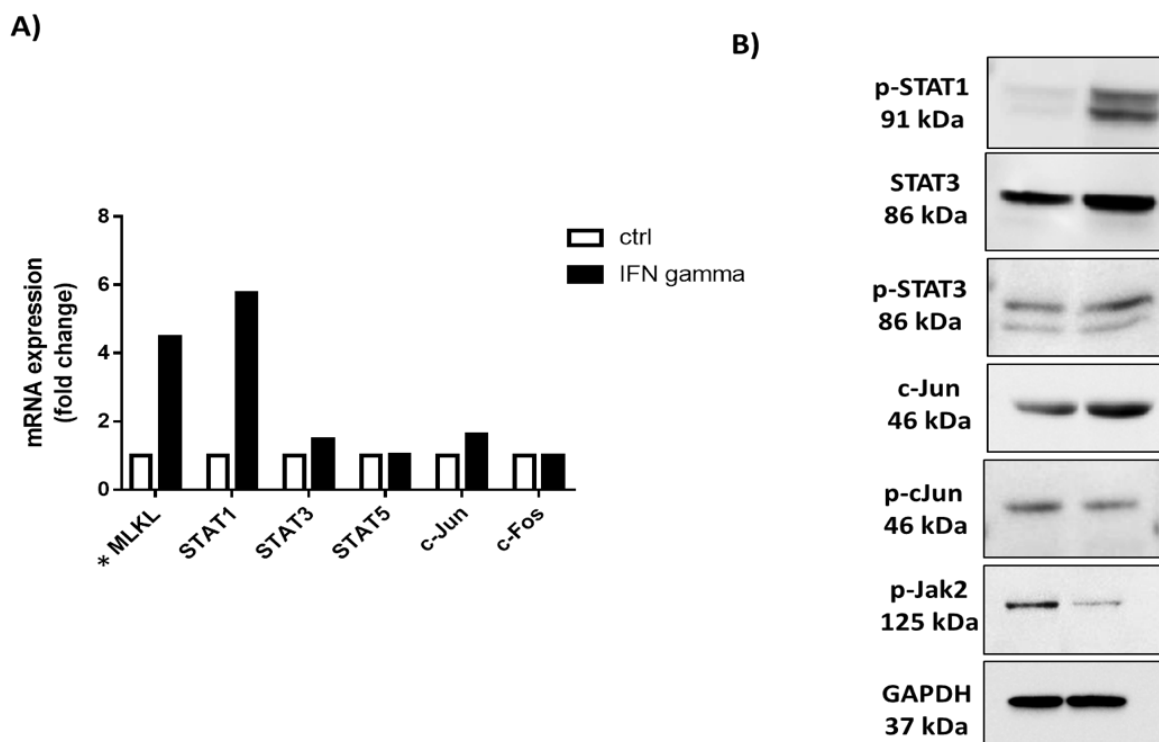
Células MEF foram tratadas com IFN- γ e/ou transfectadas com lipofectamina 3000 e a expressão de *MLKL* foi analisada na presença ou não do inibidor *ruxolitinib*. Os dados foram normalizados pela expressão de β -actina e representados em *fold change* (ou seja, quantas vezes o valor daquela amostra está aumentado em relação à condição controle) ruxo= *ruxolitinib*. transfect= transfectado.

Figura 22. Avaliação da expressão de *MLKL* em células transfectadas ou não com lipofectamina 3000

3.4.2 Responsividade dos fatores de transcrição ao estímulo por interferon gama

Um dos possíveis mecanismos de *feedback* positivo da ação do interferon é o aumento da expressão das próprias moléculas que fazem parte de sua via de sinalização. Avaliamos, portanto, a indução da expressão transcricional das moléculas STAT1, STAT3, STAT5 e AP-1 em células MEF após estimulação com IFN- γ . Após 48h de estímulo, apenas STAT1 apresentou aumento de sua expressão (Figura 23-A). Também investigamos os níveis de expressão proteica destas moléculas bem como os níveis de fosforilação de alguns destes membros. Infelizmente, nossos anticorpos anti-STAT1, anti-cFos e anti-STAT5 não funcionaram mesmo após várias otimizações. Sendo assim, em relação à expressão total, pudemos somente observar o não aumento da expressão de STAT3 e c-Jun (Figura 23-B). Em relação às versões fosforiladas destas moléculas, pudemos observar um aumento significativo da versão fosforilada de STAT1 (pSTAT1) enquanto que para JAK2 houve uma leve diminuição e para STAT2 e c-Jun não houve variação.

Este dado reforça a ideia de que o estímulo de interferon não somente ativa STAT-1, que é importante para o aumento de atividade do promotor de *mMLKL*, mas também induz o aumento de sua expressão, criando um *feedback* positivo para esta via bioquímica.



Expressão do (a) mRNA e (b) proteína de STAT1, STAT3, STAT5, c-JUN e c-FOS (AP-1). **MLKL* não é um fator de transcrição, foi utilizado apenas como controle experimental. Os dados de qPCR foram normalizados pela expressão de β -actina, de WB pela expressão de GAPDH e representados em *fold change* (ou seja, quantas vezes o valor daquela amostra está aumentado em relação à condição controle). As versões fosforiladas de cada proteína estão anotadas com um “p-“ à frente de seu nome (ex. P-STAT1).

Figura 23. Expressão e/ou ativação de alguns fatores de transcrição

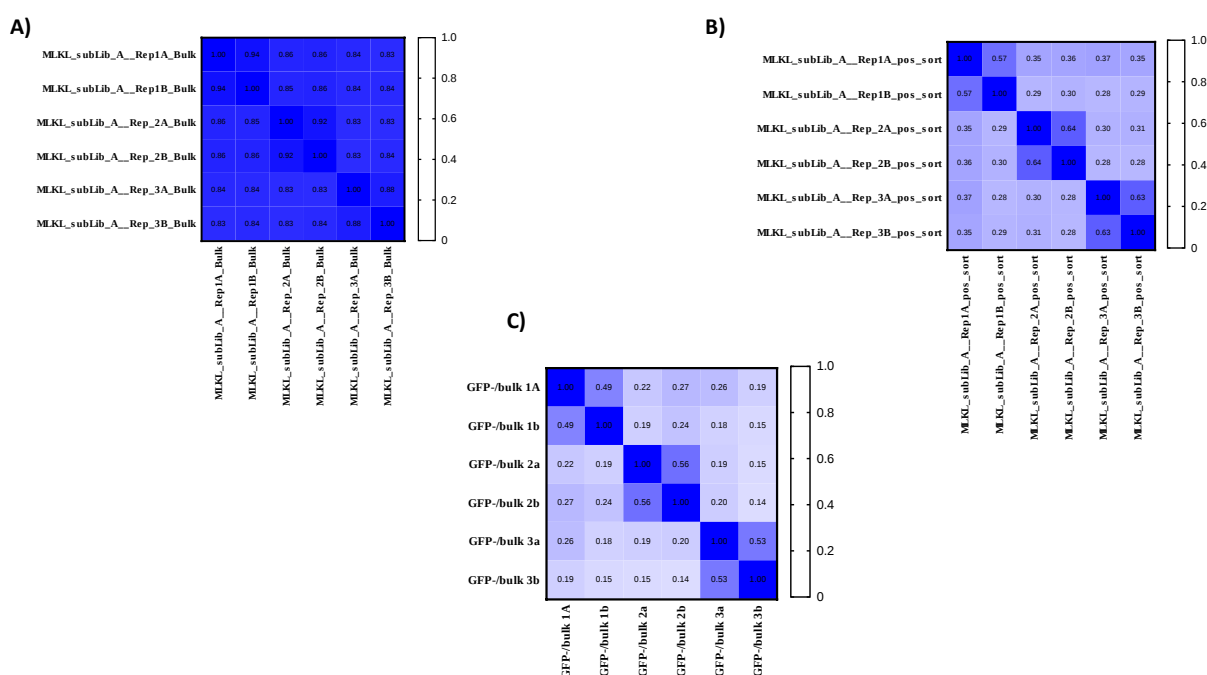
3.5 CRISPR screening

3.5.1 Correlação dos dados das bibliotecas de CRISPR

Conforme descrito já descrito anteriormente, fizemos o desenho e a construção da biblioteca de CRISPR contendo gRNAs para a região promotora putativa do *mMLKL* e da biblioteca de CRISPRi contendo gRNAs para quatro regiões de *enhancers* que haviam sido identificadas por bioinformática. O mapeamento dos *reads* do sequenciamento para a validação destas bibliotecas foi realizado pelo bioinformata do laboratório do Dr. Sherwood.

A primeira etapa após o mapeamento dos *reads* foi analisar a correlação entre as replicatas através da correlação de Spearman. Na figura 24 podemos observar a correlação do *screening* da biblioteca do promotor (Sub-Biblioteca A). Como podemos observar na figura 24-A, a correlação entre todas as replicatas foi

alta e consistente em todas as amostras, atingindo cerca de 0,8 para todas as replicatas biológicas (por exemplo 1A e 2A) e cerca de 0,9 entre todas as replicatas técnicas (por exemplo 1A e 1B). Na figura 24-B, podemos observar que a correlação entre as amostras sorteadas foi em torno de 0,3 entre as replicatas biológicas e em torno de 0,5 entre as replicatas técnicas. A última etapa foi observar a correlação das amostras através do *fold change*, que representa a divisão de cada amostra sortada por sua própria amostra inicial (antes do *sorting*), por exemplo amostra sortada 1A (população GFP negativa) / amostra inicial (antes do *sorting*) 1A. Na figura 24-C, podemos observar uma correlação de cerca de 0,2 entre todas as replicatas biológicas e cerca de 0,5 entre as replicatas técnicas, o que é consistente com os resultados de CRISPR *screenings* realizados previamente pelo laboratório. Estes dados sugerem que o *screening* foi consistente em todas as replicatas, e que a parte técnica do experimento funcionou como o esperado.



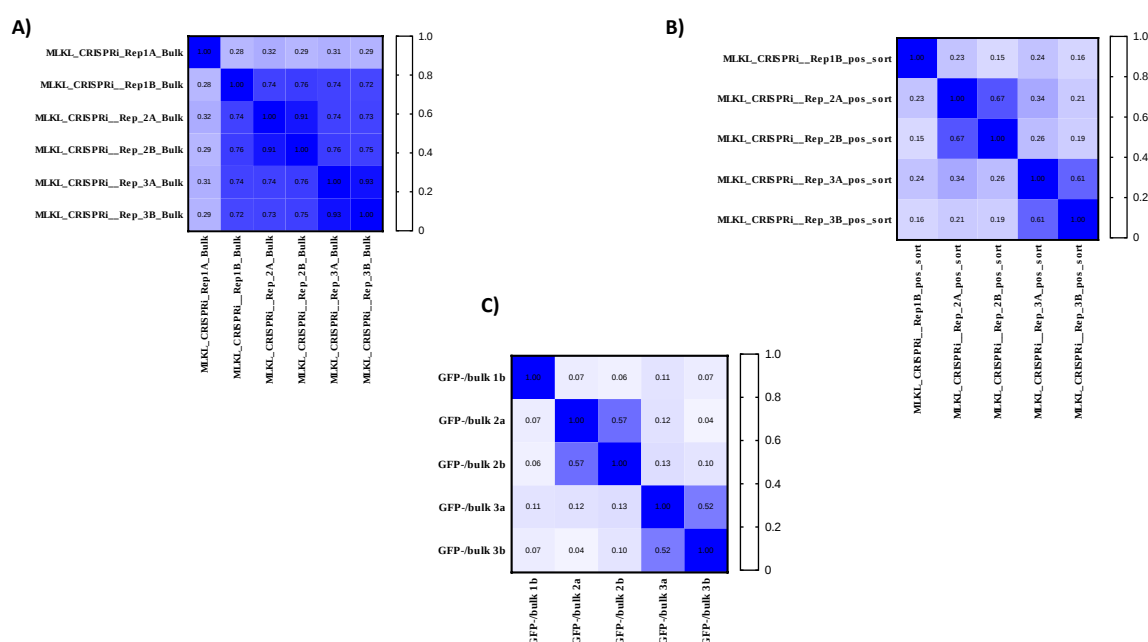
A) Correlação Spearman entre as amostras iniciais (antes do *sorting*). B) Correlação de Spearman entre amostras sortadas e C) correlação de Spearman pelo *fold change* das amostras sortadas (população GFP negativa)/amostras iniciais (antes do *sorting*).

Figura 24. Correlação de Spearman dos dados da biblioteca de CRISPR *screening* para o promotor de *mMLK1* (sub-biblioteca A)

Para o *screening* com a biblioteca de CRISPRi fizemos a análise dos mesmos parâmetros de correlação de Spearman para cada grupo (Figura 25),

conforme descrito acima. A amostra 1A mostrou correlação inconsistente e muito baixa (Figura 25-A), e por este motivo foi descartada das análises posteriores.

No geral, a correlação de Spearman mostrou resultados consistentes em todas as replicatas. No entanto, para amostras sorteadas e levando em consideração o *fold change*, as correlações foram menores do que no *screening* com a biblioteca de CRISPR-Cas9, mas ainda assim dentro do aceitável para esse tipo de *screening* em larga escala (Figura 25-B e 25-C).



A) Correlação de Spearman entre as amostras iniciais (antes do *sorting*). B) Correlação de Spearman entre amostras sorteadas e C) Correlação de Spearman pelo *fold change* das amostras sorteadas (população GFP negativa)/amostras iniciais (antes do *sorting*).

Figura 25. Correlação de Spearman do *screening* da biblioteca de CRISPRi (Sub-biblioteca B)

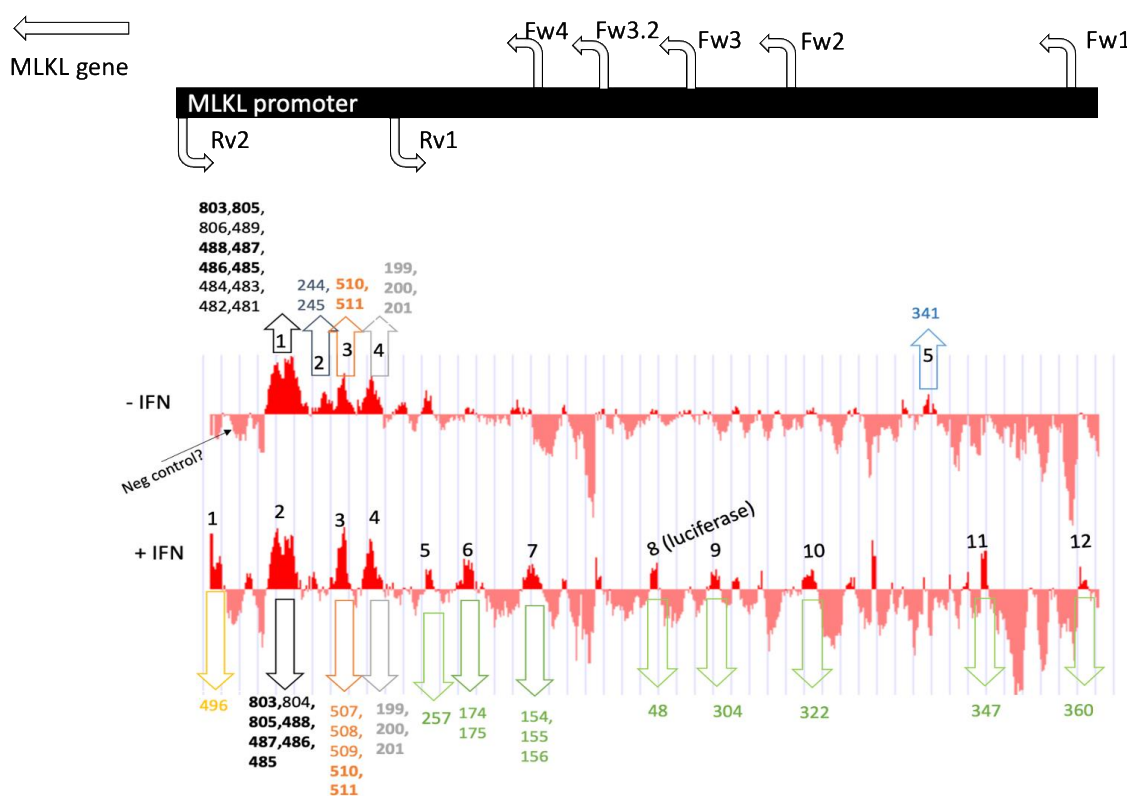
3.6 Resultados do Mageck e mapeamento dos RNAs guia

Depois de verificar a correlação e confirmar que o *screening* teve resultados consistentes em todas as replicatas, a segunda etapa foi classificar todos os gRNA enriquecidos na população de GFP negativa com base em seu Log *Fold Change* (LFC) e valor-p <0,005.

Para ambos os *screenings*, os gRNAs controles de GFP, ou seja, gRNAs que tinham como alvo a sequência de GFP, foram classificados nas primeiras colocações, confirmando mais uma vez que os *screenings* funcionaram.

Com base no LFC e na localização do cromossomo de cada gRNA, mapeamos todos os gRNA usando o navegador de genoma UCSC. Este mapeamento pode ser encontrado em https://genome.ucsc.edu/s/lzanetti/mm9_MLKL_screen.

Na figura 26, há um *print screen* de um dos resultados que podemos encontrar no *link* acima, e nesta imagem podemos observar claramente a consistência dos resultados do mapeamento para o *screening* CRISPR para biblioteca do promotor de *mMLKL*. gRNAs com LFC positivo, ou seja, gRNA enriquecidos na população GFP negativa, são mostrados em picos apontando para cima e gRNAs com LFC negativo são mostrados em picos apontando para baixo. Mapeamos todos os gRNA para cada pico positivo com e sem tratamento com IFN- γ e todos os gRNA destacados em negrito são coincidentes para ambas as condições.



gRNAs com LFC positivo são enriquecidos em picos apontando para cima e gRNAs com LFC negativo são enriquecidos em picos apontando para baixo. Todos os gRNA para cada pico positivo com e sem tratamento com IFN- γ foram mapeados e os gRNA destacados em negrito são os coincidentes para ambas as condições.

Figura 26. Mapeamento dos gRNAs enriquecidos na análise dos resultados de mageck de CRISPR *screening* da biblioteca do promotor de *mMLKL*

É possível observar que as amostras tratadas com IFN- γ apresentaram alguns picos enriquecidos positivos que não estão presentes nas amostras sem tratamento com IFN- γ , tais como o pico 1 e do pico 5 ao pico 12,

sugerindo que alguns gRNA podem ser específicos para ativação do promotor *mMLKL* após tratamento com IFN- γ . Além disso, é bastante claro que alguns picos são enriquecidos para ambas as condições, como os pico 1 (- IFN) e pico 2 (+ IFN), e alguns outros, como pico 3 e 4 (ambas as condições). Da mesma forma, há um bom número de gRNA que são coincidentes para ambos, sugerindo que esses gRNAs comuns podem estar fortemente associados à expressão do promotor basal de *mMLKL*. Também podemos observar que há um enriquecimento de picos com LFC positivos que caem dentro do mapeamento dos *primers* Rev 1 e Rev 2, ou seja, quanto mais próximo do início do gene de *mMLKL*, maior a concentração de regiões regulatórias.

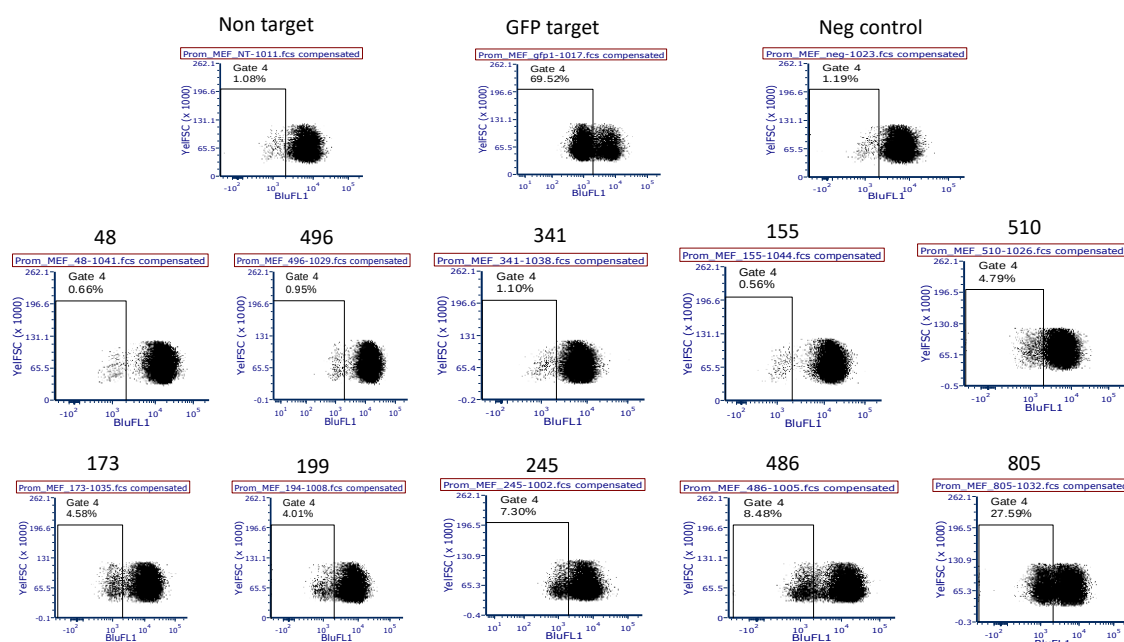
Para o *screening* com a biblioteca de CRISPRi, os resultados não foram tão consistentes, e é possível observar o mapeamento de gRNA para todas as potenciais regiões de *enhancers* no mesmo *link* (https://genome.ucsc.edu/s/lzanetti/mm9_MLKL_screen) ao selecionar a visualização da janela para cada região específica.

No *link* acima para encontrar os gráficos dos promotores e *enhancers* com os valores de LFC, selecione as janelas:

- **MLKL_prom_with_IFN** para sub-biblioteca A tratada com IFN;
- **MLKL_prom_no_IFN** para sub-biblioteca A sem tratamento com IFN;
- **MLKL_enhancer_with_IFN** para sub-biblioteca B tratada com IFN;
- **MLKL_enhancer_no_IFN** para sub-biblioteca B sem tratamento com IFN.

3.7 Validação dos RNAs guias selecionados

A validação individual de gRNA apresentou resultados realmente promissores, como podemos observar na figura 27 a seguir. O controle positivo de GFP mostrou cerca de 70% de perda de GFP, validando que o experimento funcionou, e os controles não-alvo e negativo se comportaram como esperado. Uma observação importante é que os controles negativos escolhidos estão localizados em uma região próxima a um dos picos enriquecidos positivos, desta forma podemos confirmar que o efeito é específico do gRNA e não apenas uma questão de proximidade que impacta de alguma forma a modulação de *MLKL*.



Validação individual dos gRNA para o promotor de *mMLKL* com cada gRNA e não-alvo, alvo de GFP e controle negativo n=1 em triplicata.

Figura 27. Validação individual dos gRNA

A minoria dos gRNAs não mostrou perda de GFP, como 48, 496, 341 e 155. Alguns dos gRNAs resultaram em uma perda de GFP mediana, como 510, 173 com 4% de perda de GFP e os gRNAs 245 e 486 mostraram cerca de 8 de perda de GFP. A maior perda de GFP pode ser observada com o gRNA 805, com cerca de 30%, o que é uma grande perda quando comparado com o controle positivo de GFP.

3.8 Screening da biblioteca de fatores de transcrição

Após mapear os *reads* do sequenciamento, observamos que tínhamos apenas 3000 *reads* compreendendo 1.205 gRNAs (de uma biblioteca de 12k) e os resultados eram muito inconsistentes entre as replicatas. Como usamos uma biblioteca bastante antiga do laboratório anfitrião no EUA, desconfiamos que houve degradação e perda de qualidade. Mesmo assim, procedemos para análise para ver se era possível extrair algum dado desse experimento que nos indicasse se valeria a pena refazê-lo. Abaixo (Figura 28) está um *print screen* do resumo do resultado do *mageck*.

id	num	neg score	neg p-value	neg fdr	neg rank	neg goodsgr	neg lfc	pos score	pos p-value	pos fdr	pos rank	pos goodsgr	pos lfc
GFP	62	1	1	1	1204	1	6.9306	6.31E-93	0.5	1	1	51	6.9306
IRF9	12	0.98658	0.93003	0.968353	1177	2	2.088	0.17542	0.99905	1	115	1	2.088
CREBBP	12	1	0.97941	1	1203	0	1.9705	0.15998	0.9987	1	98	1	1.9705
Stat2	8	0.84273	0.79121	0.924122	1107	1	1.8224	0.15162	0.99269	1	88	0	1.8224
ATF7IP	12	0.84987	0.89804	0.948884	1110	2	1.6969	0.28169	0.99976	1	236	0	1.6969
Foxq1	4	0.99763	0.72431	0.924122	1186	0	1.6587	0.030932	0.8386	1	19	1	1.6587
AEBP1	8	0.54083	0.74042	0.924122	922	2	1.5699	0.20295	0.99598	1	150	0	1.5699
NR1D1	8	0.97583	0.85585	0.948884	1174	1	1.5024	0.22108	0.99599	1	168	0	1.5024
Per1	4	0.99908	0.72431	0.924122	1196	0	1.4906	0.090638	0.92383	1	32	0	1.4906
Taf5	4	0.61546	0.54476	0.916577	979	1	1.4472	0.20573	0.96565	1	153	0	1.4472
STAT1	12	1	0.97941	1	1202	0	1.4391	0.011919	0.98731	1	13	2	1.4391
Hoxb9	4	0.72934	0.5816	0.924122	1050	1	1.4157	0.23464	0.97141	1	179	0	1.4157
Rbpjl	8	0.92585	0.826	0.940744	1148	2	1.3766	0.32005	0.99841	1	275	0	1.3766
Gata2	4	0.68416	0.56212	0.916577	1021	1	1.3728	0.15413	0.94385	1	92	0	1.3728
RFX4	8	0.78404	0.78537	0.924122	1082	2	1.3089	0.19738	0.99598	1	144	0	1.3089
KLF6	8	0.59068	0.76005	0.924122	958	2	1.3081	0.3306	0.99841	1	288	0	1.3081
MNT	8	0.99934	0.91599	0.956958	1197	0	1.3032	0.17363	0.99461	1	117	0	1.3032

Resumo dos resultados da biblioteca de fator de transcrição classificada por resultados de *log fold change* (LFC).

Figura 28. Resultado do mageck da biblioteca de fator de transcrição

É possível observar que não temos nenhum valor-p significativo ($p < 0,005$). Porém, o controle positivo de GFP é o primeiro no topo da lista, sugerindo que o *screening* funcionou dentro dos gRNAs que foram clonados. O valor-p não significativo é devido à baixa consistência do sequenciamento entre as replicatas. Não é um sequenciamento que podemos confiar nos dados por conta da variação, mas é uma tentativa de observar que, a partir de uma lista de 1205 genes, os genes relacionados com a via do IFN ainda estão entre os 20 primeiros, o que corrobora com alguns de nossos resultados anteriores. E é interessante observar que neste *screening* não usamos nenhum tratamento com IFN- γ .

4 DISCUSSÃO

O entendimento acerca da modulação da expressão das moléculas de *RIPK3* e *MLKL* se torna de importante contribuição para o cenário investigativo da sensibilidade de diferentes células e/ou diferentes patologias à necroptose, e compreender como *MLKL*, a molécula chave desta via, é regulada, auxiliará a desvendar caminhos de possíveis terapias para doenças envolvendo este tipo de morte celular.

Terapias utilizando a citocina IFN- γ já estão sendo administradas em diferentes práticas clínicas, sendo as principais frentes os setores de oncologia e imunologia.^(159–161) Em corroboração com dados já publicados em algumas linhagens tumorais e hepatócitos,^(48,49,51,121) nossos resultados mostraram que o tratamento com IFN- γ aumenta significativamente os níveis de expressão de *MLKL* tanto a nível transcricional quanto a nível proteico em células MEF, 3T3NIH e HT-29, o que pode servir de base para novas investigações acerca dos mecanismos de sinalização de IFN- γ e como a modulação positiva de *MLKL* pode impactar nestes cenários.

Diversos trabalhos da literatura tiveram sucesso em explorar elementos regulatórios da região promotora de genes envolvidos na fisiopatologia de doenças para desvendar rotas de novas possíveis terapias.^(162–165) Com o intuito de mapear a região promotora de *mMLKL*, foram feitas diversas clonagens com diferentes tamanhos do promotor, a fim de se encontrar qual a região mínima responsável pela atividade basal deste gene, como também a região responsiva ao estímulo por IFN- γ . Nossos resultados mostraram uma redução estatisticamente significativa da atividade promotora basal quando uma região de aproximadamente 250pb na extremidade 5' do construto 5 foi removida, originando o construto 7 de *mMLKL*. Tendo este resultado como parâmetro, criamos algumas estratégias a cerca desta região com o intuito de se restringir ainda mais a região responsável por esta atividade basal. Os resultados das novas clonagens (utilizando o *primer* Fw 3.2) indicam que o fragmento de 148pb que separa o Fw 3 do Fw 3.2 é de extrema importância para ativação basal do promotor, uma vez que quando esta região não está presente, há uma redução drástica na atividade de luciferase quando comparado com o construto 5. Além disso, a região contida entre os *primers forward* 3.2 e 4 não parece ser relevante para a atividade basal do promotor, já que quando esta região está presente, não aumenta os níveis de

expressão de luciferase se comparados com a combinação *forward* 4 + *reverse* 1. Esses dados advindos de ensaios de luciferase sugerem fortemente que, para atividade basal de *mMLKL*, há pelo menos um sítio de ligação a algum elemento regulatório da transcrição relevante neste fragmento de 148pb localizado entre o Fw 3 e o Fw 3.2.

Após os ensaios de luciferase, fizemos os *screenings* com CRISPR-Cas9 no promotor de *mMLKL* e em potenciais *enhancers* próximos ao gene de *mMLKL* como já descrito. Com base nos resultados advindos do *screening* com a ferramenta CRISPR-Cas9 no promotor de *mMLKL*, podemos observar na figura 26 que os picos correspondentes aos gRNAs são bem consistentes, ou seja, há um enriquecimento de picos apontando para cima na região mais proximal ao início do gene (entre os reversos 1 e 2), como se espera normalmente para qualquer promotor. Nestes picos, os gRNAs têm um valor de LFC positivo, ou seja, eles estão enriquecidos na população GFP negativa. Em outras palavras, as sequências de nucleotídeos alteradas por estes gRNAs são importantes para a expressão de GFP, e por consequência, de MLKL.

Outro fator que podemos notar é que nesta região há uma concentração de picos que são coincidentes tanto para os grupos de amostras com expressão basal como para as amostras que foram tratadas com IFN- γ , sugerindo que essas regiões sejam preponderantemente importantes para ativação basal do promotor de *mMLKL* (ver abaixo discussão sobre hipótese alternativa). Além dos picos coincidentes, é possível observar picos únicos para a condição basal, como o pico 2 e o pico 5, e picos únicos para a condição tratada com IFN- γ , como os picos 1 e 5 a 12, sugerindo que possam existir elementos regulatórios estímulo-dependentes.

Ao comparar os resultados advindos do *screening* com CRISPR-Cas9 no promotor de *mMLKL* e os resultados advindos dos ensaios de luciferase, não encontramos elementos comuns. O ensaio de luciferase mostra que a maior atividade do promotor foi observada na região entre os *primers* Fw 3 e Fw 3.2 em condições basais, e quando observamos os dados do *screening* por CRISPR/Cas, não é possível observar nenhum pico nesta região na condição basal, apenas na condição tratada com IFN- γ (IFN+, pico 8, Figura 26).

Uma possível explicação para esta variação é o fato de que nos ensaios de luciferase, usamos o reagente lipofectamina, que pode estar induzindo a expressão de IFN- γ . Esta observação encontra apoio em dois únicos trabalhos publicados na literatura sobre o tema até o presente momento.^(166,167) Esta observação

se torna de extrema importância uma vez que a maioria das transfecções transientes utilizam métodos com lipossomos catiônicos, podendo levar a uma interpretação enviesada de quais são os níveis basais de atividade de promotores que são responsivos à IFN- γ . Sendo assim, uma das hipóteses é que a atividade basal do promotor de *mMLKL* que observamos nos ensaios de luciferase não seja realmente basal e sim induzida pelo IFN- γ produzido autocrinamente pela transfecção. Corroborando esta hipótese, observamos um aumento na produção de IFN- γ 24h após a transfecção das células MEF com o reagente lipofectamina, como mostrado na figura 20.

Ao analisar o pico 8 da amostra tratada com IFN- γ (que está contido na região entre o *primer* Fw3 e Fw3.2), vimos que o gRNA principal que mapeava nesta região era o gRNA 48. Sendo assim, fizemos experimentos para tentar validar se a sequência afetada por este gRNA era a que explicava os resultados encontrados no ensaio de luciferase. Entretanto, ao observarmos os resultados da validação individual deste gRNA, observamos apenas uma perda mínima de GFP (menos de 1%). Nossa hipótese, portanto, é que este gRNA não tem como alvo exatamente a sequência que potencialmente se liga algum importante elemento regulatório, mas que seja próximo a ela. Mais estudos nesta região com a ferramenta de CRISPR-Cas9 precisam ser realizados para se mapear qual é a sequência de fato que é relevante para a atividade promotora, conciliando as duas estratégias experimentais.

Além desta região responsiva, nossos dados de ensaio de luciferase indicaram que quando a região que contempla o primeiro exon está presente como parte do promotor, não observamos atividade significativa do mesmo e/ou não há a tradução do transcrito da luciferase em proteína. Endogenamente, este primeiro exon é transcrito, porém não é traduzido, sendo que a metionina inicial (*start codon*) (AUG) da cadeia polipeptídica encontra-se no segundo exon. Sendo assim, este primeiro exon transcrito e não traduzido caracteriza-se como uma região regulatória 5' UTR.⁽¹⁶⁸⁾ De forma interessante, nossos achados com o *screening* de CRISPR-Cas9 no promotor de *mMLKL* mostraram uma região com alto grau de atividade regulatória no promotor de *mMLKL*, ou seja, onde está acumulada a maior parte dos picos positivos, e alguns negativos, do *screening* (Figura 26). Uma possível explicação para essa divergência, advinda dos modelos distintos utilizados, é o fato de o ensaio de luciferase se basear em um ensaio realizado com plasmídeo, ou seja, a modulação observada era decorrente de uma mudança no vetor e não no promotor endógeno da célula. Nestas

condições, sequências mais longas entre o início da transcrição e da tradução pode estar impactando a expressão da luciferase. Para testar esta hipótese, sequências não correlacionadas ao promotor de tamanhos diferentes poderiam ser adicionadas e mostrar se o tamanho desta região (independente de sua sequência de nucleotídeos) pode afetar o resultado da expressão do gene repórter. Adicionalmente, um estudo mais detalhado dos picos e vales mapeados nesta região e seus respectivos gRNAs, em validações individuais, poderá auxiliar a resolver este dilema.

Uma outra abordagem que realizamos foi uma análise *in silico* para buscar potenciais TFs que se ligavam às regiões promotoras putativas clonadas com base na matriz de similaridade dos sítios de ligação para TFs com a sequência do promotor. Os candidatos inicialmente escolhidos foram os TFs que possuíam um *score* de similaridade entre seu sítio de ligação e a sequência do promotor que fosse maior que 9.0 (escala de 0 a 10), para aumentar a probabilidade de uma interação real entre estes elementos. Sendo assim, para filtrar ainda mais os TFs relevantes escolhemos duas abordagens. A primeira leva em consideração os dados já publicados sobre o possível envolvimento de vias de sinalização e TFs envolvidos na modulação de *MLKL* e a segunda é restringir a busca às regiões identificadas experimentalmente como mais relevantes na modulação do *mMLKL*.

A via canônica de sinalização iniciada por IFN- γ a partir de sua ligação ao seu receptor na membrana plasmática leva à ativação de JAK1 e JAK2, os quais medeiam a fosforilação e ativação de STAT1. O STAT1, por sua vez, ativa a transcrição de diversos genes relacionados a resposta por IFN- γ na célula.⁽¹⁶⁹⁾ Na literatura já está claro que STAT1 participa da indução de *MLKL* em resposta a IFN- γ , o que foi comprovado através de animais nocaute para STAT1 que perderam o efeito de modulação de *MLKL* em resposta a IFN- γ , quando comparado com animais selvagens.^(48,49) O mesmo trabalho realizou CHIP e identificou a ligação de STAT1 a região de 1kb *upstream* ao CDS de *mMLKL*, considerado no trabalho em questão como sendo a região promotora.

Além disso, o fator de transcrição IRF-1, que tem sua transcrição ativada por STAT1,⁽¹⁷⁰⁾ parece estar envolvido no aumento de expressão de *MLKL*, uma vez que o silenciamento por *short interference RNA* (siRNA) de IRF1, como também o nocaute de IRF1 por CRISPR-Cas9, reduziram significativamente a expressão de *MLKL* em resposta a IFN- γ em algumas linhagens de câncer.⁽⁵¹⁾

Corroborando com estes resultados, o mesmo grupo demonstrou pela técnica de CHIP-Seq que IRF1 se liga ao promotor de *MLKL*.⁽⁵²⁾

Além de STAT1 e IRF1, outros TFs que apresentaram alto score de similaridade nas análises *in silico* foram STAT3, STAT5 e AP-1. Estes mesmos TFs podem estar relacionados com vias de sinalização em resposta a IFN- γ , quando esta assume uma via não canônica independente de STAT1 ou em situações de patologias, podendo ser um mecanismo direto ou indireto.^(126,171–176) O aumento de expressão de *MLKL* não foi ligado até o momento a nenhum mecanismo envolvendo STAT3, STAT5 ou AP-1, todos sendo de extrema importância para mecanismos de sobrevivência e imunogenicidade das células.

Nossos resultados corroboram os achados iniciais publicados, mostrando que STAT1 é importante para a modulação da atividade do promotor de *MLKL* murino frente ao estímulo de IFN- γ , já que o uso de inibidores de moléculas envolvidas na via deste fator de transcrição reduziu de forma significativa a expressão de *MLKL* (Figura 21). Além disso, observamos um mecanismo de *feed-forward*, já que o tratamento com IFN- γ aumenta a expressão do próprio STAT-1 (Figura 23). Demonstramos ainda que inibidores específicos para STAT5, STAT3 e c-fos não reduziram de forma significativa a expressão de *MLKL*, mesmo em doses máximas toleráveis (Figura 21).

Sendo assim, é possível sugerir que a ativação do promotor de *mMLKL* em resposta ao estímulo por IFN- γ se dá pela via de sinalização canônica desta molécula, ou seja, pela via de Jak-STAT. Uma das bases desta sugestão encontra-se no fato de que os dois diferentes inibidores da via de sinalização de Jak utilizados, *Ruxolitinib* e *Jak Inhibitor I*, inibiram completamente ou quase completamente a indução de *MLKL* por IFN- γ (Figura 21).

A outra base para esta sugestão se encontra nos nossos resultados de validação individual dos gRNA após o *screening* por CRISPR-Cas9 no promotor de *mMLKL*. O gRNA que resultou na maior perda de GFP foi o gRNA 805, o qual contém em sua sequência-alvo o sítio de ligação de STAT1, o mesmo sítio de ligação já demonstrado em estudo prévio.⁽⁴⁹⁾ Além do gRNA 805, o mesmo sítio de ligação para STAT1 também é encontrado no gRNA 488, que também aparecia como um dos *top hits* na lista de resultados, porém não foi validado individualmente pelo fato de compartilhar boa parte de sua sequência com o gRNA 805 e seria, de certo modo, redundante. Adicionalmente, o gRNA 173, que também demonstrou alguma perda de

GFP (4,5%), também possui como alvo um segundo sítio de ligação para STAT1. Todas essas evidências nos levam a acreditar que a modulação de *mMLKL* é dependente do fator de transcrição STAT1 e da ativação da via canônica de IFN- γ . Planejamos realizar mutações no promotor endógeno apenas no sítio de ligação de STAT1 como experimento comprobatório final.

Além de ser importante para confirmar os resultados já publicados, o fato de termos encontrado como alguns dos principais gRNAs em nosso *screening* justamente os que afetam o sítio de ligação de STAT1 atestam a força do método experimental que empregamos. Sendo assim, outros gRNAs que também foram mapeados durante o *screening* podem ser excelentes indicadores de novas regiões importantes de modulação do promotor de *mMLKL*.

Como um exemplo inicial desta abordagem, entre os primeiros gRNA que passaram por validação individual está o gRNA 486, que causou uma perda significativa de GFP. Este gRNA tem como alvo uma sequência que possui um sítio de ligação para o fator de transcrição NF- κ B. Este fator de transcrição pode ser um importante alvo para futuros estudos devido a sua importância na regulação da via de morte por necroptose.^(177–179)

Além dos gRNAs 805, 173 e 486 já citados, também observamos um decréscimo de GFP quando utilizamos os gRNAs 510, 199 e 245. Não há nas regiões alvo destas moléculas TFs com envolvimento óbvio com a via de interferon nem com a atividade basal de transcrição. E isso torna ainda mais interessante entender o que está interagindo com estas sequências e causando a modulação deste promotor. Pretendemos fazer isto com abordagem experimentais distintas, tais como ChIP-seq e mutações pontuais no promotor endógeno.

Enquanto o *screening* de CRISPR no promotor de *mMLKL* nos revelou muitos dados interessantes e promissores, infelizmente o mesmo não aconteceu com o *screening* de CRISPRi nos potenciais *enhancers*. Os resultados para esse *screening* não foram consistentes, ou seja, se observarmos o mapeamento dos gRNAs não há enriquecimento de gRNAs em regiões específicas, o que torna esses dados mais difíceis de serem interpretados visualmente. Ainda assim, selecionamos alguns gRNA para validação e esses experimentos estão sendo feitos no momento. A hipótese que temos sobre esse *screening* é que a atuação desses potenciais *enhancers* sobre a expressão de *mMLKL* possa ser pequena ou mesmo não existir.

Outro ponto importante a ser destacado é que a ativação da expressão de mRNA de *MLKL* parece ser uma modulação célula-específica, uma vez que em nossos resultados utilizando o estímulo por IFN- γ em células NIH3T3 não resultou em uma modulação positiva da expressão de *MLKL*, apesar de estudos mostrarem que estas células podem morrer por necroptose.^(180,181) Neste caso, é possível que os níveis basais de *RIPK3* e *MLKL* já sejam suficientes para desencadear o processo de morte. Alternativamente, nestas células *MLKL* pode sofrer modulações pós-traducionais, que alterariam tanto sua meia-vida como sua ativação, se tornando assim sensíveis aos estímulos indutores de necroptose.

Neste sentido, há um acúmulo de evidências de regulação pós-traducional de moléculas envolvidas com necroptose. Por exemplo, um estudo demonstrou que para ativação de *RIPK3* é necessária sua associação com um complexo de co-chaperonas formado por HSP90 e CDC37, uma vez que quando suprimidas, *RIPK3* não se torna ativo e consequentemente não há indução de necroptose.⁽¹⁸²⁾ Por outro lado, foi identificado que a proteína fosfatase 1B (Ppm1b) é capaz de regular negativamente o sinal necroptótico mediado por TNF por meio da desfosforilação de *RIPK3*, impedindo o recrutamento de *MLKL*, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*.⁽¹⁸³⁾ Outra regulação negativa de *RIPK3* é através da *carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein- E3 ligase* (CHIP) que pode levar a ubiquitinação de *RIPK3*, levando-o para degradação lisossomal, impedindo assim a formação do necrossomo e dessensibilizando células à necroptose.⁽¹⁸⁴⁾ Outra ligase, *pellino E3 ubiquitin protein ligase 1* (PELI1) também sinaliza *RIPK3* para degradação proteassomal através de poliubiquinação, entretanto, contrariamente a ação de CHIP, PELI1 parece sinalizar moléculas de *RIPK3* preferencialmente ativadas, uma vez que apenas após a fosforilação de *RIPK3* é que sua interação com PELI1 é permitida.^(185,186)

A *MLKL* por sua vez faz parte da família de pseudo-quinases, e sua interação com *RIPK3* se dá por meio de sua fosforilação por *RIPK3* nos sítios Thr357 e Ser358 em humanos, e Ser345, Ser347 e Thr349 em camundongos.⁽¹¹⁾ Após a sua fosforilação por *RIPK3*, *MLKL* sofre uma mudança conformacional que expõe seu outro domínio, o *N-terminal four-helix bundle* (4HB), ou complexo de quatro hélices.^(187,188) O mecanismo molecular posterior a exteriorização do domínio 4HB continua não elucidado completamente e frequentemente surgem novos trabalhos demonstrando algumas das possíveis execuções *downstream* de *MLKL*. Um dos conceitos mais discutidos até então corroboram para o fato de que o domínio 4HB está envolvido na

oligomerização de MLKL, e é responsável por facilitar sua interação com os grupos de fosfoinositol (PI) pertencentes a membrana plasmática.^(189–191)

5 CONCLUSÕES

1. Há uma região mínima responsável pela atividade basal do promotor de *mMLKL* que é coincidente com a região que responde a estímulos com IFN- γ . Vale ressaltar uma limitação do nosso estudo, que indica que a atividade basal do promotor pode estar sendo contaminada pela indução da expressão endógena de IFN- γ após transfecção das células;

2. Existe uma região de 148pb (que aqui denominamos como a região contida entre o *primer* FW 3 e o FW 3.2), que contém pelo menos um elemento regulatório de extrema importância para ativação do promotor de *mMLKL*;

3. Através do *screening* de CRISPR-Cas9, identificamos uma região regulatória próxima ao início da transcrição do gene *mMLKL*, com forte atividade regulatória, onde há uma forte sugestão da ligação do fator de transcrição STAT1;

4. A via de sinalização utilizada para o aumento da expressão de *mMLKL* pelo estímulo por IFN- γ depende de sua via canônica de sinalização, ativando Jak1 e Jak2, que leva a fosforilação de STAT1 e posteriormente a ativação da transcrição de *mMLKL*;

5. Há outras sequências identificadas pelo *screening* CRISPR-Cas9, que são potencialmente relevantes para a modulação deste promotor. E que a investigação de quais moléculas interagem com estas regiões pode levar a descobertas de potenciais alvos de modulação da expressão de *MLKL*.

6 REFERÊNCIAS

1. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*. 2002;9(3):459-70.
2. Rath PC, Aggarwal BB. TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol*. 1999;19(6):350–64.
3. Scott RS, McMahon EJ, Pop SM, Reap EA, Caricchio R, Cohen PL, et al. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. 2001;411(6834):207-11.
4. Arandjelovic S, Ravichandran KS. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat Immunol*. 2015;16(9):907-17.
5. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16(6):663–9.
6. Weinlich R, Dillon CP, Green DR. Ripped to death. *Trends Cell Biol*. 2011;21(11):630–7.
7. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(10):700–14.
8. Laster SM, Wood JG, Gooding LR. Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol*. 1988;141(8):2629–34.
9. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol*. 2005;1(2):112–9.
10. Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degterev A, Xavier RJ, et al. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell*. 2008;135(7):1311–23.
11. Murphy JM, Czabotar PE, Hildebrand JM, Lucet IS, Zhang JG, Alvarez-Diaz S, et al. The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity*. 2013;39(3):443–53.
12. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol*. 2000;1(6):489–95.
13. Christofferson DE, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(2):263–8.
14. Wu XN, Yang ZH, Wang XK, Zhang Y, Wan H, Song Y, et al. Distinct roles of RIP1-RIP3 hetero- and RIP3-RIP3 homo-interaction in mediating necroptosis. *Cell Death Differ*. 2014;21(11):1709–20.
15. Brault M, Olsen TM, Martinez J, Stetson DB, Oberst A. Intracellular nucleic acid sensing triggers necroptosis through synergistic type I IFN and TNF signaling. *J Immunol*. 2018;200(8):2748–56.
16. Wu T, Chen W, Han J. Role of RIP3 in necrotic cell death. In: Shen HM, Vandenabeele P, editors. *Necrotic cell death*. New York: Humana Press; 2014. p. 45–55.

17. Upton JW, Kaiser WJ, Mocarski ES. Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis. *Cell Host Microbe*. 2010;7(4):302–13.
18. Kaiser WJ, Sridharan H, Huang C, Mandal P, Upton JW, Gough PJ, et al. Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *J Biol Chem*. 2013;288(43):31268–79.
19. Oberst A, Dillon CP, Weinlich R, McCormick LL, Fitzgerald P, Pop C, et al. Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature*. 2011;471(7338):363–7.
20. Wu J, Huang Z, Ren J, Zhang Z, He P, Li Y, et al. Mkl knockout mice demonstrate the indispensable role of Mkl in necroptosis. *Cell Res*. 2013;23(8):994–1006.
21. Weinlich R, Oberst A, Dillon CP, Janke LJ, Milasta S, Lukens JR, et al. Protective roles for caspase-8 and cFLIP in adult homeostasis. *Cell Rep*. 2013;5(2):340–8.
22. Ch'en IL, Tsau JS, Molkentin JD, Komatsu M, Hedrick SM. Mechanisms of necroptosis in T cells. *J Exp Med*. 2011;208(4):633–41.
23. Yoon S, Kovalenko A, Bogdanov K, Wallach D. MLKL, the protein that mediates necroptosis, also regulates endosomal trafficking and extracellular vesicle generation. *Immunity*. 2017;47(1):51–65.e7.
24. Roderick JE, Hermance N, Zelic M, Simmons MJ, Polykratis A, Pasparakis M, et al. Hematopoietic RIPK1 deficiency results in bone marrow failure caused by apoptosis and RIPK3-mediated necroptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(40):14436–41.
25. Weinlich R, Oberst A, Beere HM, Green DR. Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(2):127–36.
26. Vieira M, Fernandes J, Carreto L, Anuncibay-Soto B, Santos M, Han J, et al. Ischemic insults induce necroptotic cell death in hippocampal neurons through the up-regulation of endogenous RIP3. *Neurobiol Dis*. 2014;68:26–36.
27. Roychowdhury S, McMullen MR, Pisano SG, Liu X, Nagy LE. Absence of receptor interacting protein kinase 3 prevents ethanol-induced liver injury. *Hepatology*. 2013;57(5):1773–83.
28. Gautheron J, Vucur M, Reisinger F, Cardenas DV, Roderburg C, Koppe C, et al. A positive feedback loop between RIP3 and JNK controls non-alcoholic steatohepatitis. *EMBO Mol Med*. 2014;6(8):1062–74.
29. Mocarski ES, Upton JW, Kaiser WJ. Viral infection and the evolution of caspase 8-regulated apoptotic and necrotic death pathways. *Nat Rev Immunol*. 2011;12(2):79–88.
30. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*. 2013;38(2):209–23.
31. Kamau E, Takhampunya R, Li T, Kelly E, Peachman KK, Lynch JA, et al. Dengue virus infection promotes translocation of high mobility group box 1 protein from the nucleus to the cytosol in dendritic cells, upregulates cytokine production and modulates virus replication. *J Gen Virol*. 2009;90(Pt 8):1827–35.
32. Thapa RJ, Nogusa S, Chen P, Maki JL, Lerro A, Andrade M, et al. Interferon-induced RIP1/RIP3-mediated necrosis requires PKR and is licensed by FADD and caspases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(33):E3109–18.

33. Dillon CP, Weinlich R, Rodriguez DA, Cripps JG, Quarato G, Gurung P, et al. RIPK1 blocks early postnatal lethality mediated by caspase-8 and RIPK3. *Cell*. 2014;157(5):1189–202.
34. Fu Z, Deng B, Liao Y, Shan L, Yin F, Wang Z, et al. The anti-tumor effect of shikonin on osteosarcoma by inducing RIP1 and RIP3 dependent necroptosis. *BMC Cancer*. 2013;13(1):580.
35. Zhao M, Lu L, Lei S, Chai H, Wu S, Tang X, et al. Inhibition of receptor interacting protein kinases attenuates cardiomyocyte hypertrophy induced by palmitic acid. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1451676.
36. Kim SK, Yun M, Seo G, Lee JY, Lee SB. Palmitate induces RIP1/RIP3-dependent necrosis via MLKL-mediated pore formation in the plasma membrane of RAW 264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;482(2):359–65.
37. Geserick P, Wang J, Schilling R, Horn S, Harris PA, Bertin J, et al. Absence of RIPK3 predicts necroptosis resistance in malignant melanoma. *Cell Death Dis*. 2015;6(9):e1884.
38. Fukasawa M, Kimura M, Morita S, Matsubara K, Yamanaka S, Endo C, et al. Microarray analysis of promoter methylation in lung cancers. *J Hum Genet*. 2006;51(4):368–74.
39. Moriwaki K, Bertin J, Gough PJ, Orlowski GM, Chan FK. Differential roles of RIPK1 and RIPK3 in TNF-induced necroptosis and chemotherapeutic agent-induced cell death. *Cell Death Dis*. 2015;6(2):e1636.
40. Jonsson G, Busch C, Knappskog S, Geisler J, Miletic H, Ringner M, et al. Gene expression profiling-based identification of molecular subtypes in stage IV melanomas with different clinical outcome. *Clin Cancer Res*. 2010;16(13):3356–67.
41. Nuges AL, El Bouazzati H, Hetuin D, Berthon C, Loyens A, Bertrand E, et al. RIP3 is downregulated in human myeloid leukemia cells and modulates apoptosis and caspase-mediated p65/RelA cleavage. *Cell Death Dis*. 2014;5(8):e1384.
42. Hockendorf U, Yabal M, Herold T, Munkhbaatar E, Rott S, Jilg S, et al. RIPK3 restricts myeloid leukemogenesis by promoting cell death and differentiation of leukemia initiating cells. *Cancer Cell*. 2016;30(1):75–91.
43. Koo GB, Morgan MJ, Lee DG, Kim WJ, Yoon JH, Koo JS, et al. Methylation-dependent loss of RIP3 expression in cancer represses programmed necrosis in response to chemotherapeutics. *Cell Res*. 2015;25(6):707–25.
44. Press D. Low expression of mixed lineage kinase domain-like protein is associated with poor prognosis in ovarian cancer patients. *Onco Targets Ther*. 2013;1539–43.
45. Yang Z, Jiang B, Wang Y, Ni H, Zhang J, Xia J, et al. 2-HG inhibits necroptosis by stimulating DNMT1-dependent hypermethylation of the RIP3 promoter. *Cell Rep*. 2017;19(9):1846–57.
46. Yang C, Li J, Yu L, Zhang Z, Xu F, Jiang L, et al. Regulation of RIP3 by the transcription factor Sp1 and the epigenetic regulator UHRF1 modulates cancer cell necroptosis. *Cell Death Dis*. 2017;8(10):e3084.
47. McComb S, Cessford E, Alturki NA, Joseph J, Shutinoski B, Startek JB, et al. Type-I interferon signaling through ISGF3 complex is required for sustained Rip3 activation and necroptosis in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(31):E3206–13.
48. Dara L, Liu ZX, Kaplowitz N. A murder mystery in the liver: who done it and how? *J Clin Invest*. 2016;126(11):4068–71.

49. Gunther C, He GW, Kremer AE, Murphy JM, Petrie EJ, Amann K, et al. The pseudokinase MLKL mediates programmed hepatocellular necrosis independently of RIPK3 during hepatitis. *J Clin Invest*. 2016;126(11):4346-60.
50. Cekay MJ, Roesler S, Frank T, Knuth AK, Eckhardt I, Fulda S. Smac mimetics and type II interferon synergistically induce necroptosis in various cancer cell lines. *Cancer Lett*. 2017;410:228–37.
51. Knuth AK, Rosler S, Schenk B, Kowald L, van Wijk SJ, Fulda S. Interferons transcriptionally up-regulate MLKL expression in cancer cells. *Neoplasia*. 2019;21(1):74–81.
52. Xiong Y, Li L, Zhang L, Cui Y, Wu C, Li H, et al. The bromodomain protein BRD4 positively regulates necroptosis via modulating MLKL expression. *Cell Death Differ*. 2019;26(10):1929–41.
53. Gao L, Ma Q, Liu X-Q, Wei B, Yang Q, Jiang L, et al. hsa-miR-500a-3P alleviates kidney injury by targeting MLKL-mediated necroptosis in renal epithelial cells. *FASEB J*. 2019;33(3):3523-35.
54. Burton ZF. The old and new testaments of gene regulation. Evolution of multi-subunit RNA polymerases and co-evolution of eukaryote complexity with the RNAP II CTD. *Transcription*. 2014;5(3):e28674
55. Maniatis T, Goodbourn S, Fischer JA. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science*. 1987;236(4806):1237-45.
56. Jacob F, Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol*. 1961;3(3):318–56.
57. Crick F. Central dogma of molecular biology. *Nature*. 1970;227:561-3.
58. Kapoor P, Shen X. Mechanisms of nuclear actin in chromatin-remodeling complexes. *Trends Cell Biol*. 2014;24(4):238–46.
59. Perino M, Veenstra GJ. Chromatin control of developmental dynamics and plasticity. *Dev Cell*. 2016;38(6):610-20.
60. Rippe K, Schrader A, Riede P, Strohner R, Lehmann E, La G. DNA sequence-and conformation-directed positioning of nucleosomes by chromatin-remodeling complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(40):15635-40.
61. Volokh OI, Derkacheva NI, Studitsky VM, Sokolova OS. [Structural studies of chromatin remodeling factors]. *Mol Biol (Mosk)*. 2016;50(6):922–34. Russian.
62. Nothjunge S, Nuhrenberg TG, Gruning BA, Doppler SA, Preissl S, Schwaderer M, et al. DNA methylation signatures follow preformed chromatin compartments in cardiac myocytes. *Nat Commun*. 2017;8(1):1667.
63. Krogan NJ, Dover J, Khorrami S, Greenblatt JF, Schneider J, Johnston M, et al. COMPASS, a histone H3 (Lysine 4) methyltransferase required for telomeric silencing of gene expression. *J Biol Chem*. 2002;277(13):10753–5.
64. Ruan K, Yamamoto TG, Asakawa H, Chikashige Y, Kimura H, Masukata H, et al. Histone H4 acetylation required for chromatin decompaction during DNA replication. *Sci Rep*. 2015;5:12720.
65. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*. 2003;33 Suppl:245–54.

66. Kadonaga JT, Jones KA, Tjian R. Promoter-specific activation of RNA polymerase II transcription by Sp1. *Trends Biochem Sci.* 1986;11(1):20–3.
67. Hahn S. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11(5):394–403.
68. Gonzalez-Couto E, Klages N, Strubin M. Synergistic and promoter-selective activation of transcription by recruitment of transcription factors TFIID and TFIIB. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(15):8036–41.
69. Haberle V, Lenhard B. Promoter architectures and developmental gene regulation. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;57:11–23.
70. Moorthy SD, Davidson S, Shchuka VM, Singh G, Malek-Gilani N, Langroudi L, et al. Enhancers and super-enhancers have an equivalent regulatory role in embryonic stem cells through regulation of single or multiple genes. *Genome Res.* 2017;27(2):246–58.
71. Weintraub AS, Li CH, Zamudio AV, Sigova AA, Hannett NM, Day DS, et al. YY1 is a structural regulator of enhancer-promoter loops. *Cell.* 2017;171(7):1573–1588.e28.
72. Petrykowska HM, Vockley CM, Elnitski L. Detection and characterization of silencers and enhancer-blockers in the greater CFTR locus. *Genome Res.* 2008;18(8):1238–46.
73. Ayer S, Benyajati C. Conserved enhancer and silencer elements responsible for differential *Adh* transcription in drosophila cell lines. *Mol Cell Biol.* 1990;10(7):3512–23.
74. Lelli KM, Slattery M, Mann RS. Disentangling the many layers of eukaryotic transcriptional regulation. *Annu Rev Genet.* 2012;46(1):43–68.
75. Venters BJ, Pugh BF. How eukaryotic genes are transcribed. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2009;44(2-3):117–41.
76. Goncalves A, Leigh-Brown S, Thybert D, Stefflova K, Turro E, Flicek P, et al. Extensive compensatory cis-trans regulation in the evolution of mouse gene expression. *Genome Res.* 2012;22(12):2376–84.
77. Winkelman JT, Gourse RL. Open complex DNA scrunching: a key to transcription start site selection and promoter escape. *Bioessays.* 2017;39(2):10.1002/bies.201600193.
78. Tomko EJ, Fishburn J, Hahn S, Galburt EA. TFIIH generates a six-base-pair open complex during RNAP II transcription initiation and start-site scanning. *Nat Struct Mol Biol.* 2017;24(12):1139–45.
79. Smale ST, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem.* 2003;72(1):449–79.
80. Roy AL, Singer DS. Core promoters in transcription: old problem, new insights. *Trends Biochem Sci.* 2015;40(3):165–71.
81. Fishburn J, Galburt E, Hahn S. Transcription start site scanning and the requirement for ATP during transcription initiation by RNA polymerase II. *J Biol Chem.* 2016;291(25):13040–7.
82. Maston GA, Evans SK, Green MR. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2006;7(1):29–59.
83. Putta P, Mitra CK. Conserved short sequences in promoter regions of human genome. *J Biomol Struct Dyn.* 2010;27(5):599–610.

84. Xu M, Gonzalez-Hurtado E, Martinez E. Core promoter-specific gene regulation: TATA box selectivity and initiator-dependent bi-directionality of serum response factor-activated transcription. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1859(4):553-63.
85. Ohler U, Wassarman DA. Promoting developmental transcription. *Development*. 2010;137(1):15–26. Figure 1, Cis-acting DNA transcriptionregulatory elements. p. 16.
86. Xie X, Jiang J, Ye W, Chen R, Deng Y, Wen J, et al. Sp1, instead of AhR, regulates the basal transcription of porcine CYP1A1 at the proximal promoter. *Front Pharmacol*. 2018;9:927.
87. Triska M, Solovyev V, Baranova A, Kel A, Tatarinova TV. Nucleotide patterns aiding in prediction of eukaryotic promoters. *PLoS One*. 2017;12(11):e0187243.
88. Day DA, Tuite MF. Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *J Endocrinol*. 1998;157(3):361–71.
89. Ramanathan A, Robb GB, Chan SH. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(16):7511–26.
90. Harcourt EM, Kietrys AM, Kool ET. Chemical and structural effects of base modifications in messenger RNA. *Nature*. 2017;541(7637):339–46.
91. Singh R. RNA-protein interactions that regulate pre-mRNA splicing. *Gene Expr*. 2002;10(1-2):79-92.
92. Ramanouskaya TV, Grinev VV. The determinants of alternative RNA splicing in human cells. *Mol Genet Genomics*. 2017;292(6):1175–95.
93. Hershey JW, Sonenberg N, Mathews MB. Principles of translational control: an overview. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(12):a011528.
94. Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*. 2009;136(4):731–45.
95. Cain JA, Solis N, Cordwell SJ. Beyond gene expression: the impact of protein post-translational modifications in bacteria. *J Proteomics*. 2014;97:265–86.
96. Morgunova E, Taipale J. Structural perspective of cooperative transcription factor binding. *Curr Opin Struct Biol*. 2017;47:1–8.
97. Daly C, Reich NC. Double-stranded RNA activates novel factors that bind to the interferon-stimulated response element. *Mol Cell Biol*. 1993;13(6):3756–64.
98. Daly C, Reich NC. Characterization of specific DNA-binding factors activated by double-stranded RNA as positive regulators of interferon α/β -stimulated genes. *J Biol Chem*. 1995;270(40):23739–46.
99. Pandey P, Hasnain S, Ahmad S. Protein-DNA interactions. In: Ranganathan S, Gribskov M, Nakay K, Schonbach C, editors. *Encyclopedia of bioinformatics and computational biology*. Amsterdam: Elsevier; 2019. p. 142–54.
100. Badis G, Berger MF, Philippakis AA, Talukder S, Gehrke AR, Jaeger SA, et al. Diversity and complexity in DNA recognition by transcription factors. *Science*. 2009;324(5935):1720-3.
101. Klein SL, Neilson KM, Orban J, Yaklichkin S, Hoffbauer J, Mood K, et al. Conserved structural domains in FoxD4L1, a neural forkhead box transcription factor, are required to repress or activate target genes. *PLoS One*. 2013;8(4):e61845.

102. Jolma A, Yin Y, Nitta KR, Dave K, Popov A, Taipale M, et al. DNA-dependent formation of transcription factor pairs alters their binding specificity. *Nature*. 2015;527(7578):384–8.
103. Ruan S, Stormo GD. Comparison of discriminative motif optimization using matrix and DNA shape-based models. *BMC Bioinformatics*. 2018;19(1):86.
104. Zhang J, Liu B. Molecular sciences PSFM-DBT: identifying DNA-binding proteins by combining position specific frequency matrix and distance-bigram transformation. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9):1856.
105. Pabo CO, Sauer RT. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem*. 1992;61(1):1053–95.
106. Vaquerizas JM, Kummerfeld SK, Teichmann SA, Luscombe NM. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat Rev Genet*. 2009;10(4):252–63.
107. Fietze S, Farnham PJ. Transcription factor effector domains. *Subcell Biochem*. 2011;52:261–77.
108. Casey BH, Kollipara RK, Pozo K, Johnson JE. Intrinsic DNA binding properties demonstrated for lineage-specifying basic helix-loop-helix transcription factors. *Genome Res*. 2018;28(4):484-96.
109. Bobola N, Merabet S. Homeodomain proteins in action: similar DNA binding preferences, highly variable connectivity. *Curr Opin Genet Dev*. 2017;43:1–8.
110. Imanishi M, Imamura C, Higashi C, Yan W, Negi S, Futaki S, et al. Zinc finger-zinc finger interaction between the transcription factors, GATA-1 and Sp1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;400(4):625–30.
111. Neuberg M, Adamkiewicz J, Hunter JB, Muller R. A Fos protein containing the Jun leucine zipper forms a homodimer which binds to the AP1 binding site. *Nature*. 1989;341(6239):243-5.
112. Ma J. Crossing the line between activation and repression. *Trends Genet*. 2005;21(1):54–9.
113. Chua G, Morris QD, Sopko R, Robinson MD, Ryan O, Chan ET, et al. Identifying transcription factor functions and targets by phenotypic activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(32):12045-50.
114. Reynolds N, O'Shaughnessy A, Hendrich B. Transcriptional repressors: multifaceted regulators of gene expression. *Development*. 2013;140(3):505-12.
115. Biggar SR, Crabtree GR. Chemically regulated transcription factors reveal the persistence of repressor-resistant transcription after disrupting activator function. *J Biol Chem*. 2000;275(33):25381-90.
116. Ogbourne S, Antalis TM. Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J*. 1998;331(Pt 1):1-14.
117. Bromberg J, Darnell JE Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene*. 2000;19(21):2468-73.
118. Timofeeva OA, Chasovskikh S, Lonskaya I, Tarasova NI, Khavrutskii L, Tarasov SG, et al. Mechanisms of unphosphorylated STAT3 transcription factor binding to DNA. *J Biol Chem*. 2012;287(17):14192-200.

119. Capobianchi MR, Uleri E, Caglioti C, Dolei A. Type I IFN family members: similarity, differences and interaction. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(2):103–11.
120. Bhat MY, Solanki HS, Advani J, Khan AA, Keshava Prasad TS, Gowda H, et al. Comprehensive network map of interferon gamma signaling. *J Cell Commun Signal.* 2018;12(4):745–51.
121. Alturki NA, Shutinoski B, Gamero AM, McComb S, Joseph J, Mossman KL, et al. Type-I interferon signaling through ISGF3 complex is required for sustained Rip3 activation and necroptosis in macrophages. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(31):E3206–13.
122. Piehler J, Thomas C, Garcia KC, Schreiber G. Structural and dynamic determinants of type I interferon receptor assembly and their functional interpretation. *Immunol Rev.* 2012;250(1):317–34.
123. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004;75(2):163–89.
124. Majoros A, Platanitis E, Kernbauer-Holzl E, Rosebrock F, Muller M, Decker T. Canonical and non-canonical aspects of JAK-STAT signaling: lessons from interferons for cytokine responses. *Front Immunol.* 2017;8:29.
125. Mazewski C, Perez RE, Fish EN, Platanias LC, Type I. Type I interferon (IFN)-regulated activation of canonical and non-canonical signaling pathways. *Front Immunol.* 2020;11:606456.
126. Gough DJ, Levy DE, Johnstone RW, Clarke CJ. IFN γ signaling-does it mean JAK-STAT? *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19(5-6):383–94.
127. Johnson HM, Ahmed CM. Noncanonical IFN signaling: mechanistic linkage of genetic and epigenetic events. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:9564814.
128. Nan Y, Wu C, Zhang YJ. Interferon independent non-canonical STAT activation and virus induced inflammation. *Viruses.* 2018;10(4):1–22.
129. Roberts RJ, Danna K. How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. 2005;102(17):5905–8.
130. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet.* 2010;11(9):636–46.
131. Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(1):49–55.
132. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. 2012;337(6096):816–21.
133. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281–308.
134. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, Snijders AP, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science.* 2008;321(5891):960–4.
135. Hale CR, Zhao P, Olson S, Duff MO, Graveley BR, Wells L, et al. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell.* 2009;139(5):945–56.
136. Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature.* 2010;468(7320):67–71.

137. Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol.* 2005;60(2):174–82.
138. Gleditzsch D, Pausch P, Muller-Esparza H, Ozcan A, Guo X, Bange G, et al. PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes: diversified mechanisms and structures. *RNA Biol.* 2019;16(4):504–17.
139. Anders C, Bargsten K, Jinek M. Structural plasticity of PAM recognition by engineered variants of the RNA-guided endonuclease Cas9. *Mol Cell.* 2016;61(6):895–902.
140. Jiang F, Doudna JA. CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys.* 2017;46:505–29.
141. Liu M, Rehman S, Tang X, Gu K, Fan Q, Chen D, et al. Methodologies for improving HDR efficiency. *Front Genet.* 2019;9:691.
142. Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem.* 2010;79:181–211.
143. Cribbs AP, Perera SM. Science and bioethics of CRISPR-CAS9 gene editing: an analysis towards separating facts and fiction. *Yale J Biol Med.* 2017;90(4):625–34. Figure 1, CRISPR-Cas9 mediated gene-editing mechanisms. p. 626.
144. Poirier JT. CRISPR libraries and screening. In: Torres-Ruiz R, Rodriguez-Perales S, editors. *Progress in molecular biology and translational science.* Amsterdam: Elsevier; 2017. p. 69–82.
145. Wei L, Lee D, Law CT, Zhang MS, Shen J, Chin DW, et al. Genome-wide CRISPR/Cas9 library screening identified PHGDH as a critical driver for Sorafenib resistance in HCC. *Nat Commun.* 2019;10(1):4681.
146. Edwin HY, Tariq MR. Next-generation sequencing of genome-wide CRISPR screens access. *Physiol Behav.* 2016;176(1):139–48.
147. Kweon J, Kim DE, Jang AH, Kim Y. CRISPR/Cas-based customization of pooled CRISPR libraries. *PLoS One.* 2018;13(6):e0199473.
148. Larson MH, Gilbert LA, Wang X, Lim WA, Weissman JS, Qi LS. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2180–96.
149. MacLeod RS, Cawley KM, Gubrij I, Nookaew I, Onal M, O'Brien CA. Effective CRISPR interference of an endogenous gene via a single transgene in mice. *Sci Rep.* 2019;9(1):17312.
150. Rosenbluh J, Xu H, Harrington W, Gill S, Wang X, Vazquez F, et al. Complementary information derived from CRISPR Cas9 mediated gene deletion and suppression. *Nat Commun.* 2017;8:15403.
151. Parsi KM, Hennessy E, Kearns N, Maehr R. Using an inducible CRISPR-dCas9-KRAB effector system to dissect transcriptional regulation in human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol.* 2017;1507:221–33.
152. Vandenabeele P, Riquet F, Cappe B. Necroptosis: (last) message in a bubble. *Immunity.* 2017;47(1):1–3.
153. Moriwaki K, Chan FK. Necroptosis-independent signaling by the RIP kinases in inflammation. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(11-12):2325–34.

154. Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*. 2005;21(13):2933–42.
155. Arbab M, Sherwood RI. Self-cloning CRISPR. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2016;38:5B.5.1-5B.5.16.
156. Li W, Xu H, Xiao T, Cong L, Love MI, Zhang F, et al. MAGeCK enables robust identification of essential genes from genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screens. *Genome Biol*. 2014;15(12):554.
157. Liu X, Ye L, Bai Y, Mojidi H, Simister NE, Zhu X. Activation of the JAK/STAT-1 signaling pathway by IFN-gamma can down-regulate functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG. *J Immunol*. 2008;181(1):449–63.
158. Yin Y, Wang S, Sun Y, Matt Y, Colburn NH, Shu Y. JNK/AP-1 pathway is involved in tumor necrosis factor- α induced expression of vascular endothelial growth factor in MCF7 cells. 2009;63(6):429–35.
159. Medrano RF, Hunger A, Mendonça SA, Barbuto JA, Strauss BE. Immunomodulatory and antitumor effects of type I interferons and their application in cancer therapy. *Oncotarget*. 2017;8(41):71249-84.
160. Escobar G, Barbarossa L, Barbiera G, Norelli M, Genua M, Ranghetti A, et al. Interferon gene therapy reprograms the leukemia microenvironment inducing protective immunity to multiple tumor antigens. *Nat Commun*. 2018;9(1):2896.
161. Cauvi DM, Cauvi G, Toomey CB, Jacquinet E, Pollard KM. Interplay between IFN- γ and IL-6 impacts the inflammatory response and expression of interferon-regulated genes in environmental-induced autoimmunity. *Toxicol Sci*. 2017;158(1):227–39.
162. Colebatch AJ, Stefano L Di, Wong SQ, Hannan RD, Waring PM, Dobrovic A, et al. Clustered somatic mutations are frequent in transcription factor binding motifs within proximal promoter regions in melanoma and other cutaneous malignancies. *Oncotarget*. 2016;7(41):66569-85.
163. Kuan CS, Yee YH, Too WC, Few LL. Ets and GATA transcription factors play a critical role in PMA-mediated repression of the $\text{ck}\beta$ promoter via the protein kinase C signaling pathway. *PLoS One*. 2014;9(12):e113485.
164. Tong Q, Weaver MR, Kosmacek EA, O'Connor BP, Harmacek L, Venkataraman S, et al. MnTE-2-PyP reduces prostate cancer growth and metastasis by suppressing p300 activity and p300/HIF-1/CREB binding to the promoter region of the PAI-1 gene. *Free Radic Biol Med*. 2016;94(402):185–94.
165. Pedersen KB, Chhabra KH, Nguyen VK, Xia H, Lazartigues E. The transcription factor HNF1 α induces expression of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in pancreatic islets from evolutionarily conserved promoter motifs. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1829(11):1225-35.
166. Li XL, Boyanapalli M, Weihua X, Kalvakolanu DV, Hassel BA. Induction of interferon synthesis and activation of interferon-stimulated genes by liposomal transfection reagents. *J Interferon Cytokine Res*. 1998;18(11):947–52.
167. Guo X, Wang H, Li Y, Leng X, Huang W, Ma Y, et al. Transfection reagent Lipofectamine triggers type I interferon signaling activation in macrophages. 2019;97(1):92–6.
168. Leppek K, Das R, Barna M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(3):158–74.

169. Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(5):375–86.
170. Antonczyk A, Krist B, Sajek M, Michalska A, Piaszyk-Borychowska A, Plens-Galaska M, et al. Direct inhibition of IRF-dependent transcriptional regulatory mechanisms associated with disease. *Front Immunol.* 2019;10:1176
171. Samten B, Townsend JC, Weis SE, Bhounik A, Shams H, Barnes PF. CREB, ATF, and AP-1 transcription factors regulate IFN-gamma secretion by human T cells in response to mycobacterial antigen. *J Immunol.* 2008;181(3):2056–64.
172. Clarke CJ, Apostolidis V, Hii LL, Gough DJ, Trapani JA, Johnstone RW. Critical role of the transcription factor AP-1 for the constitutive and interferon-induced expression of IFI 16. *J Cell Biochem.* 2003;89(1):80–93.
173. Ramana C V, Kumar A, Enelow R. Stat1-independent induction of SOCS-3 by interferon-gamma is mediated by sustained activation of Stat3 in mouse embryonic fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;327(3):727–33.
174. Gonsky R, Deem RL, Bream J, Howard A, Targan SR, Gonsky R, et al. Enhancer role of STAT5 in CD2 activation of IFN-gamma gene expression. *J Immunol.* 2004;173(10):6241-7.
175. Thomsen MK, Martinez L, Wagner EF, Thomsen MK, Bakiri L, Hasenfuss SC, et al. JUNB/AP-1 controls IFN- γ during inflammatory liver disease. *J Clin Invest.* 2013;123(12):5258–68.
176. Herr F, Lemoine R, Gouilleux F, Kazma I, Heraud A, Baron C, et al. IL-2 phosphorylates STAT5 to drive IFN- γ production and activation of human dendritic cells. *J Immunol.* 2014;192(12):5660-70.
177. Zhu K, Liang W, Ma Z, Xu D, Cao S, Lu X, et al. Necroptosis promotes cell-autonomous activation of proinflammatory cytokine gene expression article. *Cell Death Dis.* 2018;9(5):500.
178. Kondylis V, Kumari S, Vlantis K, Pasparakis M. The interplay of IKK, NF- κ B and RIPK1 signaling in the regulation of cell death, tissue homeostasis and inflammation. *Immunol Rev.* 2017;277(1):113–27.
179. Kumari S, Van TM, Preukschat D, Schuenke H, Basic M, Bleich A, et al. NF- κ B inhibition in keratinocytes causes RIPK1-mediated necroptosis and skin inflammation. *Life Sci Alliance.* 2021;4(6):e202000956.
180. Gong YN, Guy C, Olauson H, Becker JU, Yang M, Fitzgerald P, et al. ESCRT-III acts downstream of MLKL to regulate necroptotic cell death and its consequences. *Cell.* 2017;169(2):286–300.e16.
181. Sridharan H, Ragan KB, Guo H, Gilley RP, Landsteiner VJ, Kaiser WJ, et al. Murine cytomegalovirus IE3-dependent transcription is required for DAI/ZBP1-mediated necroptosis. *EMBO Rep.* 2017;18(8):1429–41.
182. Li D, Xu T, Cao Y, Wang H, Li L, Chen S, et al. A cytosolic heat shock protein 90 and cochaperone CDC37 complex is required for RIP3 activation during necroptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112(16):5017–22.
183. Chen W, Wu J, Li L, Zhang Z, Ren J, Liang Y, et al. Ppm1b negatively regulates necroptosis through dephosphorylating Rip3. *Nat Cell Biol.* 2015;17(4):434–44.

184. Seo J, Lee EW, Sung H, Seong D, Dondelinger Y, Shin J, et al. CHIP controls necroptosis through ubiquitylation- and lysosome-dependent degradation of RIPK3. *Nat Cell Biol.* 2016;18(3):291–302.
185. Choi SW, Park HH, Kim S, Chung JM, Noh HJ, Kim SK, et al. PELI1 selectively targets kinase-active RIP3 for ubiquitylation-dependent proteasomal degradation. *Mol Cell.* 2018;70(5):920–935.e7.
186. Park HH, Morgan MJ, Kang HC, Kim YS. Regulation of RIP3 protein stability by PELI1-mediated proteasome-dependent degradation. *BMB Rep.* 2018;51(10):484–5.
187. Hildebrand JM, Tanzer MC, Lucet IS, Young SN, Spall SK, Sharma P, et al. Activation of the pseudokinase MLKL unleashes the four-helix bundle domain to induce membrane localization and necroptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(42):15072–7.
188. Rodriguez DA, Weinlich R, Brown S, Guy C, Fitzgerald P, Dillon CP, et al. Characterization of RIPK3-mediated phosphorylation of the activation loop of MLKL during necroptosis. *Cell Death Differ.* 2016;23(1):76–88.
189. Quarato G, Guy CS, Grace CR, Llambi F, Nourse A, Rodriguez DA, et al. Sequential engagement of distinct MLKL phosphatidylinositol-binding sites executes necroptosis. *Mol Cell.* 2016;61(4):589–601.
190. Dovey CM, Diep J, Clarke BP, Hale AT, McNamara DE, Guo H, et al. MLKL Requires the inositol phosphate code to execute necroptosis. *Mol Cell.* 2018;70(5):936–48.e7.
191. Petrie EJ, Sandow JJ, Jacobsen AV, Smith BJ, Griffin MD, Lucet IS, et al. Conformational switching of the pseudokinase domain promotes human MLKL tetramerization and cell death by necroptosis. *Nat Commun.* 2018;9(1):2422.

Abstract

Introduction: Necroptosis is a newly discovered biochemical pathway of cell death that is independent of caspases and with morphological aspects similar to necrosis. Activation of this pathway, which occurs through various stimuli, includes death receptors, and TRIF-mediated signals involving a cascade of phosphorylation of the RIPK1 and RIPK3 kinases, and the MLKL pseudokinase. The relevance of cell death by necroptosis has already been demonstrated in several pathophysiological conditions such as bacterial and viral infections, ischemic processes, cancer and autoimmune diseases. In many of these models RIPK3 and MLKL expression levels have been reported to be modulated both positively and negatively. The expression intensity of these molecules are correlated directly with the sensitivity of the cell to induce death by necroptosis. So far few reports have been published in the literature about the mechanisms that regulate the modulation of these gene both regarding signaling pathways and transcription factors involved and the characterization of their promoter regions. **Purpose:** To elucidate the mechanisms of gene expression of RIPK3 and MLKL by studying their promoter regions and the transcription factors that regulate them. **Methods:** Cloning, luciferase assays, CRISPR-Cas9 screening, Western blot, polymerase chain reaction, in vitro assays. **Results:** To the murine MLKL promoter, we defined a minimal region responsible for the basal promoter activity, which is also activated after the interferon gamma stimulation through luciferase assays. Additionally, we verified that MLKL expression by interferon gamma is mediated by the Janus Kinase pathway that indicates that the classic interferon-signaling pathway actively participates in this modulation. This suggestion was reinforced with CRISPR-Cas9 screening data showing that there is a region close to MLKL transcription start site that is rich in regulatory regions and with STAT1 binding sites. In these regions seems to be central for regulating the activation of MLKL transcription upon interferon gamma stimulation through the canonical JAK-STAT pathway. **Conclusion:** Important promoter regions were identified for the expression of murine MLKL both at baseline as well as after interferon gamma stimulation. The JAK-STAT pathway was also observed as participating in this process.

Keywords: MLKL [not in DeCS]; RIPK3 [not in DeCS]; Gene expression regulation; Transcription factors; Necroptosis

Apêndices

Apêndice 1. Sequências das regiões promotoras preditas extraídas do *software* Genomatix, juntamente com sua data de acesso

MLKL_Mus Musculus_Promoter Prediction (Data acesso: 24/07/2016)

aaccacatggtggctcacaccatctgtaatgggtctgatgccctcttctggtatgtctgaagacaatgacagtgtactcac
ataatataaaataaataaatctttaataaagaaaagaagtgagaaaacaggtaaactaagccccccagacatccctga
actatgttgccctcaagtaaaatgtctccccatacaatttatttctattcttccagctatatagcatgagtcagccaacggcat
tttcttcttcttcttcttcttctttaaatttggtttagttttttgagatatatactcaacatatatctgagtgtgtgtgtgtgtgt
gtgtgtgtgtgtgtgtgttagagctttagcgtcttggaaactggatttgtaaactagggtggcctcgaactcacagagatcctgag
tgctgggactcaaggctgtgtgccaccaccaactagctaataaaagggtatttcttatactagctaactgggggtataactgac
aaataataaactcatctgaaaaataacaaagtttggagatgacctagaaggggaaaaaaaggaactgaccttactt
gggtaacttcacactcccttaaacttctccattactctccatcccctgccccaggattattcaacacaaagcagctaaagga
accgctcagcacttctacgggttacctcattttatgtatttaccgggtgtggtatgcatgcgtttgcgtgccaggggccagtgc
acacgttgaagtcagaggacaaggcctttgcctcgagagaggaaaatgactcaggacatccgcctcacttctgtttctttt
cttttcttcttttttttttttaattatgtctgaagttccaggctatcccttacttggtatcagggctctctgcaacctattttctcaa
ccccaaattcaagacctcaaacagagaacctgggaagagtaactttaatggatttggggaaagaatcagccaacta
ggggcttcaactgggagctgtccagagagcgggtgtgggaagctggcatactctccagtaggagtagaaagccggggga
aggcgtgtcaaactggccgcggttccggagcagaactctggacagaaatagctgtcggacagggtggtttgaggactc
tgctggagcattgtctgcttggcccaaatttgacttttaggcgggaaccgcggctgggtgcggagttcctccgagaggcgaga
gctttaagggtgcaccaagggaggggactcaggacaccggggacctgctccgacctggcgtgcattgtcaacgaggca
gaagaccgcggtccgggagcggcgggagactgatgatcctacaggaactgagcgcaggatagaccggacgagcgc
ccctcggagatcacgtagaatccagttagctgtagcgcggcaggaggaagcaggagaatcccagaatcacagattgg
acttctggaacttagggtagtggtttcgattccctaactaaattgggctgttattctgctgagatctctgctgacctttttgccc
caaggaggatggagatcgaggaatggcattcgaggaaaggcaaaag

MLKL_Homo sapiens_Promoter Prediction (Data acesso: 24/07/2016)

agccagcgtgagcataggggctcaagaactccgttacagaattttctgggatttaataacctctagaggctcccattggta
attggtgtacaccctatgtaaatgaagaagatgaagtgaagtgtctcagtcacttactcagtgaacgccatatgtaaatgaa
gaaaatatttctgtcatagctgaaatgtgtccattttattagtcttaagaagtcagcgtgaatcagctttatgttccctgcctgc
agacctatttctctgctcacctcaatctcttcacctaagacaggaagaaaactgatgatgcaggagacgaagaacaat
agcaaggcgaagaaatgaatctccaaggccggcttcaagcgattctcccctctcaggctcccgagtagctgggattaca
ggcatgcaccaccacgcctggctaattttgtatttttagtagagacagggtttcccatgttggccaggatggtcttgaactcc
tgacctcagggtgatctggccacctccgcctcccaaagtgtggaattacaggcatgagccaccacaccagctcccagtt
ctgttcttttagaggcaaatagtctgttgagtaaatacataactacttagactttctagctgaagatgtagttaattcttaagaa
aacctgactcacactgtaacaggatgttctgcaatgacctagaagaggaagtgactttttccactttgggtgtcttctccctc
gtacctccccaccccgccaatattatccagcacagagaagcaaacaccagaagcttctctcaacttccagttttctctaa
acttccagtccttctcactgtgtcctggttataatagtgtggtggacatttcttattctgaatccccagcccctaaagaaggct
tggtactgacgtgtacagcgtagttagccagtgactttgggggaaggcaggaagagtgtggaaaggacaggaggaagga
agggagggggccgtggctccgagctgcctagaaagcggctccaggagccagggcaccgtgagcctgggtgggtggcag
ctggagccacgtcggaggggggaagtgtcgcagcattctcgcaggcatcacagacctgaggcagtggtcctccggaggg

gcctagggcaggcacctatcggttcccacaacctccagtcattgttcagacctcagaaaggtaaaatatggacacctttttc
tgcctaataatctttaagactctccatgcttctgggttatcaaaagactgtgtccagagcatgtgcttgcaggaacattaattag
ggtatttgcattgcaagagttgtcatgcaagggagaggggcaggaaagctctgaggtgttccactgtagtgtacaccacaat
gtcaccaaccctctggatgggctgataaatctagccttaccacaatgccctgggagtgaggcttggggcctgccacctccag
gagctcctgttcaaagggcatataagtccctatcaatgcaaagacttgccctgcaagagcagctatagggaactgggcag
gaatacagatagggatccttactacattgttgatgcttcacaccttcccagccacctgcacgaccagctgagtgttaca
gccctgaagcctatgtgaaaacaggataacttgatggttcagagccattattccatatgggcttaggcaaggtacttaact
ctcagtgctcagtttctcacctatagaaaggtaataaaaagcagtacctatccccttagggttcgtgtgagaattaaataag
ctaataatataacctggtgcatgataagtttatatacgtgttggtatgatcttagggcagctgtgagagagctgagccctag
aaccataaaaccctcctaagcaccatctccactcatggcctggcaggtcgtggagcaggaaatcctgtgggaaaaggg
aaggctttgactgtaggagtgggttgattgtgggtcctggaaggtaggactcctccctaacatcctcaatgccagcaac
acctaacttggtgcggcaggtgctcaggaaacgctagtcaaggagaaaggcactagcttctgctctgcccctgcccc
ccccaggggcgggactgtagaggcgccctataagggaagtgttcagtcaactcggaanaagggtacaacccggaaa
gtagactaccgtcttggtctagagactgaccttgcacagacagaccttcccctctctgcgaaaggaccaagcccc
gaagtcactccatctctacggctcgcaatttccagaggccccctggcaccttccagcctgatgtcgtgcgtcaagttag

Apêndice 2. Protocolo de preparação de biblioteca

Amplificamos a região U6-3' do gRNA com diferentes códigos de barras em cada *primer* PE1 (esses *primers* vão do código A ao código N) em combinação com o mesmo *primer* Rev.

```
101317_U6PE1_BcX      ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT      NNNNN  
GGAAAGGACGAAACACCG
```

```
110717_gRNA_r2seq_halfail      GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT  
GCCTTATTTAACTTGCTATGCTGT
```

Utilizamos metade do gDNA de cada amostra (que variou de amostra para amostra) e o volume final da PCR foi calculado de modo que o gDNA esteja em <25ng gDNA/μL PCR, arredondando para os 100μL mais próximos (por exemplo, se tivesse 11ug gDNA, usaria 5.5ug gDNA em uma PCR de 300μL). A reação foi corrida por 13 ciclos no seguinte programa:

```
98°C | 98°C 62°C 72°C | 72°C | 4°C  
30seg | 10 seg. 30 seg. 60 seg| 5min |
```

Após a primeira PCR, as amostras foram purificadas (PCR purification kit- Qiagen) e seguida para uma etapa de qPCR para determinar o número de ciclos necessários para amplificação total da biblioteca na reação de PCR convencional. Nesta etapa e na PCR2 foram usados os seguintes *primers*, dos quais o *primer* N70X variava de 0 à 20 combinado com o mesmo Rev:

```
031317_10xr2seq_24bp_N70X_fw CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT NNNNNNNN  
GT GACTGGAGTTCAGACGTGTGCT
```

```
110717_PE1_fulltail      AATGATACGGCGACCAACCGAGATCTAC  
ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTC
```

Para qPCR utilizamos o seguinte protocolo:

```
0,25μL de PCR1 purificado  
7,5μL 2x Q5Ultrall Master Mix  
0,375μL 20uM Fw primer: 110717_PE1_fulltail  
0,375μL 20uM Rv primer: 031317_10xr2seq_24bp_N70X_fw  
0,75μL 20X EvaGreen
```

5,75µL de dH₂O (para o volume final 15µL)

O protocolo foi executado seguindo o seguinte programa:

98°C | 98°C 67°C 72°C | 72°C | 4°C
30seg| 10seg. 30seg 60 seg. | 5min | por 30 ciclos

Após o resultado da qPCR, agrupamos as amostras com ct próximos e utilizamos 2 ciclos a menos do ct da qPCR para PCR2 (o número mínimo de ciclos PCR2 é 7, a média é 12-15, se tiver mais de 17 anos, há um problema).

Para PCR2 seguimos o seguinte protocolo:

22,5µL ~ metade do PCR1 (a outra metade foi armazenada)
25µL 2x NEB Next Master Mix
1,25µL 20uM Fw primer: 110717_PE1_fulltail
1,25µL 20uM Rv primer: 031317_10xr2seq_24bp_N70X_fw

Seguindo o seguinte programa:

98°C | 98°C 67°C 72°C | 72°C | 4°C (quantidade de ciclos determinada pela qPCR)
30seg| 10 seg. 30 seg. 60 seg. | 5min |

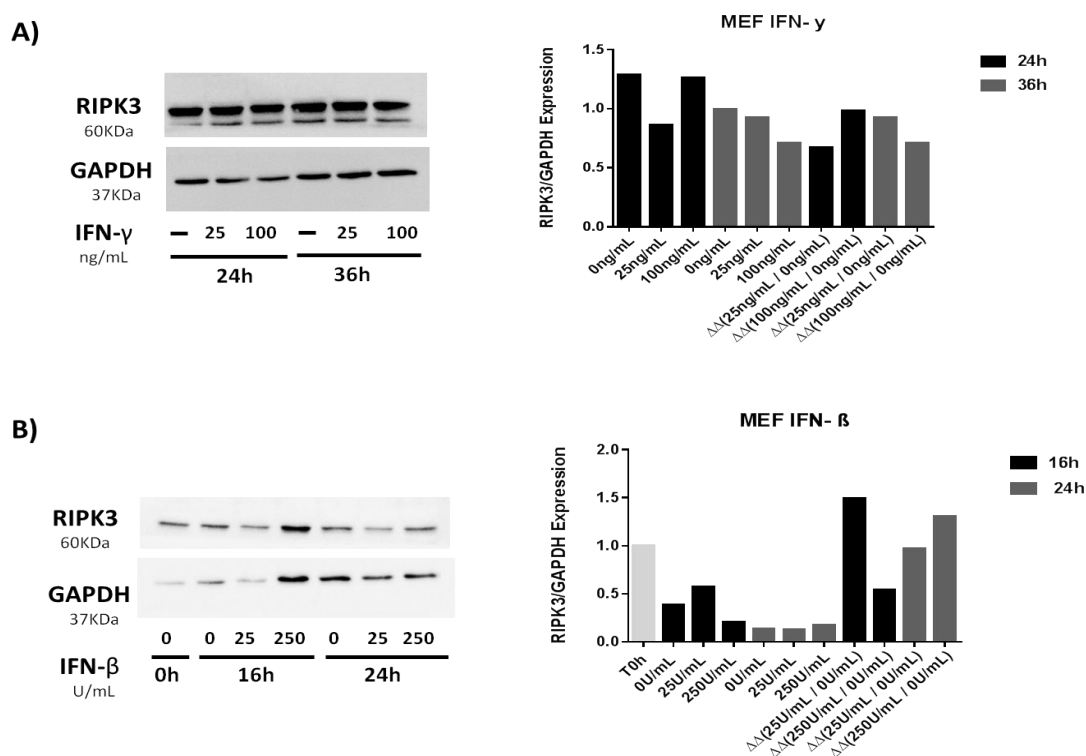
Após a corrida, o produto foi purificado e eluído em 30µL de tampão de eluição.

Após a biblioteca ser amplificada, o próximo passo foi prosseguir para *tapestation*, que nada mais é do que uma eletroforese capilar. A partir dos dados de nMol advindos da corrida da *tapestation*, as amostras foram agrupadas em quantidades equimolares e encaminhadas para o sequenciamento de nova geração, coletando >1M *reads* de leitura por amostra.

Apêndice 3. Modulação de *RIPK3* em resposta a IFN do tipo I e do tipo II

Os mesmos testes de indução de expressão realizados com *MLKL* também foram realizados com *RIPK3*, entretanto, para esta molécula os resultados não mostraram uma modulação tão acentuada quanto de *MLKL*. A figura abaixo ilustra a modulação de *RIPK3* mediante estímulos com IFN- γ e IFN-B em células MEF.

As células 3T3NIH não expressam *RIPK3* endogenamente, portanto não foi possível marcar *RIPK3* nestas células.

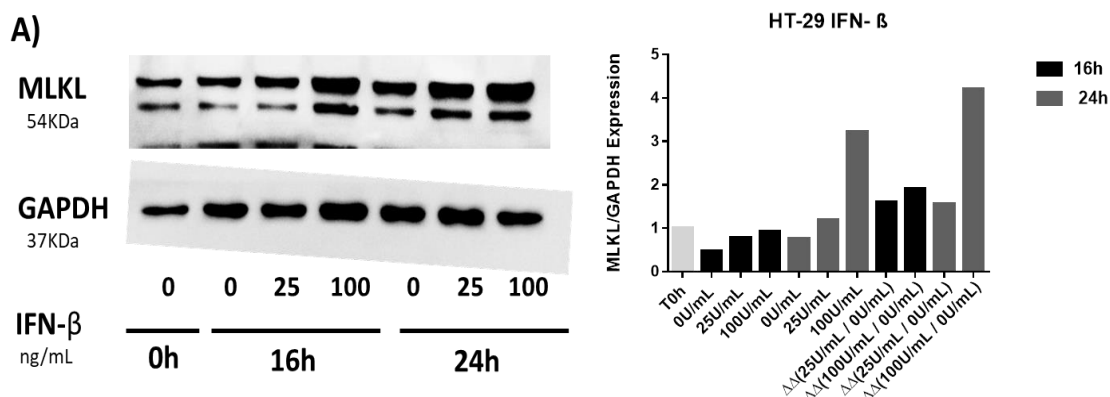


Análise por *western blot* da expressão de *RIPK3* no tempo 0h (T0h), e após 16h e/ou 24h e/ou 36h com e sem estímulo por IFN- γ (A) e IFN-B (B). A quantificação das bandas foi feita pelo *software* ImageLab. $\Delta\Delta$ representa a diferença de valor (*fold change*) entre as amostras estimuladas e não estimuladas no mesmo intervalo de tempo.

Figura 1. Expressão de *RIPK3* em MEF após estímulo por IFN- γ e IFN- β

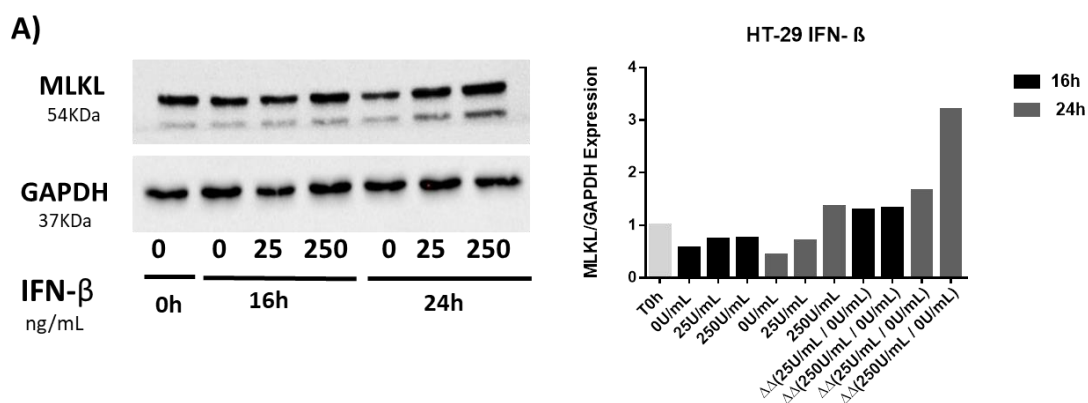
Após os testes pilotos em células murinas, testamos a célula humana HT-29 por também ser uma célula frequentemente reportada na literatura como sensível a estímulos necroptóticos. Estimulamos as células HT-29 com IFN- β (cat#PHC4244 GIBCO) e IFN- β (cat#11415-1 PBL assay), como pode ser observado nas figuras 6 e 7. Estas células mostraram um aumento de *MLKL* de aproximadamente 4,5x com o tratamento por 24h com 100ng/mL com o IFN- β (GIBCO) (Figura 2), e de 3x

com o tratamento de 250U/mL com IFN- β (PBL Assay) (Figura 3), no mesmo intervalo de tempo.



Análise por *western blot* da expressão de *MLKL* no tempo 0h (T0h), e após 16h e 24h com e sem estímulo por IFN- β (25 e 100U/mL). A quantificação das bandas foi feita pelo *software ImageLab*. $\Delta\Delta$ representa a diferença de valor (*fold change*) entre as amostras estimuladas e não estimuladas no mesmo intervalo de tempo.

Figura 2. Expressão de *MLKL* em HT-29 após estímulo por IFN- β (GIBCO)



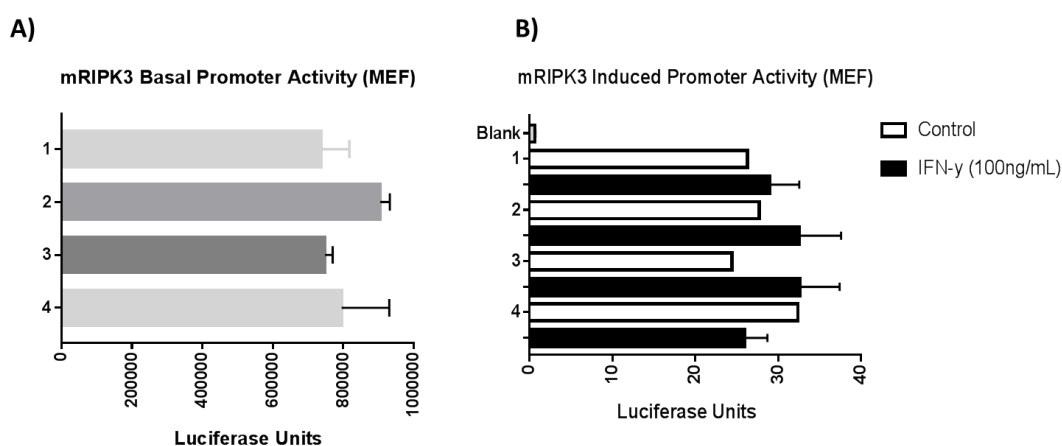
Análise por *western blot* da expressão de *MLKL* no tempo 0h (T0h), e após 16h e 24h com e sem estímulo por IFN- β (25 e 100U/mL). A quantificação das bandas foi feita pelo *software ImageLab*. $\Delta\Delta$ representa a diferença de valor (*fold change*) entre as amostras estimuladas e não estimuladas no mesmo intervalo de tempo.

Figura 3. Expressão de *MLKL* em HT-29 após estímulo por IFN- β (PBL Assay)

Mesmo que a indução de *MLKL* em células HT-29 tenham sido satisfatórias, a eficiência de transfecção nestas células foi muito baixa (~15%), e além disso, as clonagens do promotor predito de *hMLKL* apresentaram múltiplos problemas de mutação nos construtos gerados, mesmo repetindo o processo diversas vezes com uma enzima Taq Polimerase *High fidelity*.

Apêndice 4. Atividade promotora de RIPK3 murino (mRIPK3)

Na figura 1 (A) abaixo, é possível observar que para os quatro fragmentos clonados do promotor predito de *RIPK3* murino não houve diferença de atividade de luciferase entre eles. A figura 1 (B) apresenta os resultados de atividade de luciferase mediante estímulo com IFN- γ 100ng/mL, e nesta figura também é possível observar que não houve diferença de atividade entre os construtos mesmo quando induzido por IFN- γ .



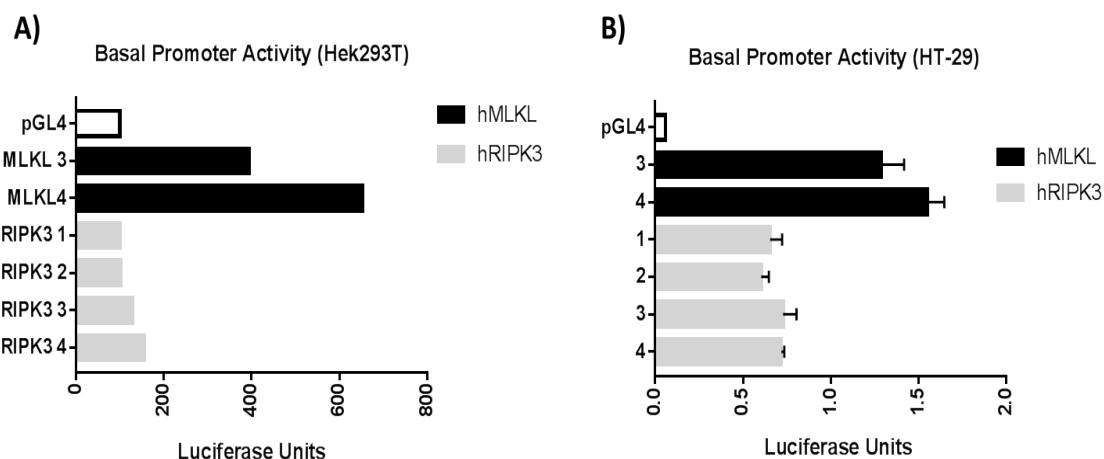
Níveis de luciferase representando a atividade promotora basal (A) e (B) induzida por IFN- γ (100ng/mL).

Figura 1. Atividade promotora de *RIPK3* murino

Essa falta de diferença de atividade entre os construtos pode estar relacionada ao fato de que não clonamos toda região do promotor que é ativado para expressão de níveis basais ou induzidos por IFN- γ de *RIPK3*.

Atividade promotora de *RIPK3* (hRIPK3) e *MLKL* humano (hMLKL)

Os construtos gerados para o promotor predito de *RIPK3* humano apresentaram resultados semelhantes ao murino, não tendo diferença na atividade de luciferase, tanto em células Hek293 **(A)** que têm uma excelente eficiência de transfecção, quanto em células HT-29 **(B)** como demonstrado na figura 2 abaixo (barras destacados em cinza no gráfico abaixo). Para hMLKL, como já foi explicado, não tivemos sucesso com a clonagem dos dois primeiros fragmentos do promotor predito. Para os dois construtos gerados, foi possível observar um aumento de atividade de luciferase do construto 3 para o construto 4 (Figura 2).

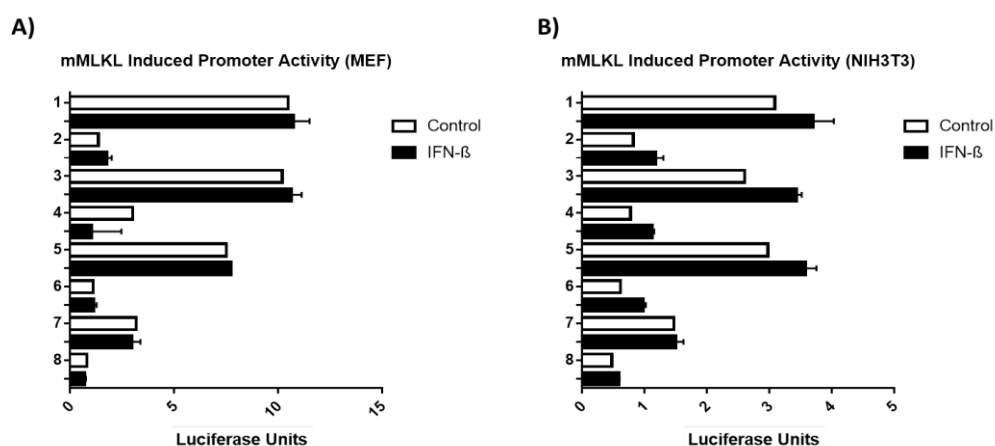


Níveis de luciferase em células (A) Hek293 e (B) HT-29 transfectadas com os construtos de *RIPK3* e *MLKL* humano. Barras pretas representam os níveis de luciferase de *hMLKL* e as cinzas de *hRIPK3*.

Figura 2. Atividade promotora de *RIPK3* e *MLKL* humano

Atividade promotora de *MLKL* murino mediante estímulo com IFN-B

Como já era esperado, a ativação do promotor pelo estímulo de IFN-B não se apresentou como promissor na ativação do mesmo, como pode-se observar na figura 3. Tanto células MEF quanto células 3T3NIH não apresentaram uma diferença entre a atividade basal e a atividade induzida. Desta forma, seguimos os experimentos utilizando apenas o IFN- γ .



Níveis de luciferase em células (A) MEF e (B) NIH3T3 após estimulação com IFN-b 25U/mL.

Figura 3. Atividade promotora de *MLKL* mediante IFN-b

Apêndice 5. Análise *in silico* dos fatores de transcrição associados ao promotor de MLKL

Tabela 1. Análise preditiva *in silico* dos fatores de transcrição que potencialmente se ligam aos promotores de MLKL humano e murino

Predição dos Fatores de Transcrição que se Ligam ao Promotor de MLKL São Comuns para Humano e Murino			
Família	Características da família	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>
FKHD	Forkhead domain factors	HNF3.01/FHXB.01	FKHRL1.01
NKXH	NKX homeodomain factors	NKX29.01/NKX25.04/NKX25.05 NKX25.01	NKX25.05
NR2F	Nuclear receptor subfamily 2 factors	TR2/R4.01	HNF4.02/HNF4.03
SF1F	Vertebrate steroidogenic factor	SF1.01/FTF.01	FTF.02
BRNF	Brn POU domain factors	BRN4.01	BRN4.01/BRN2.04
OCT1	Octamer binding protein	POU3F3.01	OCT1.03/OCT1.03/POU3F3.01
HBOX	Homeobox transcription factors	GBX2.01	VAX1.01/VAX1.01/EN1.01
PARF	PAR/bZIP family	HLF.01	DBP.01/HLF.01/TEF/HLF.01
PERO	Peroxisome proliferator-activated receptor	PPARG.03	PPARG.03
HNF1	Hepatic nuclear factor	HNF1.04/ HNF1.01/HMBOX.01/TECF2.01	HNF1.03
PLAG	Pleomorphic adenoma gene	PLAG1.02	PLAGL1.02
SORY	SOX/SRY-sex/testis determining and related HMG box factors	SOX7.01/SOX9.09/HBP1.02/SOX10.0 3/SOX9.04/SOX9.06	SOX7.03/SOX6.01/SOX3.01/SOX3.02/ HBP1.02
RXR	RXR heterodimer binding sites	THRB.03/THRB.01	THRA.01/THRB.03/RAR/RXR.01/VDR RXR.03/VDR/RXR.01
MZF1	Myeloid zinc finger factors	MZF1.02	MZF1.02/MZF1.01
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells	NFAT.01	NFAT5.01/NFAT5.02/NFAT.01
IRF	Interferon regulatory factors	IRF4.02	ISRE.01
ETSF	Human and murine ETS1 factors	ETV1.02/PDEF.01/SPI1.02/CETSIP54 .01/PEA3.01	SPIB.01/ERG.02/GABP.01/ELK1.01/ET S2.01/PDEF.01/ETV5.01/ETV1.02
GCMF	Chorion-specific transcription factors with a GCM DNA binding domain	GCM1.03	GCM1.03
CEBP	Ccaat/Enhancer binding protein	CEBPA.01/CEBPE.02/CEBP.02	CEBPA.01/CEBPE.02
BRAC	Brachyury gene, mesoderm developmental factor	BRACH.01/EOMES.02	MGA.01/MGA.01/TBX21.01
ZTRE	Zinc transcriptional regulatory element	ZTRE.03/ZTRE.04	ZTRE.03/ZTRE.01/ZTRE.04
XBBF	X-box binding factors	RFX4.02/MIF1.02	RFX1.02
AP1R	MAF and AP1 related factors	NFE2.01	MAFB.01/MAFK.01/MARE.02/VMAF.0 1
HAML	Human acute myelogenous leukemia factors	AML3.01	AML1.02
STEM	Motif composed of binding sites for pluripotency or stem cell factors	OCT3/4.01	OCT3/4.02
EGRF	EGR/nerve growth factor induced protein & related factors	CKROX.01	EGR3.01/EGR2.01
AHRR	AHR-arnt heterodimers and AHR-related factors	NXF/ARNT.01	AHRARNT.01/AHRARNT.03/NRF ARNT.01
P53F	p53 tumor suppressor	P53.05/TP63.01	P53.01/P53.07
HESF	Vertebrate homologues of enhancer of split complex	DEC1.01	BHLHB2.02
CREB	cAMP-responsive element binding proteins	C-JUN/ATF2.01/CREB.02/ATF6.02	ATF1.01/CREB3L2.01
NR2F	Nuclear receptor subfamily 2 factors	TR2/R4.01	HNF4.02/HNF4.03
BCL6	POZ domain zinc finger expressed in B-Cells	BCL6.03	BCL6.03/BCL6.04
AP1F	AP1, Activating protein	AP1.02/BATF.01	BATF.01
HOMF	Homeodomain transcription factors	HMX2.01/HMX3.01	HHEX.01/MSX.01/BARX2.01
ZF02	C2H2 zinc finger transcription factors	ZBTB7.03/ZKSCAN3.01	ZBTB7.01
KLFS	Kruppel like transcription factors	GKLF.01/BKLF.02/KLF12.01	BKLF.01/BKLF.02
SP1F	GC-Box factors SP1/GC	GC.01	SP4.02
MYOD	Myoblast determining factors	MYOD.01/TCFE2A.03	TCF21.01
MAZF	Myc associated zinc fingers	MAZR.01	MAZ.01
NGRE	"Negative" glucocorticoid response elements	IR2 NGRE.01	IR2 NGRE.01
ZBED	Zinc finger BED domain-containing protein	ZBED1.02	ZBED1.01
HAND	Twist subfamily of class B HLH transcription factors	LYZ1/12.01	TH1E47.01
HEAT	Heat shock factors	HSF2.03/HSF2.02/HSF1.04/ HSF1.04	HSF2.03

Destacado em negrito na coluna denominada famílias, encontram-se as famílias dos fatores de transcrição que têm pelo menos um fator de transcrição específico que é comum para ambas as espécies; a coluna seguinte corresponde a

características de cada família, seguidas pelas colunas que correspondem aos fatores de transcrição que pertencem a mesma família para humano e murino, respectivamente. O mesmo TF específico comum para ambas as espécies encontra-se também destacado em negrito. E por fim, destacado em azul encontram-se os TF específicos que possuem um *score* acima de 0.8 (considerado bom), e destacados em verde encontram-se os TF que possuem um *score* acima de 0.9 (considerado muito bom/ótimo), os fatores de transcrição que possuem *score* abaixo de 0.8 não foram destacados.

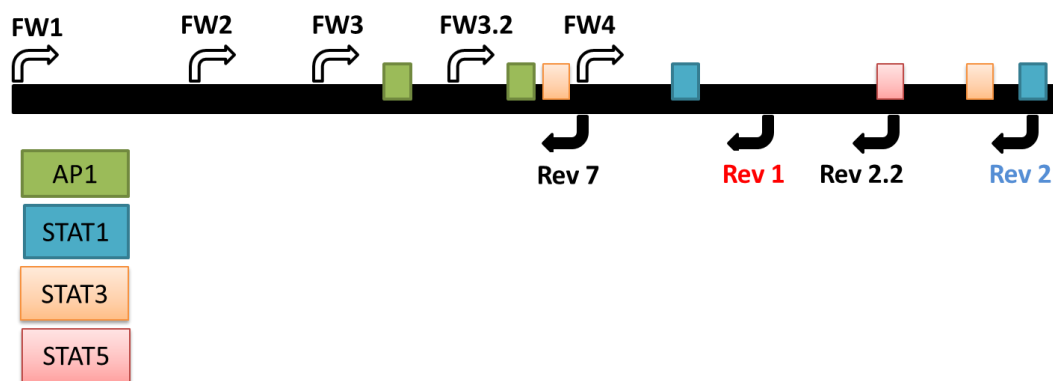


Figura 1. Principais fatores de transcrição candidatos a terem uma participação importante na regulação da atividade do promotor de MLKL e suas posições de ligação ao mesmo relativas aos *primers* utilizados para a amplificação desta região