

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Interações regulatórias entre o fator de transcrição E2F2 e
seus genes alvos

Patrícia Girardelo Trentin

Pelotas, 2013

Patrícia Girardelo Trentin

**Interações regulatórias entre o fator de transcrição E2F2 e seus genes
alvos**

Trabalho acadêmico apresentado ao
Curso de Graduação em
Biotecnologia da Universidade
Federal de Pelotas, como requisito
parcial à obtenção do título de
Biotecnologista.

Orientador Acadêmico: Dr. Vinicius Farias Campos

Orientadora de Estágio: Dra. Ana Maria Zubiaga

Pelotas, 2013

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

T795i Trentin, Patrícia Girardelo

Interações regulatórias entre o fator de transcrição e2f2 e seus genes alvos. / Patrícia Girardelo Trentin ; Vinicius Farias Campos, Ana Maria Zubiaga, orientadores. — Pelotas, 2013.

56 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — —Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2013.

1. Ciclo celular. 2. Expressão gênica. 3. Tet-on. I. Campos, Vinicius Farias, orient. II. Zubiaga, Ana Maria, orient. III. Título.

CDD : 574.87

Patrícia Girardelo Trentin

**Interações regulatórias entre o fator de transcrição E2F2 e seus genes
alvos**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Pelotas, 17 de dezembro de 2013.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Vinicius Farias Campos (Orientador)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr^a. Helena Strelow Thurow
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr^a. Priscila Marques Moura de Leon
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

**Dedico este trabalho aos meus pais e
irmãos.**

Agradecimentos

Aos meus pais, Arcindo Trentin e Rosali Trentin pelo apoio, confiança, incentivo, críticas e dedicação.

Aos meus irmãos, Jeferson Trentin e Adriana Trentin pelo incentivo e conselhos.

Aos colegas de graduação pelos momentos compartilhados durante o período.

Aos amigos pelo incentivo, apoio e críticas, em especial a Paulo de Abreu, Larissa Rosa, Sheila Nagamatsu e Fernando Alvez.

À Ana Maria Zubiaga, minha orientadora de estágio, por me oportunizar a realização do estágio, pela orientação, dedicação, apoio e críticas.

À Vinicius Farias Campos, meu orientador acadêmico, pela paciência e orientação.

Ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas pelos aprendizados durante os minha vida acadêmica.

À equipe do Laboratório de Genética da Facultad de Ciencia y Tecnologia da Univerdad del País Vasco (Espanha), pela amizade, paciência e ensinamentos.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela oportunidade do intercambio através do programa Ciência sem Fronteiras, período em que realizei meu estágio obrigatório.

Muito obrigada.

"A dúvida é o principio da sabedoria".

(Aristóteles)

RESUMO

TRENTIN, Patrícia Girardelo. **Interações regulatórias entre o fator de transcrição E2F2 e seus genes alvos.** 2013. 48f. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Fatores de transcrição E2F controlam diversos processos biológicos essenciais através da regulação da expressão de genes alvo, implicados na progressão do ciclo celular, da apoptose, e da diferenciação celular. No entanto, o mecanismo pelo qual esta regulação é estabelecida, a interação proteína-proteína que são consideradas moduladoras da atividade de E2F, e a contribuição relativa de cada membro da família E2F ainda são mal definidos. Por isso, neste trabalho é revisado o conhecimento atual sobre a expressão de E2Fs, as abordagens tecnológicas empregadas para estudo e a sua contribuição para o desenvolvimento de doenças humanas, como o câncer. Além disso, é focado estudos realizados com o membro E2F2 que tem permitido demonstrar seu papel crítico na homeostase celular, mesmo sua real função ainda não estar esclarecida. Para identificar o conjunto completo genes alvo de E2F2, e para obter uma maior compreensão do papel da E2F2 na regulação da transcrição, investigamos o papel de E2F2 na expressão gênica. Desse modo, o estudo analisou a função do gene E2F2, por inativação do gene em camundongos mediante genotipagem do alelo knockout para isolamento celular e expressão induzida em células U2OS (células de osteosarcoma humano) contendo o sistema de expressão induzida Tet-on, examinando a regulação da expressão de alvos transcripcionais. Os resultados obtidos sugeriram que E2F2 atua como ativador da transcrição dos genes ciclina E e Chk-1.

Palabras clave: família E2F, ciclo celular, expressão gênica, Tet-on

ABSTRACT

TRENTIN, Patrícia Girardelo. **Interações regulatórias entre o fator de transcrição E2F2 e seus genes alvos.** 2013. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

E2F transcription factors control diverse essential biological processes through regulation of target gene expression, implicate in cell cycle progression, apoptosis, and cell differentiation. However, the mechanism by which this regulation is established, the protein-protein interactions are thought to be key modulators of E2F activity and the relative contribution of each E2F member are still poorly defined. Therefore, in this job is reviewed the current knowledge about E2Fs expression, the technology approaches employed to study and their contribution to the development of human diseases, such as cancer. Furthermore, it is focused on studies realized with E2F2 member that has permitted to demonstrate their critical role in cellular homeostasis, even its real function is not yet clear. To identify the full set of E2F2 target genes, and to gain further understanding of the role of E2F2 in transcriptional regulation, we investigated the role of E2F2 in gene expression. Thus, the study analyzed the function of E2F2 gene, by gene inactivation in mice through genotyping allele knockout for cell isolation, and induced expression in U2OS cells (human osteosarcoma cells) containing the Tet-on system induced expression, examining the regulation of expression of transcriptional targets. The results suggest that E2F2 functions as transcriptional modulate of genes Cyclin-E and Chk-1.

Key words: E2F family, cell cycle, gene expression, Tet-on

Lista de figuras

Figura 1. A expressão dos membros da família E2F durante o ciclo celular....	19
Figura 2. Organização de domínio de ativação, repressão ou inibição dos E2Fs.....	22
Figura 3. Protótipo da regulação da atividade de E2Fs.....	23
Figura 4. Representação esquemática da atividade dos fatores de transcrição dos subgrupos E2F.	28
Figura 5. Modelo da atividade dos fatores de transcrição E2F na proliferação celular e na apoptose.	29
Figura 6. (A) Laboratório de Genética da (B) Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidad del País Vasco.	34
Figura 7. Mapa do exóm 3	36
Figura 8. O sistema Tet-On.....	37
Figura 9. Mapa do vetor pTRE-Myc onde se clonou o gene E2f2.....	38
Figura 10. Genotipo de uma prole de camundongos.	41
Figura 11. A)Western blotting de células U2OS-pTRE-Myc-E2F2 expressando E2F2, B) Análise da densidade óptica.....	42
Figura 12. Western blotting e densidade óptica de células expressando E2F2 trás a adição de DOX	43
Figura 13. Análise da densidade óptica dos genes A) Ciclina E e B) Chk-1.	44

Lista de Tabelas

- Tabela 1. Efeitos na inativação de E2F (individual e compartilhado) 20
- Tabela 2. E2F genes alvos identificados e agrupados conforme sua função.. 26

Lista de Abreviaturas e Siglas

BSA - Método de Bradford

CDK - Ciclina dependente de kinase

CO₂ - Dióxido de carbono

CycA - Ciclina A

DBD - Domínio de ligação ao DNA

DNA - Acido Desoxirribonucleico

DOX - Antibiótico Doxiciclina

DP - Proteína parceira de dimerização

E2F - Família de fatores de transcrição E2F

E2F2 - Membro da família E2F

FBS - Soro Fetal Bovino

LZ - Zipper de leucina

MB - Domínios de caixa marcados

NES - Sinais de exportação nuclear bipartido

NLS - Sinal localização nuclear,

PBS - Tampão fosfato salino

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pRb - Protótipo supressor tumoral

RB - Proteínas de retinoblastoma

TTBS – Tampão tris salino acrescido de 0.1% de tween 20

U2OS - Células de osteosarcoma humano

UV – Ultravioleta

Sumário

1.Introdução.....	14
1.1Hipótese.....	15
1.2 Objetivo geral.....	16
1.2.1 Objetivos específicos	16
2.Revisão Bibliográfica	17
2.1 Família E2F	17
2.1.1 Classificação.....	17
2.1.2 Estrutura e organização.....	21
2.1.3 Regulação da atividade de E2F.....	22
2.1.4 Regulação de gene alvo	24
2.1.5 Investigações sobre genes alvo.....	25
2.1.6 Controle da atividade de E2F	26
2.1.7 Via Rb-E2F: proliferação, diferenciação e apoptose.....	28
2.2Gene E2F2	31
3.Metodologia	34
3.1 Manutenção de camundongos.....	35
3.2 Extração de DNA	35
3.3 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	35

3.4 Eletroforese	36
3.5 Sistema de expressão	37
3.6 Cultivo celular	37
3.7 Indução da expressão de E2F2	38
3.8 Quantificação de proteínas	39
3.9 Western blot.....	39
4.Resultados e Discussão	40
4.1 Genotipagem de camundongos portadores de mutação inativadora do gene E2F2	40
4.2 Expressão induzida de E2F2 em células	41
5. Conclusão.....	45
6. Considerações finais.....	47
7.Referencias.....	49

1. Introdução

A descoberta dos mecanismos de regulação da transcrição gênica em eucariotos nos anos 80 deu origem a várias pesquisas neste campo para tentar esclarecer os processos envolvidos com a regulação da transcrição. A regulação transcricional possui um papel crucial no controle e diferenciação de células eucarióticas, influenciando diretamente alguns fenômenos biológicos tais como crescimento, resposta a mudança ambiental, desenvolvimento de organismos multicelulares e doenças.

Segundo Sayers et al. (2008), no Pubmed, base de dados onde as publicações dos artigos científicos biomédicos são divulgadas, os trabalhos em regulação gênica têm ocupado um espaço cada vez maior. No período de 1980 a 1989, dos cerca de 3 milhões de artigos científicos publicados, cerca de 12 mil (0,4%) deles eram sobre regulação gênica. De 2000 a 2007 foram publicados cerca de 90 mil artigos científicos sobre regulação gênica, o que representa aproximadamente 1,8% do total de artigos publicados nesse período, havendo um aumento de aproximadamente 225 % no número de artigos sobre regulação gênica em relação à década de 80. Esses resultados sugerem, portanto, que o interesse sobre regulação gênica vem aumentando (ALMEIDA, et al., 2009).

A família E2F de fatores de transcrição é mais conhecida por regular genes envolvidos no controle do ciclo celular, proliferação celular, e apoptose

(BIYASHEV, 2011), por meio da expressão de genes essenciais para a transição de G1 para S e de iniciação de replicação do DNA (IAQUINTA, 2007). No início dos estudos *in vitro* com E2F, se gerou expectativas de que por meio da classificação tradicional dos membros da família E2F em ativadores (E2F1 - E2F3) e repressores (E2F4 - E2F8), poderia ser possível fazer previsões precisas sobre a sua contribuição na carcinogênese humana, como por exemplo, o comportamento esperado dos membros repressores para a função de supressor tumoral. No entanto, estudos *in vivo* têm enfraquecido o entusiasmo inicial, já que a função da família e de cada membro parece ser mais complexa (CHEN, 2009).

Apesar de se estudar os fatores E2F por mais de uma década, ainda se desconhece em sua maior parte as funções únicas e compartilhadas de cada um dos membros da família. Para desenvolver um estudo sobre a função dos membros E2F, foram empregadas diversas propostas experimentais, como os estudos de ganho de função (sobrexpressão) e os de perda de função (inativação mediante tecnologia *knockout*). No entanto, os resultados obtidos têm sido em ocasiões contraditórios, possivelmente devido a efeitos compensatórios entre os diferentes membros da família E2F.

Pesquisas sobre o mecanismo pelo qual o E2F2 regula sua função ainda não estão estabelecidas, nem a sua contribuição relativa ao ciclo celular não estão bem definidos. Por isso, foi investigado o papel de E2F2 na regulação do ciclo celular através da análise de um conjunto de genes transcritos por E2F2 a fim de identificar o conjunto completo de genes alvo de E2F2, e para obter uma maior compreensão da papel de E2F2 na regulação transcricional.

No laboratório de Genética do departamento de Genética, Antropologia Física e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciência e tecnologia da Universidad del País Vasco é estudado a regulação e função do gene E2F2.

1.1 Hipótese

Para definir o mecanismo de ação de E2F2, é indispensável empregar abordagens experimentais em que se inative ou se incremente sua expressão,

com objeto de identificar os alvos transcricionais específicos de E2F2, implicados na manutenção da quiescência e da saída desde a fase G0 até a fase G1 e estabelecer assim sua contribuição à regulação da proliferação celular.

1.2 Objetivo geral

Estudar a função do fator de transcrição E2F2 mediante o emprego de células com sobreexpressão induzida ou com inativação do gene.

1.2.1 Objetivos específicos

a) Identificação de camundongos portadores de uma mutação inativadora de E2F2 (*knockout*), mediante a genotipagem do alelo *knockout*, como primeiro passo para a obtenção de células carentes do alelo funcional de E2F2.

b) Geração de células que expressam de maneira induzida o fator de transcrição E2F2.

c) Análise da regulação da expressão de seus alvos gênicos nestas células.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Família E2F

Desde a sua descoberta, a família E2F de fatores de transcrição tanto fascinou como confundiu os pesquisadores. O que começou como um simples modelo de regulação positiva de genes necessários para a síntese de DNA por E2F se expandiu acentuadamente. E2F, agora, tem emergido como regulador celular pleiotrópico, controlando diretamente funções constrictantes, como a proliferação, a apoptose, a diferenciação, as respostas a danos no DNA e a reparação do DNA, o desenvolvimento, a senescência e a autofagia (HAZARETHINAM, 2011; DEGREGORI, 2004). Além disso, são também E2Fs indiretamente envolvidos na patogênese de vários cânceres humanos independentes de controle do ciclo celular (CHEN, 2009).

2.1.1 Classificação

E2F foi identificada como um fator celular necessário para a ativação do promotor viral E2 (NEVINS, 1998; ERB, et al, 2005). Este fator foi posteriormente clonado e nomeado E2F1 (SEREWKO, M.M. et al., 2002). No entanto, foi reconhecido que E2F1 era apenas um membro, do que é hoje, uma

família de oito membros, E2Fs 1-8, que codifica para 10 formas diferentes (HAZAR-RETHINAM, et al., 2011).

Com base em sua atividade transcricional, estes oito membros foram divididos em três subgrupos, demonstrando que esta família de fatores de transcrição é crucial para o controle da proliferação celular. Abaixo segue a classificação.

a) ativadores (E1F1, E2F2, E2F3-a): se expressam de maneira regulada com níveis máximos observados ao final da fase G1 e ao início da fase S, sua função principal parece ser de ativar a transcrição de seus alvos implicadas na replicação de DNA e na entrada na fase S, promovendo a progressão do ciclo celular; (DEGREGORI, 2006; XANTHOULIS, 2013)

b) repressores (E2F3-b, E2F4, E2F5, E2F6): se expressam de maneira constitutiva com atividade constante durante todo o ciclo celular. Recrutam ativamente inibidores de transcrição, se ligam a promotores de genes-alvo durante G0 para prevenir transcrição promíscua de genes de proliferação, e promovem a manutenção da quiescência e/ou a diferenciação terminal (ATTWOOLL, 2004; HAZAR-RETHINAM, 2011).

c) inibidores (E2F7, E2F8): se expressam de maneira regulada, apresentam atividade durante todo o ciclo celular com pico na fase S. Sua função parece ser determinada pela competição por sítios de ligação com outros E2Fs, e mediante a inibição da ligação por exclusão dos demais E2Fs (ativadores ou repressores) do sitio de ligação, assim inibindo a transcrição de genes alvos, promovendo a saída do ciclo celular e a apoptose e prevenindo a replicação de DNA ectópico (IAQUINTA, 2007; HAZAR-RETHINAM, 2011).

Conforme ilustrado na figura 1, em células quiescentes (G0), E2F4 e E2F5 se expressam ubiquamente para manter a repressão dos genes que respondem a promotores E2Fs na entrada da fase G1 do ciclo celular. Na estimulação mitogênica, ocorre o acúmulo livre de recém-sintetizado E2F1, E2F2 e E2F3 ao final da fase G1. Juntos, esses eventos iniciam um programa de transcrição celular e de condução a fase S (replicação de DNA marcada com linha pontilhada). Este transcriptoma G1/S-específico é atenuado após a

conclusão da fase S em G2 pela ação dos inibidores E2F7 e E2F8, e o repressor E2F6.

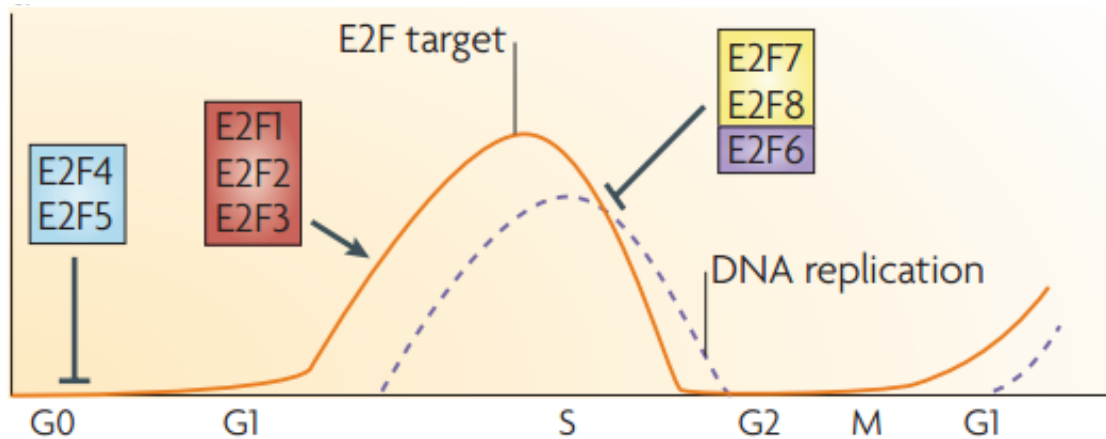


Figura 1. A expressão dos membros da família E2F durante o ciclo celular.

Fonte: CHEN, 2009, pg. 789

A classificação acima mencionada se baseia em resultados de estudos *in vitro*, sendo considerada simplista, uma vez que não reflete com precisão a dinâmica de E2F no controle transcricional (DEGREGORI, 2006; XANTHOULIS, 2013) Por isso, nos últimos anos, as atividades dos E2F tem sido exploradas em diferentes ambientes fisiológicos independentes para o controle da proliferação celular e identificação das funções únicas e compartilhadas de cada um dos membros. No entanto, os resultados produzidos foram inconsistentes com que foi definido por ensaios *in vitro* e cultura de células (CHEN, 2009).

Na tabela 1 são apontados os genótipos já investigados em camundongos E2Fs *knockouts* e cultura de células, comprovando a partir dos fenótipos que os diferentes membros da família E2F possuem funções originais durante o desenvolvimento, homeostase do tecido e formação de tumor, além de sobreposição de funções no controle da progressão do ciclo celular (ATTWOOLL, 2004).

Tabela 1. Efeitos na inativação de E2F (individual e compartilhado)

Genótipo	Função específica	Efeito em camundongos	Efeito em células <i>ex vivo</i>
E2F1 -/-	Apoptose	Predisposição a tumorigenese em diferentes tecidos, defeito no timo, atrofia testicular	Redução da proliferação de células T
E2F2 -/-		Desenvolvimento de doenças autoimunes e defeitos hematopoiéticos	Aumento da proliferação de células T
E2F3 -/-	Reprimir promotor ARF permitindo a proliferação	Letalidade embrionária parcial	Reduz entrada na fase S
E2F4 -/-	Maturação de eritrócitos	Letalidade neonatal devido ao aumento da susceptibilidade a infecções oportunistas. Defeitos hematopoiético, craniofacial e intestinal	Nenhum efeito evidente sobre proliferação
E2F5 -/-	Desenvolvimento cerebral	Desenvolvimento de hidrocefalia após o nascimento	Nenhum efeito evidente sobre proliferação
E2F6 -/-		Vida normal com transformações homeóticas do esqueleto axial	
E2F1 -/- E2F2 -/-		Desenvolvimento de insuficiência pancreática exócrina e diabetes	Aumento da proliferação de células T
E2F1 -/ E2F2 -/ E2F3 -/		Letalidade embrionária sem perturbações óbvias na proliferação celular	Reduz expressão de genes alvos
E2F4 -/ E2F5 -/		Letalidade embrionária	
E2F7 -/ E2F8 -/		Letal embrionário, com apoptose disseminada e dilatação vascular	

Desse modo, o estudo do papel *in vivo* dos E2Fs tem sido desafiador por três principais obstáculos iminente a compreensão completa de suas funções. Em primeiro lugar, existe um elevado grau de redundância funcional entre os membros da família, por isso ainda não está clara a função exata de cada membro. Em segundo lugar, existe um antagonismo funcional entre a ativação de E2F mediada por repressão na regulação da proliferação de células normais. Em terceiro lugar, os membros desta família têm a capacidade de regular a expressão um dos outros, formando laços de retroalimentação complexos para assegurar um equilíbrio entre ativadores e repressores em cada fase do ciclo celular (XANTHOULIS, 2013; CHEN, 2009).

2.1.2 Estrutura e organização

A maior homologia entre os diferentes membros desta família é observada no domínio de ligação ao DNA (DBD) (figura 2), região conservada que liga os promotores alvo para regular a sua expressão (KOVESDI, 1986). Na figura 2 se observa que os membros E2F1 - 6 possuem domínio DBD, seguido de um zipper de leucina (LZ) e domínios de caixa marcados (MB). LZ e MB são responsáveis por mediar a heterodimerização entre E2F e DP (proteína parceira de dimerização - DP1, DP2 e DP3) a fim de formar fatores de transcrição funcionais, que podem ligar-se ao DNA com elevada afinidade (XANTHOULIS, 2013). O papel das subunidades DP não está completamente elucidado e se sugere que a função do heterodímero E2F-DP é ditada pela subunidade E2F (MILTON, et al., 2006)

Em contraste, o DBD apresenta-se duplicado em E2F 7-8 e ligam promotores de genes alvo a um DP independente, devido à falta de um domínio de ligação a DP (HAZAR-RETHINAM, et al., 2011; CHEN, 2009)

E2F1-3 expressos, possuem sinais de localização nuclear (NLS) adjacentes ao domínio de ligação a ciclina A (*cycA*). Isso garante a sua passagem para o núcleo, modulando assim a atividade de E2F em células de forma ciclo - dependente (MAGAE, et al., 1996). E2F4 e E2F5 possuem sinais de exportação nuclear bipartido (NES), que medeiam a sua exportação do compartimento citoplasmático e contam com a heterodimerização com uma das proteínas DP para a sua translocação para o núcleo da célula (VERONA R. et AL., 1997) Os membros E2F1-5 possuem domínio de transativação na região de ligação à proteína RB (proteína de retinoblastoma). Ao passo que E2F6-8 carecem de domínios de transativação reconhecíveis (XANTHOULIS, 2013).

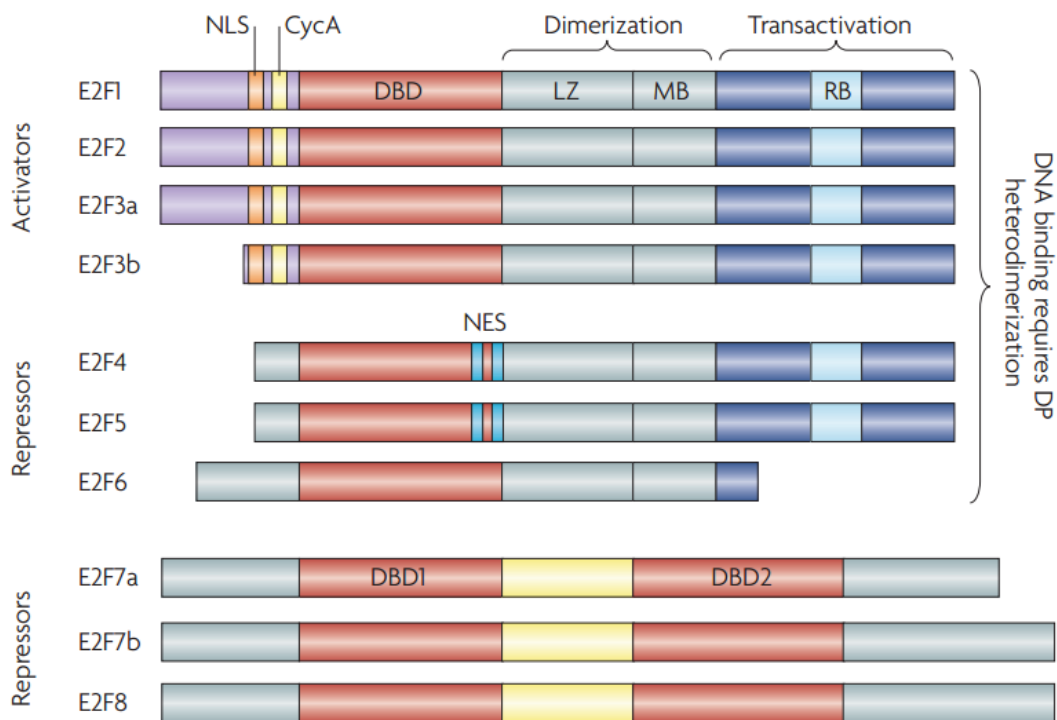


Figura 2. Organização de domínio de ativação, repressão ou inibição dos E2Fs.

Caixas de mesma cor indicam regiões homólogas. Sinal localização nuclear (NLS), Ciclina A (cycA), Domínio de ligação ao DNA (DBD), Sinais de exportação nuclear bipartido (NES), Zipper de leucina (LZ), Domínios de caixa marcados (MB), Proteína de Retinoblastoma (RB).

Fonte: CHEN, 2009, pg. 789

2.1.3 Regulação da atividade de E2F

A atividade dos E2Fs está implicada no controle do crescimento e da diferenciação celular, ao regular de maneira coordenada a expressão de um grande grupo de genes necessários para a transição de G1 a S e G2 a M no ciclo celular (SWISS, 2011). Assim, a progressão do ciclo celular é dependente da regulação temporal e espacial de diversos membros da família E2F (LU, et al., 2012) que, por sua vez, dependem de sua dimerização com a proteína DP, assim como de sua capacidade de interação com membros da família RB de proteínas de retinoblastoma (pRb, p107 o p130) (SWISS, 2011).

Segundo o modelo comumente aceito de regulação do ciclo celular ilustrado na figura 3, a proteína RB controla negativamente o ciclo celular na fase G1, permanecendo desfosforilada e ligada ao fator E2F. Enquanto a proteína da RB permanecer desfosforilada, a célula restringe o crescimento celular bloqueando a progressão e comprometimento a fase S.

Conforme o ciclo celular avança e a célula progride rumo à transição G1/S, como exemplo, a pRb é fosforilada pela CDK4 e CDK6, liberando o fator E2F. Logo, E2F estimula a transcrição de genes envolvidos na progressão do ciclo celular, entre eles o gene ciclina E, e genes requeridos para a síntese de nucleotídeos e de DNA polimerase. Durante as fases S, G2 e mitose, a pRb é mantida fosforilada, e somente após a mitose, quando os níveis de ciclina/CDK ficam muito reduzidos, ela volta ao seu estado desfosforilada.

Deste modo, a expressão de genes alvo de E2F se encontra reprimida durante a quiescência celular devido à interação de E2F e DP com as proteínas de RB (INFANTE, et al. 2008). A estimulação de células em repouso com os fatores de crescimento, induz a formação de uma cascata de sinalização que leva à ativação do complexo ciclina/CDK a conduzir a uma hiperfosforilação de RB, com sua consequente perda de afinidade por E2F (VIGO, et al. 1999). Como consequência, E2F fica livre e pode, então, ativar a expressão de genes alvos como representado na figura 3.

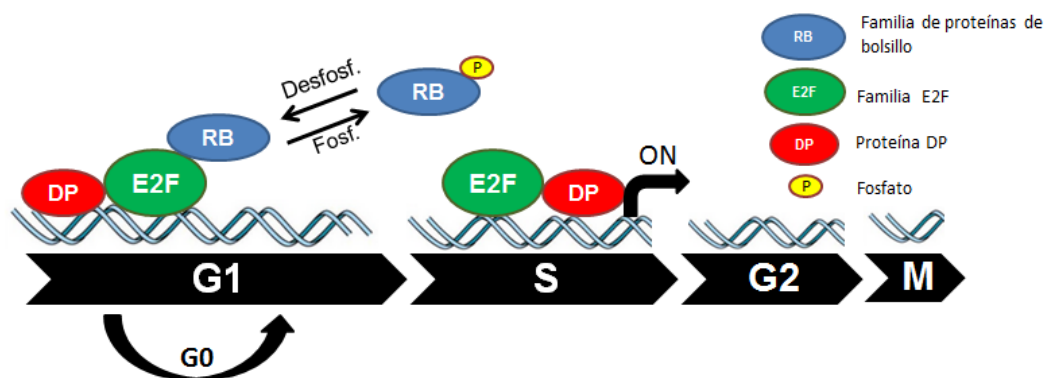


Figura 3. Protótipo da regulação da atividade de E2Fs.

A fosforilação de pRb pela ciclina D/CDK4 e ciclina E/CDK2, na fase final de G1, libera fatores de transcrição E2F, promovendo com isso a expressão de genes relacionados com a síntese de DNA e a progressão do ciclo celular, resultando na proliferação celular. A dissociação de E2F da proteína pRb parece ser o determinante principal na regulação da proliferação celular, permitindo a transativação de genes tais como ciclina A, ciclina E, c-myb, cdc2, PCNA y timidina quinase, com que as células se comprometem a entrar na fase S (DEGREGORI, 2002).

E2F1-3 se ligam preferencialmente pRb, quando pRb se encontra na sua forma hipofosforilada, E2F4 pode ligar-se a qualquer uma das proteínas de retinoblastoma, mas é regulada principalmente por p107 e p130, ao passo que

E2F5 se associa predominantemente com p130. E2F6-8 são distintos e presume-se que reprimem os genes que respondem a E2F independentemente de proteínas RB (DYSON, 1998; ATTWOOLL, 2004; XANTHOULIS, 2013).

Geralmente, quando RB é hipofosforilada, ela pode associar e bloquear a atividade transcricional de heterodímeros E2F- DP mascarando o domínio de ativação da transcrição de E2Fs, tornando-os inativos (repressão passiva) (DEGREGORI, 2006). Além disso, o complexo proteico RB-E2F-DP é orientado para os sítios E2F de ligação onde ele pode recrutar enzimas que reprimem a transcrição pela remodelação do nucleossoma (repressão ativa) (FERREIRA, et al., 2001) .

2.1.4 Regulação de gene alvo

Historicamente, a capacidade de E2F para regular o ciclo celular é colocado como o papel central do controle da expressão de genes essenciais para a manutenção e viabilidade celular. Desse modo, investigou-se que os membros da família E2F são capazes de regular subconjuntos de genes distintos e sobrepostos (CHEN, 2011). Por exemplo, tanto E2F1 e E2F3 são necessários para entrada do ciclo celular, mas apenas E2F3 é necessário para a proliferação celular contínua, e a perda combinada de E2F1, E2F2 e E2F3 abole completamente a capacidade das células para o progresso através do ciclo celular e proliferação (POLAGER, 2008), como mostrado na tabela 1.

Enquanto a maioria dos genes/promotores alvos de E2F são regulados por vários dos E2Fs, alguns genes/promotores são regulados por E2Fs específicos (ATTWOOLL, 2004). Por exemplo, tem sido demonstrado que E2F1 se liga e reprime o promotor Mcl-1, contribuindo para a apoptose, enquanto que E2F4 é incapaz de se vincular a este promotor (CROXTON, et al., 2002). Isso sugere que cada um dos E2Fs possui funções únicas e deve efetua-las por introdução de níveis de especificidade.

A especificidade do alvo é efetuada através da ligação com sítios específicos de reconhecimento, como as proteínas DP (ATTWOOLL, 2004). Embora isto possa refletir diferenças no sítio de ligação e afinidade entre os

E2Fs, também pode haver regulação, em certa medida, pela composição das subunidades do complexo de E2F/DP. Por exemplo, E2F4/DP1 apresenta diferentes especificidades do sítio de ligação ao DNA, que E2F4/DP2, E2F1/DP1, E2F1/DP2 ou E2F1/DP1 (TAO, et al, 1997), mostraram que existe alguma especificidade da seleção para os promotores alvo.

Análise do efeito da perda de proteínas DP, no entanto, poderia proporcionar um sistema mais simples para estudar os efeitos da perda da atividade de E2F. Contudo, ambos os E2Fs ativadores (1-3a) e os E2Fs repressores (3b-6) precisam dimerizar-se com DP1 ou DP2 para ligar-se ao DNA. Portanto, o resultado da perda de DP1/2 acabaria por abalar toda a atividade E2F de cromatina, com exceção de E2F7 (ATTWOOLL, 2004).

2.1.5 Investigações sobre genes alvo

Como as mudanças na expressão gênica refletem direta e indiretamente nas atividades dos fatores de transcrição, vários laboratórios têm despendido esforços consideráveis para revelar a gama completa de funções e genes alvos regulados por E2F, baseado-se em tecnologia como chip (imunoprecipitação da cromatina) e expressão gênica global incluindo gene de microRNA). Esta abordagem levou à identificação de muitos genes que respondem a E2F além daqueles envolvidos na proliferação e apoptose, incluindo os genes que participam em processos biológicos tão diversos como a diferenciação celular, metabolismo e desenvolvimento do animal. (WELLS, et al., 2000; CHEN, 2011). Genes-alvo E2F identificados estão listados na tabela 2 conforme a sua função.

Embora sejam, sem dúvida, intrigantes, a maioria destes resultados foram obtidos utilizando sistemas de cultura de células. Se as redes de transcrição identificados envolvendo E2Fs refletem suas reais funções fisiológicas *in vivo*, isso continua a ser determinado. Além disso, estes estudos têm a proposta de distinguido alvos únicos que são regulados exclusivamente por um indivíduo membros da família E2F dos alvos que são co-regulado por vários membros (CHEN, 2011).

Tabela 2. E2F genes alvos identificados e agrupados conforme sua função

Reguladores do ciclo celular G1/S	Síntese de Nucleotídeos	Replicação de DNA
Ciclina A	Timidina kinase (tk)	PCNA
Ciclina E	Timidilato sintase (ts)	Histona H2A
B-myc	Ribonucleotideo redutase	DNA ligase
Cdk2	Dihidrofolato redutase	Cdc6
Cdc25a	(DHFR)	Topoisomerase II
Inibidores do ciclo celular G1/S	Reguladores do ciclo celular G2/M	Reguladores de checagem G2/M
P21	Ciclina B1, B2	Bud1
P18Ink4c	Ki-67	Cdc20
P19In4d	Estatimina	RanBP1
Reparo de DNA	Desenvolvimento	Apoptose
Brca1	TGF	P73
Rad51	Homeobox A10, A9, A13	ARF
Uracila-DNA glicosilase	Enhancer de zeste	Apaf-1

2.1.6 Controle da atividade de E2F

A atividade transcricional de E2F pode ser modulada por mecanismos múltiplos, sendo a melhor conhecida a interação com o Rb (POLAGER, 2008). Historicamente, as pesquisas focam na regulação de RB sobre E2F, fato que colocou RB em relevância.

Estudos, bioquímicos e genéticos, têm mostrado que Rb é uma proteína multidimensional com múltiplos parceiros de ligação que estão envolvidas em diversas funções fisiológicas. A regulação da transcrição de genes surgiu como função mais popular da Rb. Esta regulação é exercida tanto por interagir diretamente com fatores de transcrição e também por recrutar co-repressores/ativadores para sequências específicas de fatores de transcrição, influenciando ainda mais a expressão de genes (TALLURI, 2012).

A Rb pode se associar a uma série de proteínas que regulam a estrutura da cromatina e a transcrição nos promotores que respondem a E2F. Isto sugere que Rb é recrutado para promotor de sequências específicas de fatores de transcrição como E2Fs. Por sua vez, RB recruta co-repressores a estes

promotores, que pode remodelar a cromatina em regiões vizinhas para silenciar a transcrição. A capacidade de pRB para trazer essas atividades de cromatina que regulam os promotores E2F-responsivos cria a oportunidade de influenciar uma região genômica mais ampla do que apenas a presença de DNA do fator de transcrição E2F (TALLURI, 2012).

Assim, a ativação e/ou repressão de cada um dos membros E2F é ditada pelas interações entre os membros da família e vários cofatores. Na figura 4, é mostrado resultados de ensaios *in vitro* em que E2Fs podem se associar com diferentes cofatores e configurar diretamente a cromatina especificamente (BLAIS, 2007). Em células quiescentes ou diferenciada, proteínas RB ligadas a E2F4 e E2F5 foram encontrados associadas com vários co-repressores (CORS), tais como histona desacetilases, DNA metiltransferase DNMT1 e proteína de ligação de C-terminal (CtBP), levando a compactação da cromatina e inibição da transcrição. Por outro lado, durante a proliferação de células, quando RB é hiperfosforilada, ativadores E2F recrutam o fator de transcrição basal TFIID e outros co-ativadores (CoA), tais como histonas acetiltransferases, p300 e CBP, GCN5 e TIP60, como promotores de genes específicos, levando a uma configuração aberta da cromatina e iniciação da transcrição. Os repressores mais recentemente identificados E2F6 - E2F8 mediante a repressão de genes que respondem a E2F - independente de ligação às proteínas de retinoblastoma. Embora E2F6, através da interação com o complexo polycomb, ainda requer dimerização com uma DP para funcionar na repressão da transcrição, E2F7 e E2F8 são os únicos que formam homodímeros (E2F7 - E2F7 e E2F8 - E2F8) ou heterodímeros (E2F7 - E2F8) para reprimir a transcrição de genes relacionados com o ciclo celular. Os co-repressores que se associam com E2F7 e E2F8 são presentemente desconhecidos (CHEN, 2009).

A inativação de RB não só afeta a regulação da transição G1/S, mas também altera muitos outros processos celulares como a organização da cromatina, as vias de diferenciação, a progressão da mitose, a apoptose, a autofagia, equilíbrio redox, e o metabolismo (NICOLAY B. N., 2013).

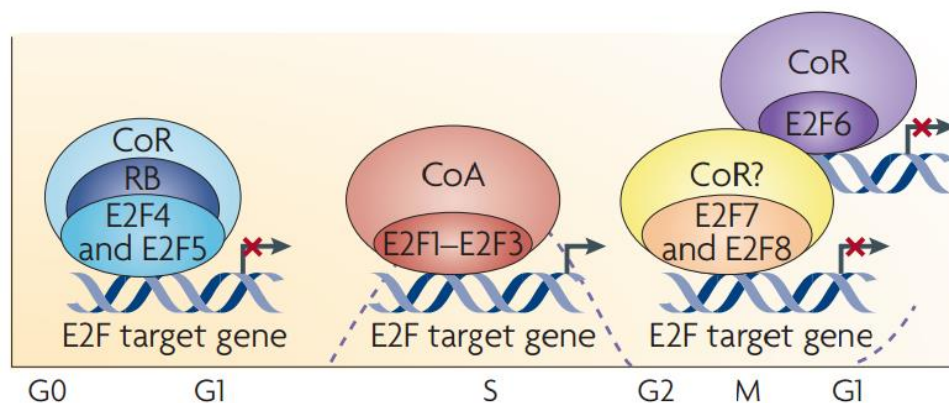


Figura 4. Representação esquemática da atividade dos fatores de transcrição dos subgrupos E2F.

Fonte: CHEN, 2009, pg. 788

2.1.7 Via Rb-E2F: proliferação, diferenciação e apoptose

O comprometimento em dividir é um dos passos mais importantes do ciclo de divisão celular em mamíferos. Isto é fundamental para a homeostase dos tecidos e do organismo, e conseqüentemente, é altamente regulado. A grande maioria dos cânceres fogem ao controle proliferativo, ressaltando ainda mais a importância da etapa de regulação do ciclo celular (TALLURI, 2012).

A via de Rb-E2F/DP tem um papel central na determinação da proliferação e a viabilidade das células, sendo regulada por uma rede complexa de interações proteicas. Estudos demonstram o papel fundamental de E2F como ponto de restrição para o comprometimento da progressão do ciclo celular, evidenciando que a via de Rb-E2F, constitui um interruptor biestável que controla este ponto crucial do ciclo celular, como observado na figura 5 (YAO, et al., 2008). Sob circunstâncias normais, E2Fs estão envolvidos na regulação da progressão do ciclo celular, através da transcrição de genes cujos produtos são necessários para a replicação do DNA, progressão do ciclo celular e / ou crescimento, tais como p27 e *skp2*. A desregulação da atividade de E2F como resultado de mutações leva à entrada prematura da fase S do ciclo celular e, dependendo do estado genético da célula a hiperproliferação ou apoptose. Genes-alvo de E2F que respondem ao dano de DNA e conduzem a

apoptose podem ser dependente de p53, tal como a ARF ou, independente de p53, tais como p73 e Apaf1 (STEVENSON, 2003).

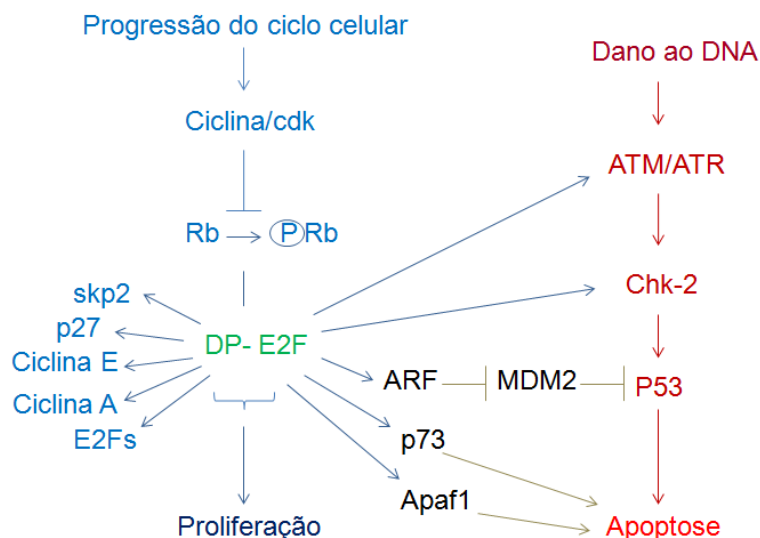


Figura 5. Modelo da atividade dos fatores de transcrição E2F na proliferação celular e na apoptose. Resumo da via pRb/E2F (à esquerda) e a resposta da p53 a danos no DNA (à direita).

A via de Rb-E2F é um regulador essencial de vários fenômenos biológicos importantes por meio de estímulos (produtos gênicos), convertendo sinais em respostas, como a estimulação do crescimento celular (SINGH, 2010). Assim, E2F parece desempenhar um papel central na coordenação acontecimentos relacionados com a proliferação, a parada do ciclo celular e apoptose (STEVENSON, 2003)

A perda do complexo proteico Rb - E2F/DP prejudica a repressão de genes que respondem a E2F e, portanto, a capacidade para sair do ciclo celular (STEVENSON, 2003). Um estudo de Porse (2001) demonstrou que a repressão da transcrição E2F-1/DP-1 por um fator de transcrição (C/EBP) é essencial para a saída do ciclo celular e a diferenciação de adipócitos e granulócitos neutrófilos *in vivo*. A importância de reprimir a atividade de E2F para o início da diferenciação também tem sido observada em células miogênicas e nos queratinócitos (DICKER, et al., 2000). A perda da repressão E2F através mutações em Rb leva à proliferação não controlada e apoptose *in vivo* (JACKS, et al., 1992).

Curiosamente, E2F não é um alvo frequente de mutações no câncer, o que indica que é a inativação da via com a subsequente desregulação da atividade de E2F, ao invés da inativação mutagênica direta de E2F, que confere uma característica de tumorigênese (STEVENSON, 2003). Atividade de E2F é desregulada na maioria das células tumorais, através de mutações que culminam com a perda funcional do pRb e/ou amplificação de ciclina D, que promove a fosforilação de pRb e perda de p16, um inibidor da cdk que inibe a fosforilação de pRb, interrompendo complexos pRB- E2F (SHERR, 2002).

A via Rb, inativada em pelo menos um terço de todos os tumores humanos (SHERR,1996), resulta em atividade E2F desregulada, que promove a proliferação ou a morte das células, dependendo do contexto celular. Especificamente, os resultados da atividade desregulada de E2F é determinada pela integração dos sinais provenientes do DNA celular e o ambiente externo. Alterações no percurso da proliferação celular e da morte celular são as principais características de células transformadas, e, por conseguinte, uma compreensão das variáveis que determinam o resultado de ativação de E2F é fundamental para a pesquisa e tratamento do câncer (POLAGER, 2008). No entanto, não estão disponíveis marcadores para prever a capacidade das células cancerosas em ativar RB e restringir a proliferação, ou prever o seu potencial para estimular a apoptose e eliminar tumores (DEGREGORI, 2002).

Em doenças humana, a família E2F vem sendo investigada, sendo E2F1 o membro mais estudado, e os demais em menor grau (XANTHOULIS, 2013). Observações relatam que nas células do carcinoma de pulmão, o aumento da expressão de E2F1 e E2F3 tem sido associada com o pior prognóstico ao paciente (BORCZUK, et al 2003) . No câncer da mama, o aumento da expressão de E2F1 ou E2F4 têm sido proposto como indicadores de mau prognóstico, enquanto que o aumento da expressão E2F5 está sendo avaliado em certos subtipos histológicos (RAKHA, et al. 2004; POLANOWSKA, et al., 2000) . No câncer de ovário, o aumento expressão de E2F1 -5, E2F7 e E2F8 foi relatado, sendo, de E2F4 relacionada com a melhor sobrevida e de E2F8 com a menor sobrevida global (DEMEYER, T. et al. 2009). No câncer de próstata, há um aumento da expressão de E2F2 e E2F3, enquanto E2F1 está

ausente. Em carcinomas uroteliais de bexiga, a expressão de E2F3 é aumentada, enquanto que a de E2F1 depende do grau de invasão da doença (ZACHARATOS, et al., 2004). O aumento da expressão E2F1 também foi observado no câncer de tireoide, carcinoma de células pequenas do pulmão, glioblastoma e metástases linfáticas do melanoma maligno (NELSON, et al., 2006).

2.2 Gene E2F2

O gene E2F2, foi originalmente identificado relacionado com o gene de E2F1, em conjunto com E2F3 (KAELIN et al, 1992), mostrando a elevada homologia existente entre eles. Investigações seguintes demonstraram que embora estruturalmente muito semelhante ao E2F2, E2F1 e E2F3 não aparecem para inibir a síntese de DNA, (MURGA, et al., 2001) sugerindo que este é uma função específica de E2F2, não compartilhada por outros membros. O grupo liderado por Ana Zubiaga demonstrou que E2F2 funciona para manter a quiescência em G0, através da repressão da transcrição de genes alvos do ciclo celular (INFANTE, et al., 2008). Além disso, outros grupos demonstraram que E2F2 tem um papel restrito na eritropoiese e na diferenciação neuronal.

Contudo, a função do gene ainda está por esclarecer-se, uma vez que os estudos de perda e ganho de função deram lugar a resultados contraditórios. Evidências presentes sugerem que E2F2 pode atuar tanto como supressor ou como promotor da proliferação celular, dependendo do contexto (DELGADO, et al., 2011). O seu papel positivo na progressão do ciclo celular foi demonstrada em certos tipos de células, tais como fibroblastos e células progenitoras hematopoiéticas (DIRLAM, 2007). Inversamente, tem sido demonstrado que E2F2 regula negativamente a proliferação de células T, através da repressão da transcrição de genes envolvidos na replicação de DNA e na progressão do ciclo celular (MURGA, et al. 2001; INFANTE, et al., 2008).

Investigações iniciais mediante sobreexpressão de E2F2 verificaram que a atividade do gene é induzida durante uma resposta proliferativa, levando a uma acumulação de E2F2 na entrada da fase S, sugerindo que E2F2 é necessário na transição de G1 / S, para promover a progressão do ciclo celular e para estimular a proliferação celular, sendo um ativador da transcrição

(MURGA, et al. 2001; INFANTE, et al.2008; DELGADO, et al.2011). Experimentos demonstraram também que E2F2 pode ter atividade oncogênica, como nos estudos de Scheijen et al. (2004) onde camundongos transgênicos sobreexpressando E2F2 no compartimento epitelial tímico tiveram uma alta incidência de desenvolvimento de timoma.

Estudos seguintes demonstraram que E2F2 pode atuar como repressor da transcrição e inibidor da proliferação celular em determinados contextos (MURGA, et al., 2001). Foi avaliada a função de E2F2 no crescimento e no desenvolvimento normal, testando o papel de E2F2 na regulação da proliferação, apoptose e / ou diferenciação *in vivo*, através da inativação do locus E2F2 em camundongos através de recombinação homóloga. Camundongos carentes do gene E2F2 foram viáveis, entretanto eles apresentaram disrupção dos genes alvos de E2F2 na fase G0/G1, fazendo com que células T entrem precocemente na fase S e tenham a divisão celular acelerada (INFANTE, et al., 2008). Isso causa defeitos na homeostasia dos linfócitos T, levando a uma doença autoimune; aumento da capacidade de hiperreplicação de DNA (observado em células linfóides e pancreáticas) e desenvolvimento de tumores. Por isso, os autores sugeriram que a atividade normal e regulada de E2F2 desempenhou um papel negativo na proliferação celular e que sua atividade seja supressora tumoral.

A identificação dos genes que são regulados em cada contexto celular particular por E2F2 pode ajudar a explicar os diferentes papéis desempenhados por este fator de transcrição. Desse modo, análises globais da expressão de genes ao nível do mRNA e de proteínas tornaram-se extremamente útil para investigar o perfil de expressão gênica específicos para uma determinada condição fisiológica ou patológica (AZKARGORTA, et al., 2011). Análises baseadas em genômica funcional com microarranjos de DNA têm contribuído grandemente para a identificação de perfis gnômicos que são regulados mediante expressão ectópica ou inativação funcional do fator de transcrição (IGLESIAS, et al., 2002). Assim, foi desenvolvida uma base de dados de perfil de expressão de genes de linfócitos T E2F2 deficientes que indicam um subconjunto de genes, incluindo MCM2, MCM6 Cdc6, Cyca, cycB,

cdc2a, que são reprimido exclusivamente por E2F2 (LARESGOITI, et al., 2013).

Estudos transcriptômicos são geralmente realizados sobre a base de que deve haver uma boa correlação entre o nível de RNA e o nível da proteína. Esta hipótese, no entanto, nem sempre é verdadeira, provavelmente devido a diferenças técnicas entre as duas técnicas, e porque o nível de mRNA muda não podendo ser diretamente traduzidas numa mudança do nível de proteína (Azkargorta, M. et al. 2010) Assim, ambos os tipos de moléculas devem ser examinados para obter uma imagem completa do processo celular em estudo. Pesquisas realizadas por Azkargorta, et al. (2010) baseado em transcriptômica e próteômica com linfócitos T quiescentes carentes de E2F2, forneceram evidências que demonstram o estado anormalmente ativado dessas células antes da estimulação, o que poderia explicar seu fenótipo hiperproliferativos. Assim, a perda de E2F2 resulta num aumento da expressão de ciclinas, CDK1, proteínas de replicação, e aumento na associação de proteínas de replicação com a cromatina em células em repouso, deixando as células posicionadas para iniciar rapidamente a síntese de DNA. Este padrão aberrante sugere que essas células não estão verdadeiramente em G₀, mas apresentam algumas características do G₁ ou G₁/S. No entanto, as células mutantes não entram no ciclo celular na ausência de estimulação, indicando que elas permanecem funcionalmente quiescentes (INFANTE, et al.2008).

Para aprofundar o entendimento sobre o mecanismo pelo qual E2F2 regula a fisiologia da célula T, foi analisado o proteoma de linfócitos T carentes de E2F2 que tenham iniciado seu ciclo de proliferação após a ativação através do receptor de células T (TCR). Assim, foi descoberto que os mediadores da via Ahr são anormalmente expressos na ativação de células T E2F2 - / - em comparação com células selvagens, o que os torna altamente sensível à apoptose por exposição a xenobióticos ambientais, tais como a TCDD (*tetrachlorodibenzo-p-di-oxin*). Estes resultados ressaltam a importância da expressão proteômica combinada com a tecnologia de genes *knockout* na definição do papel funcional de genes específicos (Azkargorta, et al., 2010).

3. METODOLOGIA

Este trabalho de conclusão de curso foi realizado durante o estágio obrigatório supervisionado, correspondente ao período de fevereiro a agosto de 2013, com carga horária total de 625 horas. As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Genética (figura 6.A) do Departamento de Genética, Antropologia Física e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciência e Tecnologia (figura 6.B), da Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitateko – UPV/EHU (Leioa – Espanha). O intercambio foi financiado pelo Conselho Nacional de Pesquisa e qualidade (CNPq) pelo programa Ciência sem Fronteiras.



Figura 6. (A) Laboratório de Genética da (B) Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidad del País Vasco.

O grupo de pesquisa do qual participei centra seus estudos nas rotas de regulação de proliferação e de morte celular, especialmente as rotas RB/E2F,

cujas alterações constituem a causa de enfermidades como o câncer e processos autoimunes. Os desenhos experimentais empregados em pesquisa fazem uso de modelos genéticos celulares e animais. Deste modo, as principais atividades executadas no período de estagio supervisionado envolveram genotipagem de animais e cultivo celular.

3.1 Manutenção de camundongos

O laboratório que integrei possui seu próprio biotério, onde mantém colônias de camundongos de diferentes linhagens utilizadas em pesquisa, sendo as principais linhagens *knockouts* para os genes de interesse (P53, P21, B6, Chk-1, E2F1 e E2F2). Para a manutenção das colônias, os camundongos eram postos em cruzamento a partir da informação do genótipo dos genitores.

Desse modo, neste trabalho, empregou-se uma linhagem de camundongos portadores de uma mutação inativadora para o gene *E2f2*, gerados previamente no laboratório, e mantidos em heterozigose sobre ciclo normal de luz. Após o cruzamento entre animais heterozigotos (*E2f2 +/-* x *E2f2 +/-*), e geradas as proles, os animais eram numerados (cortando os dedos - método aprovado pelo Comitê de Ética da Universidad del País Vasco) e uma biopsia de cola (aproximadamente 3 mm) era obtida e armazenada em um microtubo para genotipagem.

3.2 Extração de DNA

Para extrair DNA das biopsias de colas, o laboratório utilizava o kit comercial da Omega Biotek – Extração de DNA de células e tecidos animais (\$324,00 para 200 amostras).

3.3 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

As PCRs foram realizadas com *primers* específicos de sequencia para amplificar a região de interesse. A detecção genômica por PCR do alelo *E2F2* selvagem (350 pb) se realizou pelos *primers* TACTGTTCCCTGGCCCCGC e TGGAGAGACCCCAGGCTG que anelam no éxon 3 do gene, como mostra a

figura 7. Para a detecção do alelo mutado de E2F2 (250bp) se utilizou um terceiro *primer*, CAAGTGCCAGCGGGGCTGCTAAAG, que anela com a região insertada por recombinação homóloga do éxon 3 do gene E2F2, correspondente ao gene de resistência a Neomicina (MURGA, et al., 2001).

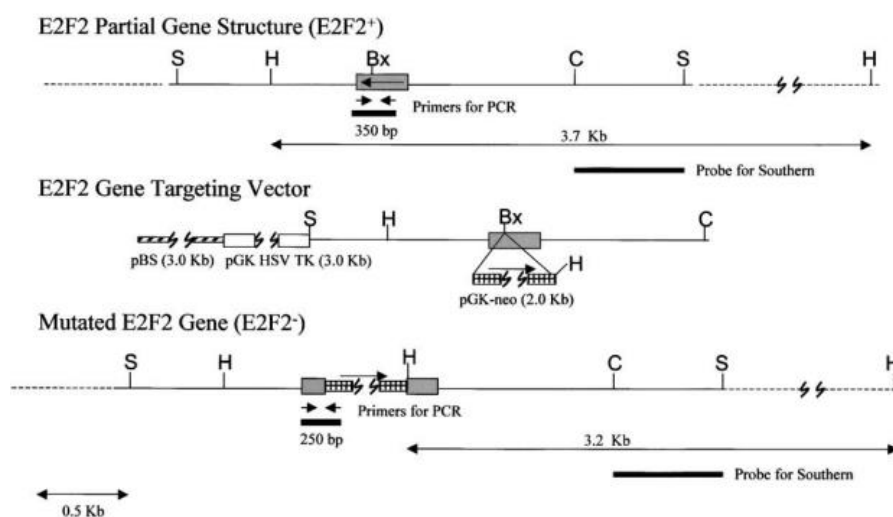


Figura 7. Mapa do exôm 3, onde ocorre a hibridação com os *primers* específicos para reconhecimento do alelo mutado e salvagem do gene E2F2.

Fonte: Murga, M.; Immunity, 2001.

As condições das PCRs foram as seguintes: 1) 94°C, 5 minutos; 2) 72°C, 10 minutos; 3) 94°C, 0,5 minutos; 4) 61°C, 0,5 minutos; 5). 72°C, 0,5 minutos, por 30 ciclos. Os controles dos três genótipos possíveis foram obtidos de amostras previamente genotipadas, e o controle negativo da PCR foi uma amostra sem DNA.

3.4 Eletroforese

O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 3% e corado com brometo de etídio. A imagem molecular foi obtida mediante um transiluminador de luz UV e analisada pelo *software* *Quantity One* (BioRad Laboratories Inc, EUA).

3.5 Sistema de expressão

Descrito por Gossen et al. (1995), o Sistema Tet-on (Clontech Laboratories, EUA), figura 8, é um método de expressão gênica induzida em que a transcrição do gene de interesse inicia após a adição de doxiciclina (DOX). Para isso, o sistema possui uma proteína regulatória, o rtTA (reverse tTA), resultante da fusão do *rtetR* ("reverse" *Tet repressor protein*) e o domínio de ativação do vírus herpes simplex VP16. Esta fusão permite que o rTetR na presença de DOX ative sua transcrição e conseqüentemente é o ativador de transcrição do TRE (Tetraciclina response elemento). TRE, está presente em um segundo componente plásmidico, sendo uma sequencia reguladora que contem o tetO (operador tet, sequencia regulatória onde é o sitio de união natural para *rtetR*), em *upstream* do promotor mínimo de CMV (*P_{minCMV}*). *P_{minCMV}* permite a transcrição do gene de interesse (gene E2F2).

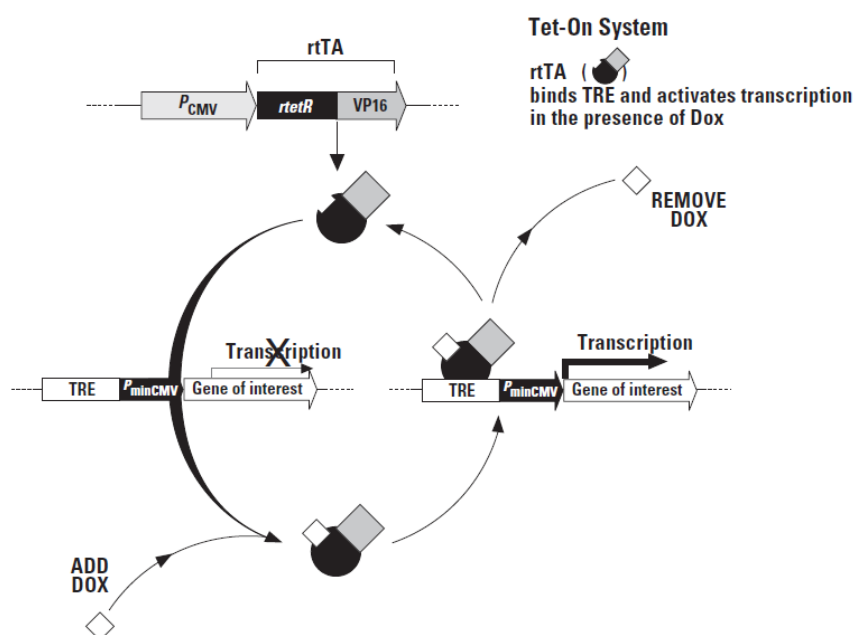


Figura 8. O sistema Tet-On.

Fonte: User Manual: Tet-Off and Tet-On Gene Expression Systems. Clontech Laboratories. Publicado em outubro 2012.

3.6 Cultivo celular:

As células de osteosarcoma humano U2OS contendo o sistema de expressão Tet-on (Clontech ®), e transfectadas de maneira estável com o

plásmidio de E2F2 (pTRE-Myc -E2F2; figura 9) previamente no laboratório, foram cultivadas em meio DMEM com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) a 37°C e 5% de concentração de CO₂.

A construção plasmídica pTRE-Myc-E2F2, mostrada na figura 6, porta a sequencia codificante do gene E2F2 e uma etiqueta Myc (para ser reconhecida por anticorpo específicos anti-Myc) em sua região N-terminal. Sua expressão se encontra regulada pelo promotor TRE, dependente do antibiótico doxíciclina.

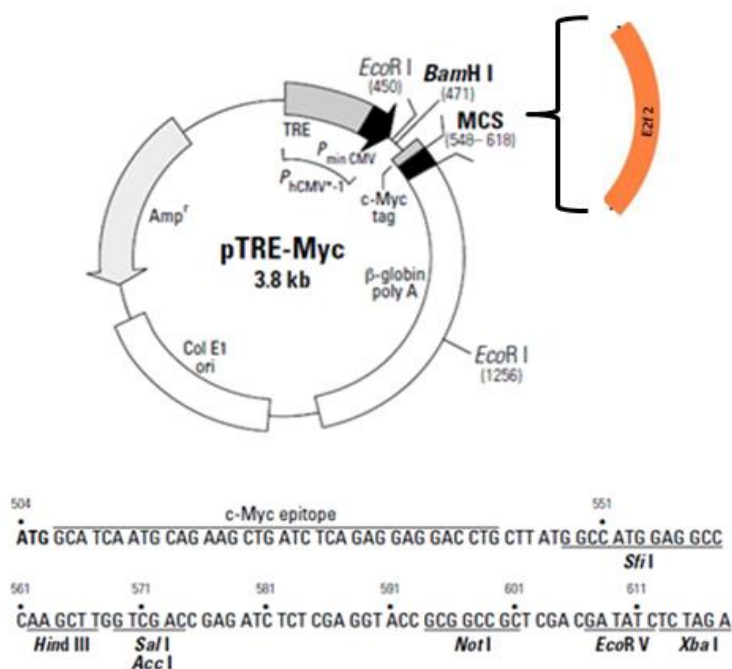


Figura 9. Mapa do vetor pTRE-Myc onde se clonou o gene E2f2.

Fonte: User Manual: Tet-Off and Tet-On Gene Expression Systems. Clontech Laboratories. Publicado em outubro de 2012; e Application Guide: TrueClone Full Length cDNA Clones (Human and mouse). Atualizado em julho 2011.

3.7 Indução da expressão de E2F2:

Para a expressão induzida de E2F2 em célula U2OS, foram plaqueadas $2,5 \times 10^5$ células em cada pocinho de uma placa de 6 poços, com 2mL de meio. 24 horas mais tarde se adicionou 2µg/mL de doxíciclina (DOX) em cada pocinho, e passadas 0h, 6h 12h, 24h e 48h se recolheram as células e se extraíram as proteínas. Para isso, os pocinhos foram lavados com 1mL de tampão PBS, seguido de 0,1mL de tampão de lise, e se desaderiram as células

com raspadores de células. Os extratos celulares foram armazenados em microtubos a -80°C.

3.8 Quantificação de proteínas:

As proteínas foram quantificadas em triplicata mediante uma curva de calibração da concentração de BSA (Método de Bradford), medida em espectrofotómetro a comprimento de onda de 750 nm.

3.9 Western blot:

Para a análise das proteínas, as amostras diluídas em tampão de lise, homogeneizadas e previamente incubadas por 5 minutos a 98°C, foram carregadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12 % e migradas a voltagem constante (100V) por 2h. Em seguida as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por uma hora a voltagem constante (100V). Se tratou a membrana brevemente com Ponceau para confirmar a transferência de proteína, se lavou com tampão TTBS (Tampão tris salino acrescido de 0.1% de tween 20) e se bloqueou com leite à 5% por uma noite. Em continuação se lavou a membrana e a incubou com anticorpo primário (rabbit policlonal IgG anti-E2F2, anti-Chk-1, anti-ciclina E e mouse policlonal IgG anti- β -actin, todos da Santa Cruz Biotechnology, EUA) por 4h diluído em leite e depois se incubou com anticorpo secundário (anti-rabbit IgG, e anti-mouse IgG, da Santa Cruz Biotechnology) por 1h diluído em leite. Revelou-se a membrana com Westen Blot Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, EUA) e a imagem molecular foi obtida mediante um transiluminador de luz UV e analisada pelo software *Quantity One* (BioRad Laboratories Inc, EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Genotipagem de camundongos portadores de mutação inativadora do gene E2F2:

Realizou-se a genotipagem de varias proles de camundongos obtidos pelo cruzamento de animais heterozigotos para E2F2 (E2f2 +/- x E2f2 +/-). As frequências obtidas para cada um dos fenótipos possíveis foram as esperadas, isso quer dizer, $\frac{1}{4}$ E2F2 +/+; $\frac{1}{2}$ E2F2 +/-; $\frac{1}{4}$ E2F2 -/- (segregação mendeliana), o que sugere que E2F2 é dispensável para o desenvolvimento do animal.

Como exemplo se mostra na figura 10 a análise efetuada sobre uma prole contendo dez animais. Se verificou pela genotipagem que quatro filhotes apresentam o alelo mutado do gene E2F2 em homozigose. Do restante dos animais, três são heterozigotos e outros três são homozigotos para o alelo selvagem. Abaixo na figura 10, se mostra os resultados da genotipagem desta prole de camundongos.

Havendo identificado o perfil genético de cada animal para o gene E2F2, estes vão contribuir para a realização de ensaios funcionais do gene E2F2 em laboratório. Partindo do isolamento de células primarias de cada camundongo será possível comparar diversos ensaios funcionais, como a proliferação e a apoptose, o qual ajudará a elucidar a função do gene E2F2.

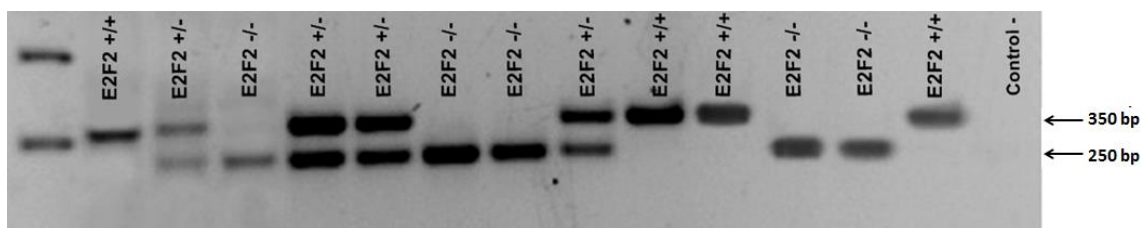


Figura 10. Genotipo de uma prole de camundongos. Desde a esquerda: Marcador molecular de DNA 1KB, controles (homozigoto selvagem, heterozigoto, e homozigoto *knockout*), amostras de DNA de uma prole, e controle negativo da PCR.

4.2 Expressão induzida de E2F2 em células:

Até hoje, a maioria dos estudos realizados com o gene E2F2 são baseados em ganho de função com vetores de expressão constitutiva, e por tanto não regulada. Isto resulta em uma desvantagem, posto que os resultados não são facilmente atribuídos a atividade do próprio transgene, podendo ser um efeito secundário derivado de sua atividade ectópica.

Uma alternativa ao emprego de vetores de expressão constitutiva consiste no emprego de vetores de expressão induzida, ou seja, aqueles por qual a expressão do gene clonado pode ser induzido ou silenciado de uma maneira regulada. No laboratório se elegeu o sistema de expressão Tet-on (figura 8) que permite regular a expressão do gene E2F2 de uma maneira induzida, trás a adição de doxiciclina. O sistema Tet-on esta constituído por 2 vetores, um deles porta o fator tTA induzido por doxiciclina; e outro porta um promotor regulado pelo fator tTA, e é neste vetor em que se deve clonar o gene de interesse, como se observa na figura 8.

Para analisar a expressão gênica de E2F2 neste sistema e a sua regulação, se realizou o cultivo de células U2OS-pTRE-Myc-E2F2 em uma placas de 6 poços. A seguir, se adicionou doxiciclina para induzir a expressão em cada poço e conforme o tempo de indução transcorria foram obtidas as amostra. Desse modo, passado 0h, 6h 12h, 24h e 48h as células de um poço foram recolhidas e as proteínas extraídas, constituindo uma amostra. Esse tempo foi estabelecido de acordo com experimentos já realizados em outras simulações, sugerindo indução máxima observada entre 24h e 48h (INFANTE, A. et al., 2008).

Por meio de western blots se verificou a presença de proteínas, fato que sugere a expressão gênica. Procedeu-se a incubação da membrana com os anticorpos anti-E2F2 e anti- β -actina, se analisou a imagem molecular e quantificou a densidade óptica de cada amostra com cada anticorpo, e as

comparou para confirmar se a presença de proteína está relacionada com a construção do plasmídeo ou é referente à expressão endógena da célula.

Como mostrado na imagem molecular (figura 11), houve expressão de E2F2 nas células. Observa-se que a partir das 6h de indução através da adição de doxiciclina, a expressão gênica esta ativada e ocorre uma ligeira redução da expressão até às 12h, sugerindo que a expressão do gene não se mantém com o tempo. O nível máximo de expressão foi verificado às 24h, comprovando que o sistema de expressão induzível conduziu corretamente à expressão gênica, permitindo seguir com estudos de ganho de função do gene E2F2.

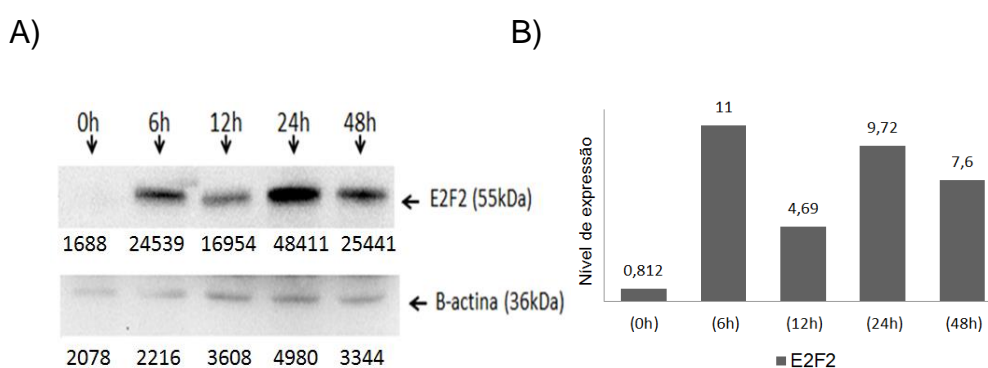


Figura 11. A)Western blotting de células U2OS-pTRE-Myc-E2F2 expressando E2F2 trás a adição de doxiciclina em diferentes tempos (0h, 6h, 12h, 24h, 48h), mostrando a presença de proteína expressa pelo gene E2F2, e o controle endógeno por β – actina. B) Analise da densidade óptica.

Desta maneira, se conduziu estudos com genes Ciclina E e Chk-1 que aparentemente apresentam sitio de ligação ao E2F2 (INFANTE, A. et al., 2008), para , verificar se suas transcrições se encontram reguladas pelo gene E2F2.

Para analisar a regulação da expressão dos possíveis alvos transcripcionais, Ciclina E e Chk-1, se procederam a novos westerns blots, ajustando as densidades ópticas das amostras. Nesta etapa, as membranas foram hibridizadas com os anticorpos anti-Chk-1, anti-ciclina E, e anti- β -actina. Na figura 12, se observa o resultado obtido e as densidades opticas.

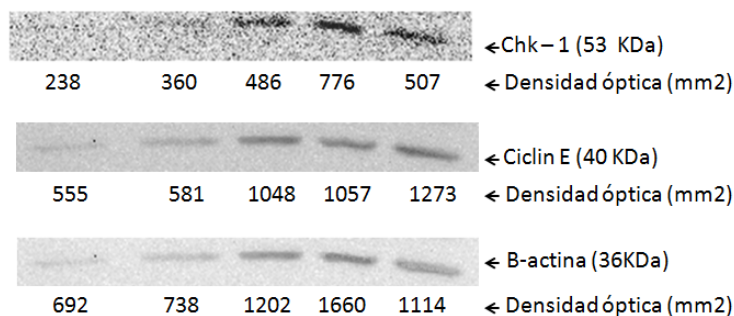


Figura 12. Western blotting e densidade óptica de células expressando E2F2 trás a adição de DOX em diferentes tempos (0H, 6H, 12H, 24H, 48H), membrana hibridizada com anticorpos anti -CHK-1 e anti- Ciclina E e anti b-actina.

Durante a realização do presente trabalho, foi possível constatar que a expressão induzível de E2F2 só pode ser avaliada com anticorpo anti-E2F2, e não com anticorpos anti-Myc. Por alguma razão que se desconhece este anticorpo não é capaz de reconhecer a marcação presente na região N-terminal de E2F2. Isso gerou problemas não antecipados, ao não poder distinguir o E2F2 endógeno do exógeno, fato que limita experimentos futuros como o estudo de localização celular de E2F2 em resposta a diferentes tratamentos.

A partir da análise das densidades ópticas de todas as amostras (figura 11 e 13) é possível verificar que o gene E2F2 regula a expressão dos genes Ciclina E e Chk-1. Pela figura 13 é possível analisar que o gene Chk-1 (13.B) apresenta o mesmo padrão de expressão do gene E2F2 (11.B), sugerindo que o gene Chk-1 se encontra regulado positivamente pela expressão de E2F2. Analisando a expressão do gene Ciclina E (13.A), pode-se perceber que está regulado negativamente pela expressão do gene E2F2, uma vez que seu padrão de expressão apresenta-se ao inverso de E2F2 (11.B).

Ciclina E

B) Chk-1

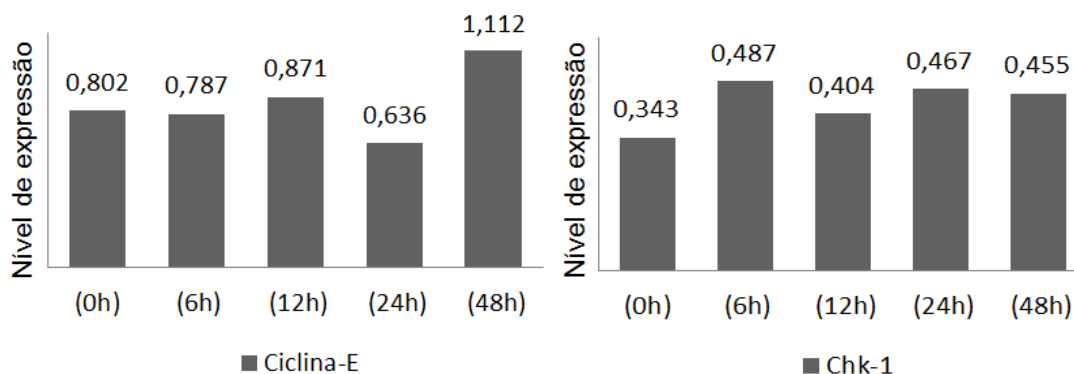


Figura 13. Análise da densidade óptica dos genes A) Ciclina E e B) Chk-1.

A diferença verificada nos padrões de expressão apresentados pode ser justificada pelas funções desempenhadas por cada gene. O gene Chk-1 possui suas funções celulares envolvidas na regulação do ciclo celular, na mitose e no metabolismo de DNA, ao passo que o gene Ciclina-E apresenta suas funções celulares relacionadas com a regulação do ciclo celular, a replicação de DNA e o reparo em quiescência.

Foi investigado por Infante et.al (2008) o papel de E2F2 na regulação da proliferação celular, e o autor constatou que uma das principais funções de E2F2 em células (*wild type*) é manter o estado de repouso (G0) através da repressão da transcrição direta dos genes-alvo relacionados com o ciclo celular, como o gene Ciclina-E. Com a desregulação da expressão de E2F2, seus genes alvos, por conseguintes, também apresentam sua expressão alterada, fato que leva as células a apresentarem condições anômalas.

Estudos de Siu et. al (2012) discutem os elevados níveis de expressão de ciclina E em diversas linhagens celulares de câncer, e apontam a correlação do aumento da agressividade de tumores com a sobre-expressão de ciclina E.

5. CONCLUSÃO

A família E2F de fatores de transcrição desempenha um papel central na regulação da proliferação celular, através do controle da expressão de genes necessários para a progressão do ciclo celular, particularmente a síntese de DNA, e os genes envolvidos na apoptose. A via pRb (supressora tumoral) regula a etapa de tomada de decisão (proliferação ou apoptose), geralmente atribuída à sua capacidade para reprimir a transcrição de genes do ciclo celular, ligando-se e inibindo a família E2F de fatores de transcrição. Por isso, a família E2F têm sido o foco de intensa investigação sobre o seu papel na regulação do ciclo celular, e na sobrevivência celular, assim como a contribuição relativa de cada membro E2F.

Sabe-se que os membros da família estão envolvidos nas cascatas de sinalização induzidas, e o caminho Rb-E2F é um regulador vital de vários fenômenos biológicos importantes, afetando a expressão dos genes através do recrutamento de uma variedade de co-repressores e co-ativadores. Uma compreensão mais completa dos genes alvo de E2F vai ajudar a revelar as redes de transcrição que regulam o ciclo celular e auxiliar a identificação de alvos, como por exemplo genes induzidos por stress.

Neste trabalho verificamos que é possível estudar o gene E2F2 a partir do sistema de expressão induzido Tet-on. Por meio do sistema Tet-on, foi constatado que E2F2 regula a expressão dos genes Chk-1 e Ciclina E, genes envolvidos na regulação do ciclo celular. Desse modo, através deste sistema

será possível seguir estudos com outros alvos transcripcionais de E2F2, e assim investigar suas funções.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considero que meu período de estágio obrigatório supervisionado foi extremamente enriquecedor para a minha formação e aquisição de experiência profissional. Trabalhei e convivi com uma equipe muito legal, inteligente e dedicada, e pude aprender muito.

No laboratório, tive a oportunidade de desenvolver diversos procedimentos, alguns dos quais realizei pela primeira vez. Busquei otimizar o tempo do desenvolvimento das atividades e conhecer a rotina que fazia parte do laboratório e os diferentes encaminhamentos dados às situações evidenciadas na equipe.

Assim, vivenciar as atividades no cotidiano do estágio obrigatório supervisionado foi uma experiência significativa para a minha formação, enquanto acadêmica, e um aprendizado gratificante para minha conduta como biotecnóloga, me permitindo aguçar o que aprendi na teoria, para melhor contribuir com o desenvolvimento da ciência, de forma que visem transformação na sociedade.

De forma geral fiquei bastante satisfeito com o meu estágio. Pude aprender bastante, mas também pude aplicar bastante do que já havia aprendido. Conheci novas pessoas e aprendi como me relacionar com elas no ambiente de trabalho para que tanto o meu rendimento como o deles fosse o melhor

possível. Acredito que durante esse período eu pude obter um amadurecimento tanto profissional quanto pessoal que será extremamente importante para mim no futuro.

7. REFERENCIAS

ALMEIDA, O.C.P. et. al Desenvolvimento de um Banco de Dados de Fator de Transcrição Humano. **Tékhnē e Lógos**, v.1, n. 1, p.1-19, out. 2009.

ATTWOOLL, C.; DENCHI, E.L.; HELIN, K. The E2F family: Specific functions and overlapping interests. **Embo Journal**, v.23, p. 4709–4716, 2004.

AZKARGORTA, M. et al. Differential Proteomics Analysis Reveals a Role for E2F2 in the Regulation of the Ahr Pathway in T Lymphocytes. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 9, p. 2184 –2194, 2010.

BIYASHEV, D.; QIN, G. E2F and microRNA regulation of angiogenesis. **American Journal of Cardiovascular Disease**, v.1, p.110-118, 2011.

BLAIS, A.; DYNLACHT, B. D. E2F-associated chromatin modifiers and cell cycle control. **Current Opinion Cell Biology**, v.19,p. 658–662, 2007.

BORCZUK A.C. , et al. Non-small-cell lung cancer molecular signatures recapitulate lung developmental pathways. **American Journal of Pathology** v.163: p.1949-1960, 2003.

CHEN, H.Z., TSAI, S.Y., LEONE, G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p.785-797, 2009.

CROXTON R., et al. Direct repression of the Mcl-1 promoter by E2F1. **Oncogene**, v.21, p.1359–1369, 2002.

DEGREGORI, J.; JOHNSON, DG. Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. **Current Molecular Medicine**, v. 6, p. 739-748, 2006.

DEGREGORI, J. The genetics of the E2F family of transcription factors: Shared functions and unique roles. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v.1602, p. 131-50, 2002.

DEGREGORI, JAMES. The Rb network. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 3411-3413, 2004.

DELGADO, I. et al. A role for transcription factor E2F2 in hepatocyte proliferation and timely liver regeneration **American Journal of Physiology**, v. 301, p. G20–G31, 2011.

DEMEYER T , et al. E2Fs mediate a fundamental cell-cycle deregulation in high-grade serous ovarian carcinomas. **Journal of Pathology**, v. 217, p.14-20, 2009.

DICKER, A.J. et al. ,E2F-1inducesproliferation- specific genes and suppresses squamous differentiation-specific genes in human epidermal keratinocytes, **Oncogene** v.19 p. 2887–2894, 2000.

DIRLAM, A., SPIKE, B. T., AND MACLEOD, K. F. Deregulated E2f2 underlies cell cycle, and maturation defects in retinoblastoma null erythroblasts. **Molecular Cell Biology**, v. 27, p. 8713– 8728, 2007.

DYSON N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. **Genes Development**, v.12, p. 2245-2262, 1998.

ERB, P. et al, Role of apoptosis in basal cell and squamous cell carcinoma formation. **Immunology Letter**, v. 100, p. 68–72, 2005.

FERREIRA R, et AL. Cell cycle-dependent recruitment of HDAC-1 correlates with deacetylation of histone H4 on an Rb-E2F target promoter. **EMBO Reports**, v. 2, p. 794-799, 2001.

HAZAR-RETHINAM, M. The Role of the E2F Transcription Factor Family in UV-Induced Apoptosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, p. 8947-8960, 2011.

IAQUINTA, P.J.; LEES, J.A. Life and death decisions by the E2F transcription factors. **Current Opinion Cell Biology**, v.19, p. 649-657, 2007.

IGLESIAS, A., et al. Diabetes and exocrine pancreatic insufficiency in E2F1/E2F2 Double mutant mice. **Journal of Clinical Investigation**, v.113, p. 1398 –1407, 2002.

INFANTE, A. et al. E2F2 represses cell cycle regulators to maintain quiescence. **Landes Bioscience**, v.15, p. 3915-3927, 2008.

JACKS, T., et al. Effects of an Rb mutation in the mouse, **Nature**, v. 359, p. 295–300, 1992.

KAELIN, W.G. et al. Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. **Cell**, v. 70, pg. 351–364, 1992.

KOVESDI I, REICHEL R, NEVINS JR. Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. **Cell**, v. 45: pg. 219-228, 1986.

LARESGOITI, U., et al. E2F2 and CREB cooperatively regulate transcriptional activity of cell cycle genes. **Nucleic Acids Research**, p. 1-14, 2013.

LU, M. ET AL. Combined Effects of E2F1 and E2F2 Polymorphisms on Risk and Early Onset of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, **Molecular Carcinogenesis**, v. 51, p.132–141, 2012.

MAGAE J, et al. Nuclear localization of DP and E2F transcription factors by heterodimeric partners and retinoblastoma protein family members of. **Journal Cell Science**, v.109, p. 1717-1726, 1996.

MILTON A, et al. A functionally distinct member of the DP family of E2F subunits. **Oncogene**, v. 25: p. 3212-3218, 2006.

MURGA, M. et al. Mutation of E2F2 in Mice Causes Enhanced T Lymphocyte Proliferation, Leading to the Development of Autoimmunity. **Immunity**, v. 15, p. 959–970, 2001.

NELSON MA, et al. Increased gene copy number of the transcription factor E2F1 in malignant melanoma. **Cancer Biology Therapy**, v. 5 p. 407-412, 2006.

NEVINS, J. Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. **Cell Growth Differentiation**, v.9, p. 585–593, 1998.

NICOLAY B. N.; DYSON, N.J., The multiple connections between pRB and cell metabolism. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 25, p.1 – 6, 2013.

POLAGER, S.; GINSBERG D. E2F – at the crossroads of life and death. **Trends in Cell Biology**, v.18, p. 528-535, 2008.

POLANOWSKA J, et al. Human E2F5 gene is oncogenic in primary rodent cells and is amplified in human breast tumors. **Genes Chromosomes Cancer** v. 28: p.126-130, 2000.

PORSE, B. T., et al. E2F Repression by C/EBP Is Required for and Granulopoiesis In Vivo. **Cell**, v. 107, p. 247–258, 2001.

RAKHA EA, et al. Expression of E2F-4 in invasive breast carcinomas is associated with poor prognosis. **The Journal of Pathology**, v. 203 p.754-761 2004.

SAYERS, E.W.; BARRETT, T; BENSON, DA, et.al Database Resources Of The National Center For Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v.37, n.9, p.3124 – 3148, dez. 2008.

SCHEIJEN B. et al. High incidence of thymic epithelial tumors in E2F2 transgenic mice. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 279, p. 10476–10483, 2004

SEREWKO, M.M. et al. Alterations in gene expression and activity during squamous cell carcinoma development. **Cancer Research**, v. 62, p. 3759–3765, 2002.

SHERR C.J., Cancer cell cycles, **Science** v.274, p.1672–1677, 1996.

SHERR, C.J.; MCCORMICK, F. The RB and p53 pathways in cancer. **Cancer Cell**, v.2, p.103 – 112, 2002.

SINGH, S; JOHNSON, J; CHELLAPPAN, S. Small molecule regulators of Rb – E2F pathway as modulators of transcription. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1799 p. 788– 794, 2010.

SIU, K. T. et al. An integrated view of cyclin E function and regulation. **Cell Cycle**, v.11, p. 57-64, 2012.

STEVENS, C.; LA THANGUE N. B. E2F and cell cycle control: a double-edged sword. **Biochemistry and Biophysics**, v. 412, p. 157–169, 2003.

SWISS, V. A.; CASACCIA, P. Cell-Context Specific Role of the E2F/Rb Pathway in Development and Disease, **National Institute of Health**, v.58, p. 377–390, 2011

TALLURI, S.; DICK F. A. Regulation of transcription and chromatin structure by pRB. **Cell Cycle**, v.11, p.3189-3198, 2012.

TAO Y, et al. Subunit composition determines E2F DNA-binding site specificity. **Molecular Cell Biology**, v.17, p. 6994–7007, 1997.

VERONA R, et al. E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization. **Molecular Cell Biology**, v.17: p.7268-7282, 1997.

VIGO, E. et al. CDC25A Phosphatase Is a Target of E2F and Is Required for Efficient E2F-Induced S Phase. **Molecular Cell Biology**, v.19, p. 6379–6395, 1999.

WELLS, J.,et al. Target gene specificity of E2F and pocket protein family members in living cells. **Molecular Cell Biology**, v. 20, p. 797–5807, 2000.

XANTHOULIS, A.; TINIAKOS, D. G. E2F transcription factors and digestive system malignancies: How much do we know? **World Journal Gastroenterology**, v.19, p. 3189-3198, 2013.

YAO, G. et al. A bistable Rb-E2F switch underlies the restriction point. **Nature Cell Biology** v.10, p. 476– 482, 2008.

ZACHARATOS P, et al. Distinct expression pat-terns of the transcription factor E2F-1 in relation to tumour growth parameters in common human carcinomas. **The Journal of Pathology**, v.203: p.744-753, 2004.