UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

GUILHERME AFONSO MELO

O PAPEL DO MODULADOR EPIGENÉTICO CBX4 NA DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD8^{+}

Rio de Janeiro
2023

GUILHERME AFONSO MELO

O PAPEL DO MODULADOR EPIGENÉTICO CBX4 NA DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD8^{+}

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Inflamação do Instituto de Microbiologia Paulo de Goés – IMPG, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Imunologia e Inflamação.

Orientadora: Profª Dr. Renata de Meirelles Santos Pereira

Rio de Janeiro
2023

CIP - Catalogação na Publicação

M528p

Melo, Guilherme Afonso
O papel do modulador epigenético Cbx4 na diferenciação de linfócitos T CD8+ / Guilherme Afonso Melo. -- Rio de Janeiro, 2023.
263 f.

Orientadora: Renata de Meirelles Santos Pereira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Inflamação, 2023.

1. Linfócitos T CD8+. 2. Epigenética. 3. Polycomb. 4. Cbx4. 5. Memória Imunológica. I. Pereira, Renata de Meirelles Santos , orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE IMUNOLOGIA E INFLAMAÇÃO PARA A CONCESSÃO DO GRAU DOUTOR EM IMUNOLOGIA E INFLAMAÇÃO

REALIZADA EM: 11 de Abril de 2023.
CANDIDATO(A): GUILHERME AFONSO MELO
TÍTULO DA TESE: *"O PAPEL DO MODULADOR EPIGENÉTICO CBX4 NA DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD8+"*
HORÁRIO DE INÍCIO: 13 horas
LOCAL: Auditório do IMPG – Bloco I – IMPG/CCS

Em sessão pública presencial, após exposição de cerca de 40 minutos, o(a) candidato(a) foi arguido(a) oralmente pelos Membros da Banca, tendo demonstrado suficiência de conhecimento e capacidade de sistematização no tema da Tese de Doutorado, sob o título "***O PAPEL DO MODULADOR EPIGENÉTICO CBX4 NA DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD8+***", sendo **Aprovado(a)** por unanimidade pelos Membros da Banca que conferiram os seguintes graus:

Profª. Adriane Regina Todeschini **(Presidente da Banca)**	Grau 10	Conceito A
Profª. Martin Hernan Bonamino	Grau 10,0	Conceito A
Prof. José Carlos Farias Alves Filho	Grau 10	Conceito A
Profª. Marcela de Freitas Lopes **(Suplente)**	Grau.....	Conceito .....
Prof. Luciana Jesus da Costa **(Suplente)**	Grau.....	Conceito .....
Profª Juliana Echevarria Neves de Lima **(Revisora)**	Grau 10	Conceito A
	Grau final.....	**Conceito final.....**

Na forma regulamenta a presente Ata foi lavrada e assinada pelos membros da Banca e pelo(a) candidato(a).

Rio de Janeiro, 11 de Abril de 2023.

Orientador (a): .....
Renata de Meirelles Santos Pereira - **Orientador(a)**

.....
Adriane Regina Todeschini - **Presidente da Banca**

.....
José Carlos Farias Alves Filho

.....
Martin Hernan Bonamino

.....
Luciana Jesus da Costa – **Suplente**

.....
Marcela de Freitas Lopes - **Suplente**

.....
Juliana Echevarria Neves de Lima - **Revisora**

Coordenadora: .....
Josiane Sabbadini Neves

Candidato(a): .....
GUILHERME AFONSO MELO

Josiane Sabbadini Neves
Coordenadora
Pós-Graduação em Imunologia e Inflamação
UFRJ Siape 1730613

Dedico este trabalho a Antônio Lino Melo (in memoriam) e Maria Glaucia Afonso Lino de Melo, por serem minha fundação, minha orientação, minha motivação e fonte de inesgotável de sabedoria e carinho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à minha família por todo o suporte me dado: emocional, espiritual, financeiro e por todos os ensinamentos. Em especial, agradeço meus pais, Antônio Lino Melo (*in memoriam*) e Maria Glaucia Afonso Lino de Melo, á quem dedico este trabalho, por me guiarem (de perto e de longe) e por todo o amor que recebi, que me transforma e me transborda, e me permite ser quem sou. Agradeço meus irmãos, Gabriel Afonso Melo e Maria Isabel Afonso Melo, pelo exemplo de vida, de trabalho e dedicação, pelos avisos e conselhos. Agradeço aos meus sobrinhos Gabriel Afonso Melo Filho e Isabella Bauso Afonso Melo, pelo companheirismo e por me lembrarem de que também sou exemplo, o que me fortalece.

Agradeço à minha orientadora, Renata Meirelles dos Santos Pereira, por ser minha mentora, em todos os significados que essa palavra comporta. Agradeço à oportunidade concedida de trabalhar nesse projeto, que me projetou como pesquisador, nesse estudo que desenvolvi, que me desenvolveu como cientista. Nessa jornada aprendi não só o ofício, mas ossos que ele traz, e Renata me ajudou a lidar com eles. Como cientista, como pessoa, como cidadão. De forma racional, construtiva e empática. Agradeço por todos os ensinamentos que me moldaram no profissional que sou agora.

Agradeço ao meu Prof. Gustavo Martinez, por me ensinar que o segredo de uma maratona é manter o ritmo. Agradeço por aperfeiçoar as habilidades que eu já conhecia e me ensinar muitas outras que não.

Agradeço à Carolina Calôba por ser minha companheira nessa jornada, um porto seguro durante as tempestades que a vida (acadêmica) traz. Em mares revoltos, foi águas calmas. Em águas calmas, foi meu chamado, e me impulsionou a velejar fora do conforto, o que foi fundamental para meu crescimento nos últimos anos. Com você compartilhei muitos momentos de felicidade, tornando-a tão real. Espero navegar por muitos anos ao seu lado.

Agradeço aos meus colegas que dividir o ambiente de laboratório (independente de qual), em destaque Philippe Caloba, Bianca Braga, Gabrielle Brum, Amanda Pacheco, Thais Passos e Moisés Neto. Vocês tornaram o pavimentar dessa

estrada mais fácil. E como estrada, espero que minha trajetória facilite o caminho para aqueles que vêm logo em seguida. Agradeço pelos cafés da tarde e pelo carinho.

Agradeço aos meus amigos, pelo apoio, pelas risadas, por participarem comigo da divisão do peso da batalha diária, onde espero ter contribuído também. Em destaque Vivian Grizente, Gabriella Tabet, Luan Oliveira, Bernardo Ferreira, Raphael Angelim, Brandon Khalil, Nicholas Alvares e Natan Orsa.

Agradeço a todos do corpo discente e docente da UFRJ, independente do departamento, que somaram na minha trajetória. Seja doando alíquotas de anticorpo ou de conhecimento, sou muito grato por toda ajuda. Vocês sabem quem são e podem contar sempre comigo. Também agradeço à ajuda de colegas de longe, de São Paulo e dos EUA, em destaque ao Prof. Helder Nakaya e André Nicolau pelos ensinamentos em bioinformática, e ao Tianhao Xu, pela ajuda nos experimentos.

Agradeço ao corpo técnico e administrativo, que tornou e torna tudo mais simples. Agradeço ao Bruno Maia, Triciana Silva e Profª Tais Brunswick pela ajuda na citometria, e ao Leonardo Leal e Sheila Carreiro por me manter nos trilhos.

Agradeço à Profª Juliana Echevarria, pelo cuidado na revisão desta tese e pela colaboração em todos esses anos.

Agradeço à banca examinadora, Profª Adriane Todeschini, Prof. José Carlos Alves Filho, Prof. Martin Bonamino, Profª Marcela Lopes e Profª Luciana Costa.

Por fim, agradeço as agências de fomento pelo suporte financeiro ao trabalho desempenhado neste projeto, em especial, ao programa Fulbright pela bolsa de doutorado sanduíche do prêmio *Doctoral Dissetation Research Award*, a qual me concedeu o suporte para desempenhar experimentos importantes do presente trabalho no laboratório do Prof Gustavo Martinez, na Rosalind Franklin University (North Chicago, IL, EUA).

V

Two roads diverged in a yellow wood,
And sorry I could not travel both
And be one traveler, long I stood
And looked down one as far as I could
To where it bent in the undergrowth;

Then took the other, as just as fair,
And having perhaps the better claim,
Because it was grassy and wanted wear;
Though as for that the passing there
Had worn them really about the same,

And both that morning equally lay
In leaves no step had trodden black.
Oh, I kept the first for another day!
Yet knowing how way leads on to way,
I doubted if I should ever come back.

I shall be telling this with a sigh
Somewhere ages and ages hence:
Two roads diverged in a wood, and I -
I took the one less traveled by,
And that has made all the difference.

(Robert Frost, 1915)

RESUMO

Melo, Gulherme Afonso. O PAPEL DO MODULADOR EPIGENÉTICO CBX4 NA DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD8. Rio de Janeiro, 2023. Doutorado em Imunologia e Inflamação, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

As células T $CD8^+$, componentes cruciais na resposta imune contra patógenos intracelulares e células tumorais, podem se diferenciar nos fenótipos efetor ou de memória, em respostas agudas, ou em células exaustas em respostas crônicas. Esse processo de diferenciação é controlado pela atuação coordenada de reguladores transcricionais e epigenéticos, os quais ainda estão sendo identificados e seus mecanismos moleculares de atuação descritos. Foi demonstrado que o complexo repressor Polycomb (PRC)2 possui papel central na diferenciação de células T $CD8^+$ efetoras, no entanto, é desconhecido se o outro complexo da mesma família, PRC1, também participa desse processo. Neste estudo foi investigado o papel de PRC1, com um enfoque na subunidade Cbx4, na diferenciação de células T $CD8^+$ em modelo de infecção murina viral aguda e crônica por LCMV ou em modelo de diferenciação *in vitro*. Nossos resultados mostraram que Cbx4 favorece a diferenciação de células T $CD8^+$ para o fenótipo efetor, reprimindo o fenótipo e perfil transcricional de memória, e favorece a função efetora destas células, promovendo a expressão de citocinas pró-inflamatórias e atividade citotóxica. Ensaios de superexpressão de mutantes funcionais de Cbx4, revelaram que essas funções são dependentes primariamente dos motivos de interação com SUMO (SIM), responsáveis pela função E3 SUMO ligase da proteína, e em menor parte do cromodomínio de Cbx4, que conecta as atividades de PRC1 com PRC2. Além disso, foi visto que Cbx4 também participa do controle do ciclo celular e sobrevivência de células T $CD8^+$, principalmente através de seu cromodomínio. Por fim, em resposta imune crônica, foi observado que Cbx4 também reprime o fenótipo de células T $CD8^+$ exaustas precursoras, um subconjunto de células T $CD8^+$ exaustas com maior capacidade multipotente e proliferativa. As evidências levantadas neste trabalho adicionam a proteína Cbx4 ao panorama de reguladores da diferenciação de células T $CD8^+$, expandindo o conhecimento sobre os mecanismos moleculares deste processo, e indicam um possível alvo para a melhoria de estratégias terapêuticas.

Palavras-chave: linfócitos T $CD8^+$; epigenética; Polycomb; Cbx4; memória imunológica; exaustão de células T.

ABSTRACT

Melo, Gulherme Afonso. O PAPEL DO MODULADOR EPIGENÉTICO CBX4 NA DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD8$^+$. Rio de Janeiro, 2023. Doutorado em Imunologia e Inflamação, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

CD8$^+$ T cells, crucial components in the immune response against intracellular pathogens and tumor cells, can differentiate into effector or memory phenotype cells, during acute responses, or exhausted cells during chronic responses. This differentiation process is controlled by the coordinated activity of transcriptional and epigenetic regulators, which are still being identified and having their molecular mechanisms described. It was demonstrated that Polycomb repressor complex (PRC)2 plays a central role in the effector CD8$^+$ T cell differentiation, however, it is unknown whether the other Polycomb complex, PRC1, also participates in this process. In this study, the role of PRC1 in the CD8$^+$ T cell differentiation process, with focus on the Cbx4 subunit, was investigated using murine LCMV acute and chronic viral infection models or *in vitro* differentiation models. Our results showed that Cbx4 favors effector CD8$^+$ T cell differentiation, repressing memory phenotype and transcriptional profile, and favors CD8$^+$ T cell effector function by promoting proinflammatory cytokine expression and cytotoxic activity. Overexpression of Cbx4 functional mutants revealed that those functions are mainly dependent on SUMO interaction motifs (SIM), responsible for SUMO E3 ligase function, while less dependent on Cbx4 chromodomain, which connects PRC1 and PRC2 activities. Besides, it was also observed that Cbx4 participates in cell cycle control and survival of CD8$^+$ T cells, mainly through its chromodomain. Furthermore, in chronic immune response, Cbx4 also represses the exhausted precursor CD8$^+$ T cell phenotype, a subset of exhausted CD8$^+$ T cells with higher “stemness” and proliferative capacity. The evidence gathered here add Cbx4 to the panel of CD8$^+$ T cell differentiation regulators, expanding the knowledge regarding the molecular mechanisms of this process and pointing out a possible target for the enhancement of therapeutic strategies.

Keywords: CD8$^+$ T lymphocytes; epigenetics; Polycomb; Cbx4; Immunologic memory; T cell exhaustion.

LISTA DE ABREVIAÇÕES

7-AAD	7-Aminoactinomicina D
ACK	Amônio-Cloreto-Potássio
AP-1	*Activator protein 1*
APC	Células apresentadoras de antígeno
ARF	*Alternate reading frame*
ATAC-Seq	Ensaio para cromatina acessível por transposase associado a sequenciamento
ATF3	*Activating trancription factor 3*
Bach2	*BTB domain and CNC Homolog 2*
BATF	*Basic leucine zipper ATF-like transcription factor*
Bcl	*B cell lymphoma/leucemia*
BCR	Receptor de célula B
BHK21	*Baby Hamster Kidney 21*
Bim	*Bcl-2 interacting mediator of cell death*
Blimp1	*B-lymphocyte-induced maturation protein 1*
Bmi-1	*B cell-specific Moloney murine leucemia virus integration site 1*
CAR-T	Célula T com receptor quimérico de antígeno
Cbx	Chromobox
CCL	Ligante de quimiocina de motivo C-C
CCR	Receptor de quimiocina de motivo C-C
CD	*Cluster of differentiation*
CDKN1C/2A	*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1C/2A*
cDNA	DNA complementar
ChIP	Imunoprecipitação de cromatina
ChIP-qPCR	Imunoprecipitação de cromatina associado a PCR quantitativo
Ck2	Creatin kinase 2
cl13	Clone 13
CLP	Progenitor linfoide comum
co-IP	co-Imunoprecipitação
CpG	5’-C-fosfato-G-3’
cTEC	Células epiteliais tímicas do córtex

CTLA-4	*Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*
CXCL	Ligante de quimiocina de motivo C-X-C
CXCR	Receptor de quimiocina de motivo C-X-C
DAMP	Padrão molecular associado ao dano
DEGs	Genes diferencialmente expressos
DMEM	Meio Eagle modificado de Dulbecco
DN	Timócito duplo negativo
DNA	Ácido deoxirribonucleico
DNMT	DNA metiltransferase
DP	Timócito duplo positivo
EBF1	*EBF transcription factor 1*
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EED	*Embryonic ectoderm development*
EGTA	Ácido etilenoglicol tetra-acético
Eomes	Eomesodermin
ETP	Progenitor tímico precoce
Ezh1/2	*Enhancer of zeste homolog 1/2*
FACS	*Fluorescence-activated cell sorting*
FDR	Taxa de descoberta falsa
FOXO1	*Foxhead box O1*
FOXP3	*Foxhead box P3*
FSC	*Forward scatter*
GO	*Gene Ontology*
gp	Glicoproteína
GSEA	*Gene Set Enrichment Analysis*
H2AK119Ub	Ubiquitinação na lisina 119 da histona H2A
H3K27me3	Trimetilação na lisina 27 da histona H3
H3K4me3	Trimetilação na lisina 4 da histona H3
H3K9me3	Trimetilação na lisina 9 da histona H3
HAT	Histona acetiltransferase
HCl	Ácido clorídrico
HDAC	Histona deacetilase

HEPES	Ácido hidroxietil piperazineetanesulfônico
HMGB1	*High-mobility group box 1*
HSC	Célula-tronco hematopoiética
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
ICAM-1	*Intercellular adhesion molecule 1*
ICOS	*Inductible T cell costimulator*
ID2/3	Inhibitor of DNA binding 2/3
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IL-2Rα	Cadeia alfa (α) do receptor de IL-2
IL-7Rα	Cadeia alfa (α) do receptor de IL-7
ILC	Células linfoides inatas
INK4A	*Inhibitors of CDK4a*
IP	Imunoprecipitação
Irf4	*Interferon regulatory factor 4*
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
Jarid2	*Jumonji and AT-rich interaction domain containing 2*
KDM	Lisina demetilase
KLRG1	*Killer cell lectin like receptor G1*
KMT	Lisina metiltransferase
KO	Nocaute
LAG-3	*Lymphocyte activating 3*
LC:MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas
Lck	Lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase
LCMV	Vírus da coriomeningite linfocítica
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
lncRNA	RNA longo não codificante
Log2FC	*Log_2 fold change*
LPS	Lipopolissacarídeo
m/hESCS	Célula-tronco embrionária murina/humana

MALT	Tecidos linfoides associados a mucosa
MHC	Major histocompatiiblity complex (Complexo principal de histocompatibilidade)
MOI	Multiplicidade de infecção
MSCV	Vírus de célula-tronco murina
mTEC	Células epiteliais tímicas da medula
mTORC1	*Mammalian target of rapamycin complex 1*
NES	Pontuação de enriquecimento normalizada
NFAT	*Nuclear factor of activated T cell*
NF-κB	*Nuclear factor of kappa B*
NK	*Natural killer*
NR4A	*Nuclear receptor subfamily 4A*
PAMP	Padrão molecular associado a patógenos
PAX5	*Paired box 5*
PBS	Tampão salino fosfato
PcG	Grupo Polycomb
PCGF	*Polycomb group ring finger*
PD-1	*Programmed cell death 1*
PI	Iodeto de propídeo
PI3K	*Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase*
PMA	Phorbol-12-miristato-13-acetato
PRC	Complexo repressor Polycomb
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
qPCR	PCR quantitativo
RAG	*Recombination activating gene*
Ras	*Rat sarcoma*
RBBP	*RB binding protein*
Ring1A/B	*Really Interesting New Gene* 1A/B
RIPA	Ensaio de Radioimunoprecipitação
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-Seq	Sequenciamento de RNA
ROR-γT	*Retinoic-related orphan receptor-gamma*

RT-qPCR	PCR de transcrição reversa quantitativo
Runx	*Runt-related transcription factor*
RV	Retrovírus
RYBP	*Ring1 and YY1 binding protein*
scATAC-Seq	Ensaio para cromatina acessível por transposase associado a sequenciamento de célula única
scRNA-Seq	Sequenciamento de RNA de célula única
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
shRNA	*Short hairpin RNA*
SIM	Motivo de interação com SUMO
SSC	*Side scatter*
STAT	*Signal transducer and activator of transcription*
SUMO	*Small Ubiquitin modifier*
Suz12	*Supressor of zeste 12*
SWI/SNF	*Switch/Sucrose non-fermentable*
T-bet	*T-box expressed in T cells*
TBS	Tampão salino Tris
TBST	Tampão salino Tris com Tween-20
Tcf-1	*T Cell Factor 1*
T_{CM}	Célula T $CD8^+$ de memória central
TCR	Receptor de célula T
T_{EM}	Célula T $CD8^+$ de memória efetora
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
T_{EX}	Célula T $CD8^+$ exausta
TGF-β	*Transforming growth factor beta*
T_H	Célula T $CD4^+$ auxiliadora
ThPOK	*T-Helper-Inducing POZ/Krueppel-Like-Factor*
TIGIT	*T Cell Immunoreceptor with Ig and ITIM Domains*
TIM-3	*T Cell Immunoglobulin Mucin 3*
T_{MEM}	Célula T $CD8^+$ de memória

T_{MPEC}	Célula T $CD8^+$ efetoras precursoras de memória
TNF	*Tumor necrosis factor*
Tox	*Thymocyte selection associated high mobility group box*
T_{PEX}	Célula T $CD8^+$ exausta precursora
T_{REG}	Célula T $CD4^+$ Reguladora
T_{RM}	Célula T $CD8^+$ de memória residente
T_{SLEC}	Célula T $CD8^+$ efetora de vida curta
TSS	*Transcription starting site*
T_{TE}	Célula T $CD8^+$ efetora terminal
UFC	Unidade formadora de colônia
UFP	Unidade formadora de plaque
YAF2	*YY1 associated factor 2*
ZAP70	*Zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70*
ZEB2	*Zinc finger E-box binding Homeobox 2*
α-MEM	Meio Eagle modificado alfa

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. As principais características da ativação e função efetora de células T CD8.....37

Figura 2. A resposta e diferenciação de células T CD8$^+$ em contextos de resposta aguda.....39

Figura 3. A diferenciação de células T CD8$^+$ no fenótipo efetor e de memória.....44

Figura 4. As principais características da exaustão de células T CD8$^+$ e as subpopulações de células T CD8$^+$ exaustas.....46

Figura 5. O nucleossomo e as modificações pós-traducionais de histonas.....50

Figura 6. Os complexos repressores Polycomb 1 e 2.....61

Figura 7. O papel relatado de proteínas Polycomb em células T CD8.....70

Figura 8. Esquematização da hipótese de que PRC1 participa da regulação da diferenciação de células T CD8$^+$ em colaboração com PRC2.....72

Figura 9. Desenho experimental para a análise de células T CD8$^+$ P14 deficientes em subunidades de PRC1 diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV.....100

Figura 10. Análise fenotípica de células T CD8$^+$ P14 deficientes em Ring1 diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV em fase aguda da resposta (8º dia pós-infecção).....101

Figura 11. Análise fenotípica de células T CD8$^+$ P14 deficientes em *Cbx4* diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV em fase aguda da resposta (8º dia pós-infecção).....102

Figura 12. Análise fenotípica de células T CD8$^+$ P14 deficientes em Scml2 diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV em fase aguda da resposta (8º dia pós-infecção).....103

Figura 13. Análise do perfil transcricional por RNA-Seq de células T CD8$^+$ P14 deficientes em subunidades do PRC1.....106

Figura 14. Análise de enriquecimento de vias utilizando genes diferencialmente expressos em células T CD8^{+} P14 deficientes em Cbx4.....108

Figura 15. Análise do perfil transcricional de células T CD8^{+} P14 deficientes em Cbx4 nas subpopulações KLRG1^{Hi} e KLRG1^{Lo}.....110

Figura 16. Esquemas de abordagens metodológicas para a manipulação da expressão do gene Cbx4 em células murinas.....112

Figura 17. Desenho experimental para a análise de células T CD8^{+} murinas deficientes em Cbx4 polarizadas para o fenótipo tipo efetor ou tipo memória *in vitro*.....114

Figura 18. Validação da estratégia de silenciamento gênico de Cbx4 em células T CD8^{+} murinas polarizadas para o fenótipo tipo efetor ou tipo memória *in vitro*.....115

Figura 19. Análise da expansão acumulada de células T CD8^{+} deficientes em Cbx4 polarizadas para o fenótipo tipo efetor ou tipo memória *in vitro*.....116

Figura 20. Desenho experimental para a análise de morte celular e de estágios do ciclo celular de células T CD8^{+} murinas deficientes em Cbx4 polarizadas para o fenótipo tipo memória *in vitro*.....117

Figura 21. Análise da morte celular de células T CD8^{+} deficientes em Cbx4 polarizadas para o fenótipo tipo memória *in vitro*.....117

Figura 22. Análise do ciclo celular de células T CD8^{+} deficientes em Cbx4 polarizadas para o fenótipo tipo memória *in vitro*.....119

Figura 23. Expressão de moléculas de superfície em células T CD8^{+} deficientes em Cbx4 cultivadas *in vitro*.....121

Figura 24. Análise da funcionalidade de células T CD8^{+} deficientes em Cbx4 cultivadas *in vitro*.....122

Figura 25. Análise funcional de células T CD8^{+} P14 deficientes em Cbx4 em ensaio de citotoxicidade *in vitro*.....124

Figura 26. Desenho experimental para a análise da diferenciação de células T CD8^{+} de camundongos Cbx4$^{fl/fl}$ e Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre} (Cbx4 T KO) em resposta a infecção viral aguda por LCMV.....125

Figura 27. Análise fenotípica de células T CD8$^+$ de animais Cbx4 T KO diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV em fase aguda da resposta (8º dia pós-infecção).....128

Figura 28. Análise funcional de células T CD8$^+$ de animais Cbx4 T KO diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV em fase aguda da resposta (8º dia pós-infecção).....130

Figura 29. Análise fenotípica de células T CD8$^+$ de animais Cbx4 T KO diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV em fase tardia da resposta (60º dia pós-infecção).....133

Figura 30. Análise funcional de células T CD8$^+$ de animais Cbx4 T KO diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV em fase tardia da resposta (60º dia pós-infecção).....134

Figura 31. Desenho experimental para a análise da diferenciação de células T CD8$^+$ policlonais de camundongos Cbx4$^{fl/fl}$ e Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre} (Cbx4 T KO) em resposta secundária a *Listeria monocytogenes*-GP33.....135

Figura 32. Análise fenotípica de células T CD8$^+$ de animais Cbx4 T KO diferenciadas em resposta secundária a *Listeria monocytogenes*-GP33.....137

Figura 33. Análise funcional de células T CD8$^+$ de animais Cbx4 T KO diferenciadas em resposta secundária a *Listeria monocytogenes*-GP33.....139

Figura 34. Desenho experimental para a análise de células T CD8$^+$ murinas superexpressando diferentes construções de Cbx4 polarizadas *in vitro* para o fenótipo tipo memória.....140

Figura 35. Análise da expansão acumulada de células T CD8$^+$ superexpressando diferentes construções de Cbx4 cultivadas *in vitro* em condições polarizantes para o fenótipo tipo memória.....141

Figura 36. Análise fenotípica de células T CD8$^+$ superexpressando diferentes construções de Cbx4 cultivadas *in vitro* em condições polarizantes para o fenótipo tipo memória.....143

Figura 37. Análise da funcionalidade de células T CD8$^+$ superexpressando Cbx4 cultivadas *in vitro* em condições polarizantes para o fenótipo tipo memória.....146

Figura 38. Desenho experimental para a análise de células T CD8$^+$ P14 superexpressando diferentes construções de Cbx4 diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV.....147

Figura 39. Análise fenotípica de células T CD8$^+$ P14 superexpressando diferentes construções de *Cbx4* diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV em fase aguda da resposta (8º dia pós-infecção).....149

Figura 40. Análise funcional de células T CD8$^+$ P14 superexpressando *Cbx4* diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV em fase aguda da resposta (8º dia pós-infecção).....151

Figura 41. Quantificação da expressão gênica de *Tcf7* em células T CD8$^+$ murinas polarizadas para o fenótipo tipo efetor ou tipo memória *in vitro*.....153

Figura 42. Quantificação da expressão gênica de fatores de transcrição relacionados ao fenótipo efetor e de memória em células T CD8$^+$ murinas superexpressando Cbx4 polarizadas para o fenótipo tipo memória *in vitro*.....154

Figura 43. Quantificação da expressão gênica de *Myb* em células T CD8$^+$ murinas deficientes em Cbx4 ou superexpressando Cbx4 cultivadas *in vitro*.....155

Figura 44. Imunoprecipitação da cromatina seguido de qPCR (ChIP-qPCR) de DNA genômico associado a marca repressora de PRC1 H2AK119Ub.....157

Figura 45. Análise do repertório de proteínas SUMOiladas em células T CD8$^+$ cultivadas *in vitro*.....159

Figura 46. Identificação das proteínas SUMOiladas em células T CD8$^+$ cultivadas *in vitro* e polarizadas para o fenótipo tipo efetor por co-IP seguido de LC:MS.....162

Figura 47. Análise da acessibilidade da cromatina por ATAC-Seq de células T CD8$^+$ P14 deficientes em subunidades do PRC1.....165

Figura 48. Desenho experimental para a análise da diferenciação de células T CD8$^+$ de camundongos Cbx4$^{fl/fl}$ e Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre} (Cbx4 T KO) em resposta a infecção viral crônica por LCMV.....166

Figura 49. Análise fenotípica de células T CD8$^+$ de animais Cbx4 T KO diferenciadas em resposta a infecção viral crônica por LCMV.....168

Figura 50. Análise subpopulações em diferentes estágios de exaustão de células T CD8$^+$ de animais Cbx4 T KO diferenciadas em resposta a infecção viral crônica por LCMV.....170

Figura 51. Análise da expressão de fatores de transcrição associados ao fenótipo efetor ou de memória em células T CD8$^+$ de animais Cbx4 T KO diferenciadas em resposta a infecção viral crônica por LCMV.....171

Figura 52. Análise funcional de células T CD8$^+$ de animais Cbx4 T KO diferenciadas em resposta a infecção viral crônica por LCMV.....172

Figura 53. Resumo gráfico dos principais resultados.....175

Lista de tabelas

Tabela 1. Listagem de anticorpos fluorescentes utilizados em experimentos de análise por citometria de fluxo e FACS.....84

Tabela 2. Listagem de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados em experimentos de análise de expressão gênica por RT-qPCR.....88

Sumário

1 INTRODUÇÃO 25

1.1 Aspectos básicos de sistema imune 25

1.1.1 A imunidade adaptativa 26

1.2 A linhagem de células T 28

1.2.1 Tipos de células T convencionais (TCRαβ) 30

1.3 A ativação e resposta de células T CD8$^+$ 33

1.3.1 O encontro de células T CD8$^+$ com células APC 33

1.3.2 Os três sinais para a ativação de células T CD8$^+$ 34

1.3.3 O processo de expansão e diferenciação de células T CD8$^+$ pós-ativação 37

1.3.4 As subpopulações de células T CD8$^+$ de memória 39

1.4 A diferenciação de células T CD8$^+$ no fenótipo efetor ou de memória 41

1.4.1 A diferenciação de células T CD8$^+$ no fenótipo de exaustão 44

1.5 A regulação transcricional e epigenética de células T CD8$^+$ em resposta imune aguda e crônica 47

1.5.1 Epigenética: Conceitos e mecanismos 47

1.5.2 A regulação transcricional e epigenética na diferenciação para o fenótipo efetor ou memória 51

1.5.3 A regulação transcricional e epigenética na diferenciação para o fenótipo de exaustão . 55

1.5.4 O papel chave da regulação epigenética na diferenciação de células T CD8$^+$ 58

1.6 Os complexos repressores Polycomb 1 e 2 59

1.7 O papel das proteínas Polycomb em células T 65

1.7.1 O papel das proteínas Polycomb no desenvolvimento de células T 65

1.7.2 O papel das proteínas Polycomb na diferenciação de células T CD4$^+$ 66

1.7.3 O papel das proteínas Polycomb na diferenciação de células T CD8$^+$ 67

2 JUSTIFICATIVA 70

3 OBJETIVOS 72

4 METODOLOGIA 73

4.1 Camundongos 73

4.2 Isolamento de células T CD8⁺ *naïve* de camundongos 74

4.3 Cultivo *in vitro* de células T CD8⁺ e diferenciação em fenótipo tipo efetor e fenótipo tipo memória 75

4.4 Transdução de células T CD8⁺ ativadas e diferenciadas *in vitro* com partículas retrovirais 77

4.5 Propagação *in vitro* de vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) 79

4.6 Modelo de infecção viral aguda e crônica por LCMV e transferência adotiva de células T CD8⁺ transduzidas *in vitro* 79

4.7 Titulação de carga viral de LCMV por ensaio de plaque 80

4.8 Reestimulo de células T CD8⁺ para análise da funcionalidade por citometria de fluxo 81

4.9 Citometria de fluxo e FACS 82

4.10 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* 85

4.11 Análise do perfil transcricional de células T CD8⁺ através de sequenciamento de RNA (RNA-Seq) 86

4.12 Análise da expressão gênica por reação de transcrição reversa seguida de PCR quantitativo (RT-qPCR) 87

4.13 Ensaio de imunoprecipitação de cromatina seguido de PCR quantitativo (ChIP-qPCR) 89

4.14 Análise das fases do ciclo celular de células T CD8⁺ cultivadas *in vitro* 90

4.15 Análise da morte celular de células T CD8⁺ cultivadas *in vitro* 91

4.16 Preparo de extratos proteicos, quantificação de proteínas e *Western blotting* 92

4.17 Análise do perfil de proteínas SUMOiladas em células T CD8⁺ cultivadas *in vitro* por co-imunoprecipitação seguido de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas .. 95

4.18 Análise do perfil de acessibilidade de cromatina de células T CD8⁺ por ATAC-Seq 97

4.19 Análise estatística 98

5 RESULTADOS 98

5.1 Análise do papel de membros do PRC1 na diferenciação de células T CD8 98

5.2 Análise do perfil transcricional de células T CD8⁺ deficientes para subunidades de PRC1103

5.3 Abordagens metodológicas e modelos de diferenciação para a investigação do papel de Cbx4 na diferenciação e função de células T CD8⁺ 110

5.4 Análise do impacto da deficiência em Cbx4 em células T CD8⁺ cultivadas *in vitro* em condições polarizantes para o fenótipo tipo efetor ou tipo memória 113

5.4.1 Análise da expansão de células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 polarizadas *in vitro* para o fenótipo tipo efetor ou tipo memória 115

5.4.2 Análise da morte celular e de estágios do ciclo celular de células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 polarizadas para o fenótipo tipo memória 116

5.4.3 Análise fenotípica de células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4 polarizadas *in vitro* para o fenótipo tipo efetor ou tipo memória..... 119

5.5 Análise funcional de células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4 polarizadas *in vitro* para o fenótipo tipo memória..... 121

5.6 Análise da diferenciação de células T CD8$^+$ policlonais de camundongos Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre} (Cbx4 T KO) em resposta primária a infecção aguda por LCMV..... 124

5.6.1 Modelo de infecção viral aguda, 8º dia pós-infecção (fase aguda)..... 125

5.6.1.1 Análise fenotípica (LCMV-Arm, 8º dia pós-infecção)..... 125

5.6.1.2 Análise funcional (LCMV-Arm, 8º dia pós-infecção)..... 129

5.6.2 Modelo de infecção viral aguda, 60º dia pós-infecção (tempo tardio)..... 130

5.6.2.1 Análise fenotípica (LCMV-Arm, 60º dia pós-infecção) 130

5.6.2.2 Análise funcional (LCMV-Arm, 60º dia pós-infecção) 134

5.7 Análise da diferenciação de células T CD8$^+$ policlonais de camundongos Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre} (Cbx4 T KO) em resposta secundária a *Listeria monocytogenes*-GP33 135

5.7.1 Análise fenotípica (*L. monocytogenes*-GP33, 4º dia pós-infecção)..... 135

5.7.2 Análise funcional (*L. monocytogenes*-GP33, 4º dia pós-infecção)..... 138

5.8 Análise da diferenciação e função de células T CD8$^+$ superexpressando Cbx4 cultivadas *in vitro* em condições polarizantes para o fenótipo tipo memória..... 139

5.8.1 Análise da expansão de células T CD8$^+$ superexpressando Cbx4 cultivadas *in vitro* em condições polarizantes para o fenótipo tipo memória..... 141

5.8.2 Análise fenotípica de células T CD8$^+$ superexpressando Cbx4 cultivadas *in vitro* em condições polarizantes para o fenótipo tipo memória..... 142

5.8.3 Análise funcional de células T CD8$^+$ superexpressando Cbx4 cultivadas *in vitro* em condições polarizantes para o fenótipo tipo memória..... 144

5.9 Análise da diferenciação de células T CD8$^+$ superexpressando Cbx4 em modelo de infecção viral aguda por LCMV 146

5.9.1 Análise fenotípica (LCMV-Arm, 8º dia pós-infecção)..... 147

5.9.2 Análise funcional (LCMV-Arm, 8º dia pós-infecção)..... 150

5.10 Investigação dos mecanismos moleculares através dos quais PRC1 e Cbx4 regulam a diferenciação de células T CD8$^+$ 151

5.10.1 Papel de Cbx4 na regulação transcricional de fatores de transcrição chave para a aquisição do fenótipo de memória em células T CD8$^+$..... 152

5.10.2 Papel do PRC1 na regulação epigenética de Tcf-1, fator de transcrição chave para a aquisição do fenótipo de memória em células T CD8$^+$..... 156

5.10.2.1 Investigação do perfil de proteínas SUMOiladas e da função E3 SUMO ligase de Cbx4 em células T CD8$^+$ cultivadas *in vitro* 157

5.11 Análise do papel de Cbx4 na regulação da acessibilidade da cromatina de células T CD8$^+$ diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV 162

5.12 Análise da diferenciação de células T CD8$^+$ policlonais de camundongos Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre} (Cbx4 T KO) em resposta primária a infecção crônica por LCMV 165

5.12.1 Análise fenotípica (LCMV-cl13, 45º dia pós-infecção)..... 166

5.12.2 Análise funcional (LCMV-cl13, 45º dia pós-infecção)..... 171

6 DISCUSSÃO 173

6.1 Cbx4 reprime a diferenciação para o fenótipo de memória e favorece a diferenciação para o fenótipo efetor 176

6.1.1 Discrepância entre os modelos: Condições diferentes de ativação e diferenciação de células T CD8$^+$..... 177

6.1.2 Discrepância entre os modelos: Efeitos compensatórios no modelo de Cbx4 T KO (Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre}) 179

6.2 Cbx4 regula a geração e manutenção de células T CD8$^+$ de memória..... 181

6.2.1 Cbx4 controla a população de células KLRG1$^+$CD127$^+$ 182

6.2.2 Cbx4 regula o ciclo celular, sobrevivência e proliferação e pode estar envolvido com a senescência de células T CD8$^+$..... 183

6.3 Cbx4 regula a diferenciação de células T CD8$^+$ principalmente através de seus motivos de interação com SUMO e parcialmente através do cromodomínio..... 187

6.4 Cbx4 regula a função efetora e de memória de células T CD8$^+$ 191

6.5 Cbx4 reprime diferenciação de células T CD8$^+$ exaustas precursoras 194

6.6 Considerações Finais 197

7 CONCLUSÕES 198

8 PERSPECTIVAS.....199

ANEXO A – Publicação de artigo de revisão em periódico**.....221**

ANEXO B – Publicação de artigo em repositório aberto de pré-publicação (Biorxiv) **.....236**

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos básicos de sistema imune

O sistema imune, ou sistema imunitário, é constituído por um conjunto de mecanismos e agentes envolvidos na proteção de organismos (hospedeiros) contra microrganismos invasores (Ex: bactérias e vírus), agentes nocivos (Ex: toxinas) e doenças (Ex: câncer), e na manutenção e retorno do organismo para um estado de saúde e equilíbrio (homeostase) (DELVES; ROITT, 2000a; MEDZHITOV, 2008; PARKIN; COHEN, 2001). A clássica divisão das respostas imunes em inata e adaptativa, de acordo com velocidade e especificidade de seus mecanismos, favorece a compreensão aprofundada dos processos efetores e regulatórios do sistema imune, bem como da interdependência entre eles (DELVES; ROITT, 2000a; PARKIN; COHEN, 2001).

A resposta imune inata, primeira linha de defesa do organismo, conta com mecanismos de defesa constitutivos, como funções de barreira das superfícies epiteliais e da mucosa e a produção de peptídeos e enzimas antimicrobianos, além de mecanismos induzíveis dependentes da ação efetora de diversos tipos celulares (DELVES; ROITT, 2000a; MEDZHITOV; JANEWAY, 2000; PARKIN; COHEN, 2001). O sistema inato é composto por uma maioria de células da linhagem mieloide, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos, algumas das células da linhagem linfoide, incluindo as células NK e células linfoides inatas (ILCs, do inglês *Innate lymphoid cells*), além de células epiteliais de função especializada (DELVES; ROITT, 2000a; PARKIN; COHEN, 2001).

Uma grande parte dos mecanismos inatos é desencadeada após o reconhecimento de sinais associados a microrganismos invasores ou ao dano do organismo, os padrões moleculares associados a microrganismos invasores (PAMPs, do inglês *Pathogen-associated molecular patterns*), como o lipopolissacarídeo (LPS), ou associados ao dano (DAMPs, do inglês *Damage-associated molecular patterns*), como a proteína HMGB-1 (do inglês *High-mobility group box 1*) extracelular, respectivamente (BIANCHI, 2007; KAWAI; AKIRA, 2010; MEDZHITOV; JANEWAY, 2000). O reconhecimento de PAMPs e DAMPs é mediado por receptores chamados de PRRs (do inglês *Pattern recognition receptors*). Já a resposta imune adaptativa, mediada por células T e B da linhagem linfoide, cuja indução depende de processos

da imunidade inata, possui alta especificidade a determinantes moleculares, os antígenos, e é responsável pela aquisição da memória imunitária de forma específica (DELVES; ROITT, 2000a; PARKIN; COHEN, 2001). As células da imunidade inata não só são cruciais para a apresentação de antígenos para linfócitos, como favorecem o seu recrutamento, através da indução de processos inflamatórios, além de guiarem a sua diferenciação. Os tipos de PAMPs e DAMPs detectados em uma resposta imune, e consequentemente, o tipo de perturbação que incide sobre o hospedeiro, determina a especialização das células do sistema imune adaptativo, como será descrito em maiores detalhes a seguir (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015).

O entendimento de como sinais recebidos por linfócitos são processados e elaborados em perfis específicos de diferenciação é tópico de intenso interesse no campo da imunologia molecular (CHANG; WHERRY; GOLDRATH, 2014; CHEN et al., 2018c; KAECH; CUI, 2012; XU; PEREIRA; MARTINEZ, 2021). A compreensão desses mecanismos é crítica não só para a elucidação dos processos adaptativos de defesa (tanto imediatos quanto duradouros), mas para a manipulação racional e eficiente de leucócitos em protocolos de imunização e imunoterapia. Em particular, no presente projeto, focamos em atores centrais do processo de regulação da expressão gênica no controle da diferenciação de linfócitos T $CD8^+$, células fundamentais para a resposta imune contra patógenos intracelulares e células tumorais (HARTY; TVINNEREIM; WHITE, 2000; SHANKARAN et al., 2001).

Nos tópicos de introdução a seguir serão descritos conceitos básicos do sistema imune (com ênfase na imunidade adaptativa e na linhagem de células T) e serão relatadas as principais descobertas e evidências a respeito do processo de diferenciação de células T $CD8^+$, com um enfoque especial na regulação transcricional e epigenética envolvida neste processo.

1.1.1 A imunidade adaptativa

As células T e células B podem reconhecer um antígeno, como por exemplo, um microrganismo patogênico ou uma toxina, através de receptores de antígeno de superfície que possuem especificidade e afinidade contra uma determinada estrutura molecular, chamados de Receptores de Células T (TCR, do inglês "*T cell receptor*") ou Receptores de Células B (BCR, do inglês "*B cell receptor*"), respectivamente. A especificidade no receptor concede um direcionamento preciso da resposta a um

determinado alvo, característica importante uma vez que as células da imunidade adaptativa exercem mecanismos efetores bastante robustos e potentes (DELVES; ROITT, 2000a; PARKIN; COHEN, 2001). A alta especificidade de TCRs e BCRs é produto de um processo de extensa recombinação somática de segmentos gênicos V(D)J que compõem a sequência codificante dos genes dessas proteínas pela atividade de enzimas, incluindo as recombinases RAG1 e RAG2. Esse processo de recombinação, que ocorre durante o desenvolvimento dessas células, promove a geração de um alto repertório de receptores TCRs e BCRs, que são expressos unicamente em diferentes células T e B, respectivamente (DELVES; ROITT, 2000a; SCHWARTZ, 2003).

As fases finais de desenvolvimento, ou amadurecimento, das células T e B se passam nos órgãos linfoides primários timo e medula óssea, respectivamente (PARKIN; COHEN, 2001). Finalizado o desenvolvimento, as células maduras são exportadas dos órgãos linfoides primários pela circulação sanguínea periférica e linfática. As células B e T maduras que recirculam e ainda não encontraram a molécula pela qual seu receptor é específico, as células virgens ou *naïve*, residem em órgãos linfoides secundários conectados pelo sistema circulatório, incluindo o baço, linfonodos e tecidos linfoides associados a mucosa (MALT, do inglês *Mucosa-associated lymphoid tissues*) (DELVES; ROITT, 2000b; PARKIN; COHEN, 2001). Nesses ambientes, as células T e B interagem com células do sistema imune inato, que as auxiliam no reconhecimento de antígenos. O processo de reconhecimento e apresentação de antígenos é uma etapa fundamental para a ativação das células da imunidade adaptativa e, com mencionado anteriormente, depende do funcionamento cooperativo com as células da imunidade inata (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015).

Após a ativação, as células T e B entram em um processo de proliferação celular, e parte das células geradas passa a exercer seus mecanismos efetores que incluem: (i) a produção de anticorpos, ou imunoglobulinas, exclusivamente por células B, que auxiliam na neutralização de antígenos e na atuação de outras células e na indução de outros mecanismos imunes; (ii) a liberação de diversas citocinas, que controlam o funcionamento de outras células do sistema imune e; (iii) a capacidade de matar outras células infectadas ou alteradas, principalmente por células T do subtipo CD8 (T $CD8^+$). Esses mecanismos, apesar de mais demorados em comparação aos da imunidade inata, são mais robustos e frequentemente essenciais

para o controle de uma ameaça ao organismo (DELVES; ROITT, 2000b; IWASAKI; MEDZHITOV, 2015; PARKIN; COHEN, 2001).

Além dos mecanismos efetores, as células T e B possuem a capacidade de gerar a memória imunitária. Após ativadas, as células T e B expandem e se especializam, ou se diferenciam, em duas populações com fenótipo distintos: o fenótipo efetor, relacionado à proteção do hospedeiro e ao retorno do organismo à homeostase e; o fenótipo de memória, cujas células possuem um grau limitado da capacidade de exercer seus mecanismos efetores, ou ainda a ausência deles, permanecendo quiescentes e recirculando entre os órgãos linfoides secundários (DELVES; ROITT, 2000b; PARKIN; COHEN, 2001). As células de memória apesar de não contribuírem de forma significativa para a eliminação do antígenono curso da resposta imune que as gerou, possuem um enorme impacto para encontros futuros do organismo com esse mesmo antígeno(DELVES; ROITT, 2000a). Nesse contexto, a resposta que culmina na ativação de uma célula T ou B *naïve* é chamada de resposta primária, enquanto respostas consecutivas engatilhadas pelo reencontro de células de memória com o antígeno são chamadas de resposta secundária, terciária etc. É importante frisar que a reativação de células T e B de memória possui o potencial de gerar uma resposta imune mais robusta e mais rapidamente recrutada comparada à resposta primária, demonstrando a sua importância para a imunidade do hospedeiro (CUI; KAECH, 2010; DELVES; ROITT, 2000a).

1.2 A linhagem de células T

O desenvolvimento da linhagem de células T se inicia nas células progenitoras hematopoiéticas (HSC, do inglês *Haematopoietic Stem Cells*) da medula óssea. O início da timopoiese é marcado pela migração de CLPs (do inglês *Common lymphoid progenitor*) para o timo e diferenciação no progenitor tímico precoce (ETP, do inglês *Early Thymic Progenitor*), que por sua vez se diferencia em diferentes estágios de células progenitoras, os timócitos (AKASHI et al., 2000; DE OBALDIA; BHANDOOLA, 2015; HOSOKAWA; ROTHENBERG, 2021; ROTHENBERG, 2014).

O desenvolvimento de timócitos em células T maduras é dividido em dois grandes estágios caracterizados pela expressão dos correceptores CD4 e CD8 na superfície: a fase duplo negativa (DN), onde não expressam nenhum dos correceptores ($CD4^-CD8^-$) (subdividida nas nos estágios DN2a, DN2b, DN3a, DN3b e

DN4), e a fase dupla positiva (DP) ($CD4^+CD8^+$). No estágio DN, os timócitos podem realizar o rearranjo da cadeia β do TCR e se comprometer com a linhagem de células T convencionais ($CD4^+$ ou $CD8^+$), que expressam um TCR composto por cadeias α e β; ou, paralelamente, podem rearranjar genes que codificam as cadeias semi-invariantes γ e δ, que forma o complexo TCR γδ (HOSOKAWA; ROTHENBERG, 2021; ROTHENBERG, 2014). O rearranjo bem-sucedido da cadeia β determina uma série de etapas que irão culminar na transição para a fase DP e recombinação do *locus* da cadeia α do TCR, com a geração de um TCRαβ maduro. As DP passam então por processos de seleção antes da geração de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ (HOSOKAWA; ROTHENBERG, 2021; ROTHENBERG, 2014).

Os processos de seleção que ocorrem no timo, bem como a função de células T convencionais na periferia dependem fundamentalmente da sua habilidade de reconhecer antígenos proteicos através de seu TCR. Esse reconhecimento, como citado anteriormente, é mediado pelo auxílio de outras células do sistema imune. No caso da apresentação de antígenos para células T, esse processo necessariamente dependente de células apresentadoras de antígeno (APC, do inglês *Antigen Presenting Cells*). A principal APC é a célula dendrítica, porém neste grupo também se incluem os macrófagos, células B e células epiteliais tímicas. Para que sejam apresentados, os antígenos proteicos são processados no interior das APCs e pequenos fragmentos peptídicos (epítopos) são conjugados a um complexo molecular expresso na superfície celular chamado de complexo de histocompatibilidade principal (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*). MHCs podem se apresentar em duas construções diferentes: (i) o MHC de classe I (MHC-I), reconhecido por células T $CD8^+$ e; o MHC de classe II (MHC-II), reconhecido por células T $CD4^+$. Geralmente, o complexo MHC-I realiza a apresentação de peptídeos gerados a partir do processamento de antígenos encontrados no meio intracelular (citosol), enquanto o complexo MHC-II apresenta peptídeos de antígenos extracelulares presentes em vesículas endossomais, captados por fagocitose ou endocitose, entretanto exitem exceções (PISHESHA; HARMAND; PLOEGH, 2022).

A apresentação do peptídeo no contexto da molécula de MHC é necessária para o reconhecimento do antígeno e a ativação da célula T, conceito cunhado como restrição ao MHC (ZINKERNAGEL; DOHERTY, 1974). Portanto, é fundamental que o TCR possua afinidade e seja capaz de interagir não somente com o epítopo para o

qual é específico, mas também com a própria molécula de MHC. Os timócitos DP entram em contato com células epiteliais do córtex do timo (cTEC, do inglês *Cortex Thymic Epithelial Cells*), que apresentam moléculas de MHC carregando peptídeos próprios (TAKABA; TAKAYANAGI, 2017). O sucesso na interação entre o TCR da célula DP o MHC das cTECs engatilha sinais de sobrevivência, o aumento na expressão do complexo TCRαβ e a diferenciação para o estágio simples positivo (SP, do inglês *Single positive*), onde ocorre o comprometimento com a linhagem de célula T $CD4^+$ ou T $CD8^+$ determinado pelo reconhecimento pelo TCR do MHC-II ou MHC-I, respectivamente. A diferenciação nos fenótipos T $CD4^+$ ou T $CD8^+$ é principalmente dirigida através da aquisição de programas transcricionais regulados pela ativação mutuamente exclusiva dos fatores de transcrição ThPOK ou Runx3, respectivamente (DE OBALDIA; BHANDOOLA, 2015; TANIUCHI, 2018). Células DP incapazes de reconhecer e interagir com o MHC das cTECs sofrem apoptose pela ausência da sinalização de sobrevivência e são eliminadas (em um processo chamado “morte por negligência”) (KYEWSKI; KLEIN, 2006).

As células SP entram em contato com células epiteliais da medula do timo (mTEC) e células dendríticas, expressando MHCs carregados com uma vasta variedade de antígenos próprios, que contempla todo o repertório de proteínas expressas no organismo (DERBINSKI et al., 2001; ST-PIERRE et al., 2015). A maioria das SP expressando um TCR com alta afinidade por MHCs carregados com antígenos próprios, ou seja, demonstrando auto reatividade para proteínas próprias do organismo, são eliminados no processo de seleção negativa, um dos principais mecanismos de tolerância central (KYEWSKI; KLEIN, 2006). No entanto, um grupo menor de clones com alta reatividade ao complexo MHC:peptídeo próprio de mTECs escapa da morte celular programada e se diferenciam em células T que dão origem a subpopulação de células T_{REG} de origem tímica (TAKABA; TAKAYANAGI, 2017).

Os tímócitos que sobrevivem às seleções positiva e negativa completam seu desenvolvimento e atingem ao estado diferenciado de células T $CD4^+$ ou $CD8^+$ maduras *naïve*. Ao fim do seu amadurecimento, as células T *naïve* ganham a habilidade de direcionamento para órgãos linfoides secundários e migram para a periferia, onde recirculam até que encontrem o antígeno para qual seu TCR é específico e se ativem (ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2004).

1.2.1 Tipos de células T convencionais (TCRαβ)

As células T $CD4^+$, também chamadas de células T auxiliadoras (ou *helper*; T_H), apresentam uma função efetora variada e se diferenciam em fenótipos distintos envolvidos no auxílio ou regulação da função efetora de outras células do sistema imune através da produção de citocinas e quimiocinas que ativam, estimulam, recrutam ou reprimem outros tipos celulares (DELVES; ROITT, 2000b; PARKIN; COHEN, 2001). A caracterização da função efetora de células T_H levou à divisão dessa linhagem em diferentes subconjuntos sendo os principais: as células T_{H1}, as células T_{H2}, as células T_{H17}, as células T_{REG} e as células T_H foliculares (T_{FH}) (SARAVIA; CHAPMAN; CHI, 2019).

A diferenciação de células T $CD4^+$ para cada subtipo (com exceção das células T_{REG} geradas no timo) é determinada pelos sinais presentes no microambiente de ativação, como as citocinas produzidas pela APC, que desencadeiam a ativação de um fator transcrição chave para a aquisição do programa transcricional associado ao fenótipo da célula, o “regulador mestre” (O’SHEA; PAUL, 2010; SARAVIA; CHAPMAN; CHI, 2019). Por sua vez, os estímulos disponíveis no microambiente de ativação são definidos pelos sinais recebidos por PRRs de células do sistema inato, conectando a determinação do fenótipo da célula T $CD4^+$ com a natureza do antígeno que iniciou a resposta imune (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015).

Por sua vez, as células T $CD8^+$ de TCR αβ, foco do presente trabalho, são agentes fundamentais no controle e eliminação de microrganismos patogênicos intracelulares, como parasitas, bactérias intracelulares e vírus, e de células tumorais (DUDLEY et al., 2002; HARTY; TVINNEREIM; WHITE, 2000; SHANKARAN et al., 2001). A principal função efetora de células T $CD8^+$ corresponde aos mecanismos de indução da morte de células infectadas ou células tumorais, podendo ser chamados também de mecanismos citolíticos ou citotóxicos. Por esse motivo, essas células também podem ser denominadas de células T citolíticas ou citotóxicas. Como descrito nos tópicos anteriores, essas células são ativadas através do reconhecimento de um peptídeo proteico derivado de um antígeno apresentado no contexto da molécula de MHC-I de uma célula APC. Após sua ativação, o clone de célula T $CD8^+$ prolifera intensamente e se diferencia em dois fenótipos distintos, células de fenótipo efetor e células de fenótipo de memória (que podem ainda apresentar diferentes subtipos, como será abordado no próximo tópico) (KAECH; CUI, 2012; WILLIAMS; BEVAN, 2007).

Um aspecto importante dos mecanismos citotóxicos de células T $CD8^+$ é que são mecanismos direcionados às células que expressam em sua superfície o complexo MHC-I conjugado ao peptídeo indutor da ativação do clone (PIPKIN; LIEBERMAN, 2007; TRAMBAS; GRIFFITHS, 2003). Dessa maneira, células T $CD8^+$ atuam de forma específica contra uma célula-alvo e não contra células não infectadas ou inalteradas na proximidade. Além da interação do TCR com o complexo MHC-I:peptídeo, outras interações também auxiliam esse contato, incluindo a interação do correceptor CD8 com a molécula de MHC-I e a interação de diversas moléculas de adesão na superfície da célula T $CD8^+$ com seus ligantes na superfície da célula-alvo, como do receptor ICAM-1 com seu ligante LFA-1 (DUSTIN, 2008; MERWE; DAVIS, 2003). Em conjunto, essas interações provocam uma estabilidade no contato entre as células T $CD8^+$ e as células-alvo, gerando uma interface caracterizada por um estreito espaço definido pelo contato entre as duas células: a sinapse imunológica. Nessa sinapse ocorre a realização dos mecanismos de indução de morte celular de forma compartimentalizada.

Células T $CD8^+$ podem induzir a morte específica de outras células através da exocitose na sinapse imunológica de proteínas citotóxicas contidas em grânulos que provocam a formação de poros na membrana celular das células alvo, as perforinas, além da liberação de proteínas que induzem a ativação de vias de morte celular programada (apoptose) de outras células, as granzimas. As perforinas permitem a permeabilização da membrana celular para a entrada de granzimas. Adicionalmente, as células T $CD8^+$ podem levar à morte de células alvo através da expressão da proteína de membrana FasL (CD95L), ligante do receptor de superfície celular Fas (CD95), capaz de disparar a sinalização para a indução da morte celular programada na célula alvo (WONG; PAMER, 2003). Ambos os mecanismos citotóxicos induzem a apoptose de células alvo, principalmente, através da ativação de vias de sinalização de proteínas caspase (PIPKIN; LIEBERMAN, 2007; VOSKOBOINIK; WHISSTOCK; TRAPANI, 2015).

Além dos mecanismos citotóxicos, células T $CD8^+$ também podem atuar na proteção do hospedeiro através da produção de diversas citocinas pró-inflamatórias, como IFN-γ e TNF, que sinalizam a ativação de outras células ou ainda de quimiocinas, que induzem o recrutamento de outras células para o sítio da resposta (KAECH; CUI, 2012; WONG; PAMER, 2003). IFN-γ e TNF produzem uma diversidade

de efeitos sobre a resposta imune, uma vez que são reconhecidas por diversas células tanto da imunidade inata quanto imunidade adaptativa e são capazes de ativar diferentes vias de sinalização em cada elas. Destacam-se como exemplos de eventos mediados por IFN-γ a ativação de macrófagos e células NK, a indução da regulação positiva de moléculas de MHC em diversos tipos celulares e a indução de vias de sinalização antivirais em células epiteliais (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015). Para TNF pode-se listar a capacidade de amplificar a sinalização para produção de citocinas pró-inflamatórias através da indução da expressão e ativação dos fatores de transcrição NF-κB e AP-1 ou a indução da sinalização de apoptose em células infectadas (ASHKENAZI; DIXIT, 1998; MEHTA; GRACIAS; CROFT, 2018).

1.3 A ativação e resposta de células T CD8$^+$

O processo de ativação de células T CD8$^+$ é finamente regulado, protagonizado pela cooperação entre a célula T CD8$^+$ e a célula APC (SMITH-GARVIN; KORETZKY; JORDAN, 2009). A ativação da célula T CD8$^+$ culmina em mudanças significativas na função e fenótipo de células T CD8$^+$, promovendo a robusta proliferação do clone ativado e o concomitante início do processo de diferenciação no fenótipo efetor ou no fenótipo de memória (CHANG; WHERRY; GOLDRATH, 2014; KAECH; CUI, 2012; WILLIAMS; BEVAN, 2007). A seguir serão descritos maiores detalhes de cada etapa desse processo e abordada a complexidade na regulação da diferenciação de células T CD8$^+$.

1.3.1 O encontro de células T CD8$^+$ com células APC

Células T CD8$^+$ *naïve* se ativam ao encontrar com uma APC apresentando o peptídeo cognato ao seu TCR. Alguns fatores são cruciais para esse evento. A recirculação constante de células T CD8$^+$ *naïve* pelos órgãos linfoides secundários permite que estas consigam entrar em contato com APCs apresentando o antígeno para qual seu receptor é específico (NOLZ; STARBECK-MILLER; HARTY, 2011). O direcionamento de células T CD8$^+$ *naïve* para órgãos linfoides secundários depende da atuação de receptores de quimiocinas, como o CCR7, assim como moléculas de adesão, como a integrina selectina-L (ou CD62L) (GUNN et al., 1998; HEMMERICH et al., 2001; NOLZ; STARBECK-MILLER; HARTY, 2011, 2011).

Nos órgãos linfoides secundários, as células T CD8$^+$ encontram com APCs expondo diferentes peptídeos derivados de antígenos próprios e não próprios em seus

complexos MHC-I (QI; KASTENMÜLLER; GERMAIN, 2014). A principal APC, a célula dendrítica convencional, que através de fagocitose ou macropinocitose engloba diferentes materiais nos tecidos que residem enquanto imaturas, processando-os e apresentando-os em seus complexos MHC-II e -I (neste caso, através de um processo denominado “apresentação cruzada”). O estímulo de PRRs por PAMPs induz sua ativação e maturação, que promove sua migração para órgãos linfoides secundários, possibilitando seu papel de APC para células T (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015; QI; KASTENMÜLLER; GERMAIN, 2014).

A interação das células T $CD8^+$ com APCs é transitória e a estabilização deste contato é mediada por moléculas de adesão na superfície de ambas as células. No entanto, apesar de momentâneo, o contato é suficiente para que o TCR da célula T $CD8^+$ interaja com o complexo peptídeo:MHC da APC, permitindo o reconhecimento do antígeno. Caso TCR não seja específico para o peptídeo apresentado, o contato célula T CD8-APC é desfeito e ambas são libertas para formar um novo par. Caso haja o reconhecimento, uma série de efeitos é desencadeado em cascata para que a ativação da célula T $CD8^+$ se concretize (QI; KASTENMÜLLER; GERMAIN, 2014).

1.3.2 Os três sinais para a ativação de células T $CD8^+$

A ativação de células T $CD8^+$ é mediada pelo reconhecimento do antígeno via complexo TCR, porém ela só é plenamente concretizada após o estímulo de três sinais: (i) o primeiro sinal, a sinalização disparada pelo estímulo do complexo TCR; (ii) o segundo sinal, também chamado de sinal de coestimulação, é a sinalização induzida por receptores co-estimulatórios (Ex: CD28), que interagem com seu respectivo ligante na APC (p.ex.:CD80/CD86), e; (iii) o terceiro sinal é a sinalização mediada pelo estímulo de citocinas presentes no microambiente de ativação (KAECH; CUI, 2012; WILLIAMS; BEVAN, 2007).

O primeiro sinal de ativação, a interação do TCR com o complexo MHC-I: peptídeo, promove o acoplamento do correceptor CD8 ao complexo TCR e o engatilhar de uma cascata de sinalização intracelular. Essa sinalização é iniciada por uma série de fosforilações em domínios ITAM (do inglês, *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) do complexo CD3, um complexo proteico constituído pelas cadeias CD3γ, CD3δ, CD3ε e CD3ζ, fundamental para a sinalização do TCR (SMITH-GARVIN; KORETZKY; JORDAN, 2009). Essa série de fosforilações é mediada,

principalmente, pelas proteínas quinase Lck, recrutada pelo correceptor CD8, e ZAP70, desencadeando uma cascata de sinalização envolvendo diversas proteínas intermediárias. Essa cascata culmina na ativação de vários fatores de transcrição que induzem a transcrição de genes associados a proliferação, função efetora e diferenciação celular, incluindo o NFAT, NF-κB e os fatores de transcrição Fos e Jun, que em parceria formam o complexo AP-1 (HWANG et al., 2020; KAECH; CUI, 2012; SMITH-GARVIN; KORETZKY; JORDAN, 2009).

O segundo sinal, é essencial para a ativação da célula T $CD8^+$ e é mediado pela interação de receptores co-estimulatórios na superfície do linfócito T $CD8^+$ com seus ligantes na superfície da APC (CHEN; FLIES, 2013; SMITH-GARVIN; KORETZKY; JORDAN, 2009; WILLIAMS; BEVAN, 2007). O principal e mais bem descrito receptor co-estimulatório é a proteína CD28 e seus ligantes nas APCs são as proteínas CD80 e CD86, no entanto diversos outros receptores, como o CD27 e 4-1BB, já foram descritos atuando nesta função. Células APC em repouso não expressam (ou expressam pouco) ligantes de receptores co-estimulatórios e a indução da expressão dessas moléculas é dependente da ativação das APC ao entrar em contato e detectar microrganismos ou citocinas pro-inflamatórias, destacando a importância da atuação conjunta da resposta imune inata com a resposta imune adquirida (REIS E SOUSA, 2006).

A sinalização coestimulatória leva à ativação ou regulação positiva de várias vias de sinalização, como as mediadas pelas proteínas PI3 quinase (PI3K), Akt e Ras, que cooperam com as vias ativadas abaixo do complexo TCR e promovem sinais de proliferação e sobrevivência à célula T $CD8^+$. Entre os principais efeitos do sinal co-estimulatório destacam-se: (i) a amplificação do sinal de indução de fatores de transcrição associados a ativação da célula T $CD8^+$; (ii) a contribuição para a produção da citocina IL-2, fundamental para a proliferação e diferenciação de células T $CD8^+$, e para a expressão de CD25; (iii) a ativação de proteínas reguladoras do ciclo celular envolvidas com a progressão do ciclo e regulação negativa dos inibidores do ciclo celular e; (iv) a ativação de proteínas anti-apoptóticas, como as proteínas Bcl-2 e Bcl-X_L (CHEN; FLIES, 2013).

A ausência do segundo sinal pode provocar um efeito chamado de anergia (ELTANBOULY; NOELLE, 2021). A anergia da célula T $CD8^+$ desencadeia a ativação de diversos mecanismos inibitórios de forma dependente do fator de transcrição NFAT

(MACIÁN et al., 2002; ZHENG; ZHA; GAJEWSKI, 2008). Um exemplo é a expressão de enzimas E3 ligase de ubiquitina que promovem a degradação do complexo TCR via proteossoma, o que por sua vez leva à inativação das funções efetoras devido à interrupção da sinalização abaixo do TCR, podendo ocasionar também a morte do clone de célula T CD8$^+$ (ELTANBOULY; NOELLE, 2021; MUELLER, 2004). A indução da anergia da célula T CD8$^+$ representa um mecanismo de tolerância ao próprio, pois células autorreativas que encontram um autoantígeno na periferia, geralmente, não recebem sinais co-estimulatórios dependentes do amadurecimento de APCs (ELTANBOULY; NOELLE, 2021).

O terceiro sinal de ativação da célula T CD8$^+$ é fundamental para a finalização do processo de ativação da célula T CD8$^+$ e para a modulação da resposta imune desta célula (CHANG; WHERRY; GOLDRATH, 2014; KAECH; CUI, 2012; WILLIAMS; BEVAN, 2007). Esse sinal consiste nas sinalizações transmitidas por citocinas presentes no microambiente de ativação de células T CD8$^+$, entre elas as citocinas IL-2, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, IL-27 e os interferons do tipo I (IFN-I). Diversas dessas citocinas possuem papel chave na proliferação de células T CD8$^+$ em resposta primária e na indução de funções efetoras da célula T CD8$^+$, como a produção de IFN-γ e Granzima B, como IL-2 e IL-12, respectivamente (WILLIAMS; BEVAN, 2007; ZHANG; BEVAN, 2011). Além disso, diversos estudos mostraram que a presenta, ausência ou os níveis de concentração dessas várias citocinas correlacionam com o favorecimento da diferenciação da célula T CD8$^+$ para um determinado fenótipo, efetor ou memória (CHANG; WHERRY; GOLDRATH, 2014; KAECH; CUI, 2012; PIPKIN et al., 2010). Dessa maneira, o terceiro sinal não só é essencial para o processo de ativação da célula T CD8, como também é um dos principais fatores associados à diferenciação dessas células.

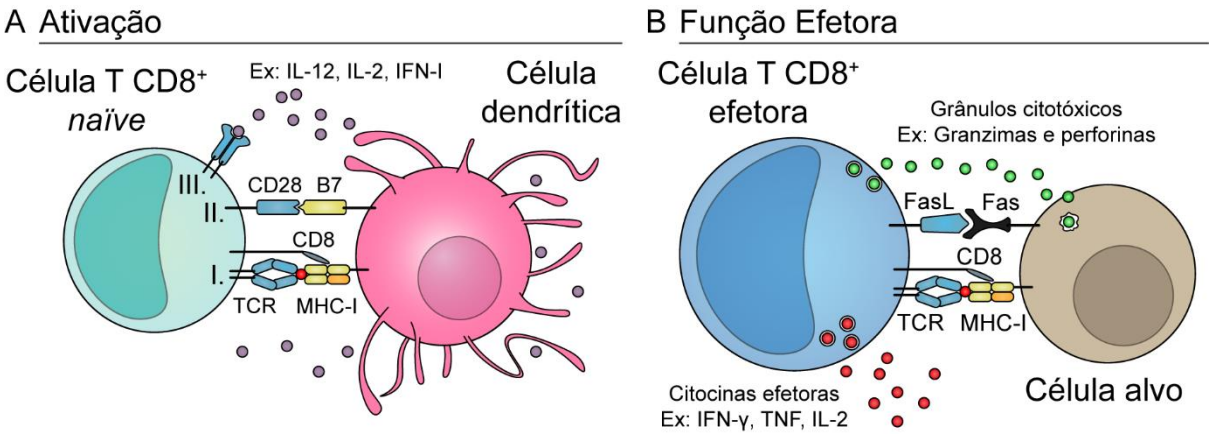


Figura 1. As principais características da ativação e função efetora de células T CD8⁺. (A) A ativação de células T CD8⁺ *naïve* é mediada por três sinais (na figura: I, II e II): (I) o reconhecimento do antígeno através da interação do TCR da célula T CD8⁺ naïve com o peptídeo apresentado no complexo MHC-I da superfície da APC (Ex: Células dendríticas); (II) a interação entre receptores co-estimulatórios de células T CD8⁺ (Ex: CD28) e seus ligantes expressos na APC (Ex: CD80/B7.1 ou CD86/B7.2); (III) as citocinas presentes no microambiente de ativação (Ex: IL-12, IL-2 ou IFN-I). (B) Após a ativação, as células T CD8⁺ efetoras possuem diversos mecanismos empenhados para a eliminação da célula alvo que expressa o antígeno específico ao seu TCR. Os principais mecanismos são: (i) a liberação de grânulos citotóxicos contendo proteínas granzimas e perforinas; (ii) a expressão do ligante de Fas (FasL), receptor com função de indução da apoptose e; (iii) a secreção de citocinas efetoras, incluindo as citocinas pró-inflamatórias IFN-γ e TNF e a citocina IL-2.

Além dos três sinais de ativação, outros mecanismos da resposta imune podem contribuir de forma significativa para a ativação e geração de memória imunitária de células T CD8⁺. O principal desses mecanismos é a atuação de células T_H específicas para o antígeno cognato ao clone de célula T CD8⁺ em ativação (BENNETT et al., 1997; WIESEL; OXENIUS, 2012). Em alguns modelos, a interação de células T_H ativadas pelo antígeno cognato ao da célula T CD8⁺ com células dendríticas promove a regulação positiva de ligantes de receptores co-estimulatórios e a produção de citocinas, como IL-12, por parte das células dendríticas (WIESEL; OXENIUS, 2012). Essa função ocorre, principalmente, pelo mecanismo de licenciamento de células dendríticas, mediado pela interação do receptor CD40 de células dendríticas com o seu ligante, a molécula CD40L, na superfície de células T_H.

Células T_H também podem contribuir para a resposta de células T CD8⁺ através: (i) da produção de quimiocinas capazes de atrair células T CD8⁺ naïve para as APC em órgãos linfoides secundários ou para os sítios de inflamação onde as células T CD8⁺ ativadas são requeridas (CASTELLINO et al., 2006; NAKANISHI et al., 2009) e; (ii) através da interação direta entre células T CD4⁺ ativadas com células T CD8⁺, pela interação do receptor CD40 expresso em células T CD8⁺ com o ligante CD40L em células T CD4⁺, a qual correlaciona com uma maior geração de células T CD8⁺ de memória (BOURGEOIS; ROCHA; TANCHOT, 2002).

1.3.3 O processo de expansão e diferenciação de células T CD8⁺ pós-ativação

Um atributo essencial da resposta imune de células T CD8⁺ é o processo de expansão clonal, permitindo que esta seja eficiente na eliminação do antígeno, além da a geração de subpopulações de células ativadas capazes de desempenhar mecanismos efetores citotóxicos e pró-inflamatórios (fenótipo efetor) e a garantia da memória imunitária específica ao antígeno (fenótipo de memória) (KAECH; CUI, 2012; WILLIAMS; BEVAN, 2007). Logo após a ativação da célula T CD8⁺, há um processo

de proliferação massivo, podendo gerar um aumento de até 50.000 vezes do número total de células, as quais são constituídas principalmente da população efetora (Figura 2) (BUTZ; BEVAN, 1998; KAECH; CUI, 2012).

Na resposta imune aguda, após a eliminação do antígeno, a população de células T $CD8^+$ é quase que inteiramente eliminada por apoptose (em média, 90-95% das células T $CD8^+$ ativadas) em um processo nomeado como contração (BADOVINAC; PORTER; HARTY, 2002). Após a etapa de contração, sobrevivem apenas as células de memória que guardam a capacidade de persistir por longos períodos através de proliferação homeostática mediada por IL-7 e IL-15, e de montarem respostas rápidas e robustas mediante a sua reativação (Figura 2) (JAMESON; MASOPUST, 2009; KAECH; CUI, 2012; SURH; SPRENT, 2008).

Diversos trabalhos buscaram a caracterização fenotípica dessas células e a identificação dos reguladores por trás desse processo (CHANG; WHERRY; GOLDRATH, 2014; KAECH; CUI, 2012). Foi demonstrado que a utilização do perfil de expressão de duas moléculas, os receptores de superfície KLRG1 e IL-7Rα (CD127), era suficiente para a separação de ambos os estados de diferenciação da célula T $CD8^+$ em modelo de infecção viral aguda, e estes perfis se tornaram classicamente associados a cada fenótipo (JOSHI et al., 2007; KAECH et al., 2003; KAECH; CUI, 2012). Células T $CD8^+$ diferenciadas para o fenótipo efetor foram caracterizadas pela alta expressão de KLRG1 e baixa expressão de CD127 ($KLRG1^+CD127^-$), enquanto células T $CD8^+$ diferenciadas para o fenótipo de memória apresentam o perfil oposto ($KLRG1^-CD127^+$) (KAECH; CUI, 2012).

Também foi observado que mesmo na fase inicial da resposta imune aguda, era possível encontrar ambas as populações $KLRG1^+CD127^-$ e $KLRG1^-CD127^+$ de células T $CD8^+$. Essa caracterização era capaz de identificar as células que sofreriam contração após a eliminação do antígeno ou que dariam origem a população de memória, respectivamente (JOSHI et al., 2007; KAECH et al., 2003). Portanto, essas populações foram nomeadas de células T $CD8^+$ efetoras de vida curta (T_{SLEC}, do inglês *Short-lived effector cells*) e células T $CD8^+$ efetoras precursoras de memória (T_{MPEC}, do inglês *Memory precursor effector cells*), respectivamente (KAECH et al., 2002, 2003; KAECH; CUI, 2012). De forma similar, em tempos tardios de uma resposta aguda as populações de células T $CD8^+$ terminalmente diferenciadas no fenótipo efetor ou de memória são nomeadas de células T $CD8^+$ efetoras terminais (T_{TE}, do

inglês *Terminal effector*) ou células T CD8⁺ de memória (T_{MEM}), respectivamente (Figura 2) (KAECH; CUI, 2012).

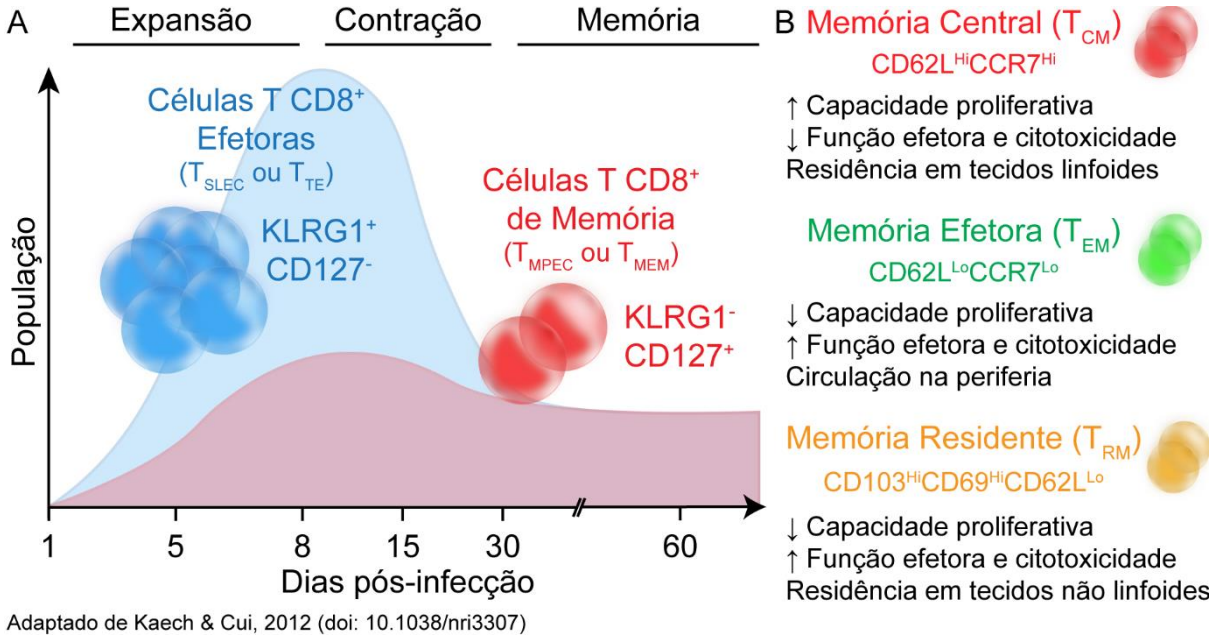


Figura 2. A resposta e diferenciação de células T CD8⁺ em contextos de resposta aguda. (A) Após sua ativação, em contexto de resposta imune aguda, a célula T CD8⁺ passa por um processo de intensa proliferação nomeado expansão clonal. Essa expansão dá origem a duas populações com fenótipos distintos: as células T CD8⁺ efetoras terminais (T_{TE}) (KLRG1⁺CD127⁻), geradas em maior número, e células T CD8⁺ de memória (T_{MEM}) (KLRG1⁻CD127⁺). Essas populações também pode ser encontradas em tempos precoces da resposta, sendo chamadas de células T CD8⁺ efetoras de vida curta (T_{SLEC}) e células T CD8⁺ efetoras precursoras de memória (T_{MPEC}). Após a eliminação do antígeno, a população de células T CD8⁺ efetoras é majoritariamente eliminada na fase de contração e em tempos mais tardios restam apenas células T CD8⁺ de memória. (B) As células T CD8⁺ de memória, por sua vez, são heterogêneas quanto ao seu fenótipo e funcionalidade (como descrito na figura), sendo possível distinguir três diferentes subpopulações: Células T CD8⁺ de memória central (T_{CM}, CD62L^{Hi}CCR7^{Hi}), Células T CD8⁺ de memória efetora (T_{EM}, CD62L^{Lo}CCR7^{Lo}) e Células T CD8⁺ de memória residente (T_{RM}, CD103^{Hi}CD69^{Hi}CD62L^{Lo}).

1.3.4 As subpopulações de células T CD8⁺ de memória

A investigação de células T CD8⁺ em resposta aguda em diferentes modelos revelou que células T CD8⁺ de memória apresentavam uma heterogeneidade fenotípica, funcional e migratória, sendo possível separar diferentes subpopulações (CHANG; WHERRY; GOLDRATH, 2014; GEBHARDT et al., 2009; HAMANN et al., 1997; KAECH; CUI, 2012; SALLUSTO et al., 1999). As evidências levaram à definição de três subpopulações de células T CD8⁺ de memória: (i) as células T CD8⁺ de memória central (T_{CM}, do inglês *Central memory*); (ii) as células T CD8⁺ de memória efetora (T_{EM}, do inglês *Effector memory*) e; (iii) as células T CD8⁺ de memória residente (T_{RM}, do inglês *Resident memory*). Além disso, uma outra população de células T CD8⁺ de memória mais bem caracterizada em humanos, as células T CD8⁺

de memória célula-tronco (T_{SCM}, do inglês *Stem cell memory*) também já foi descrita (GATTINONI et al., 2011; LUGLI et al., 2020).

A população de células T $CD8^+$ T_{CM}, caraterizadas, principalmente, pela alta expressão de moléculas associadas ao direcionamento para órgãos linfoides ($CD62L^{Hi}CCR7^{Hi}$), é a principal responsável pela geração de uma robusta e eficiente resposta secundária. Possuem funções efetoras citotóxicas e pró-inflamatórias limitadas, porém guardam um alto potencial proliferativo e multipotente ("*stemness*"), sendo capazes de gerar novas células T $CD8^+$ efetoras rapidamente e independente de sinalização co-estimulatória. Como seus marcadores característicos sugerem, são capazes de migrar pela periferia, mas são comumente encontradas residindo órgãos linfoides secundários ou a medula-óssea (CUI; KAECH, 2010; KAECH; CUI, 2012). As células T_{SCM} possuem um fenótipo e funcionalidade similar a de células T_{CM}, porém com um potencial progenitor mais acentuado, apresentando uma maior capacidade proliferativa, de renovação homeostática e de multipotência em comparação com células T_{CM}. Além disso, em modelo murino, seu estado menos diferenciado é destacado pela menor expressão da molécula CD44, associado à ativação de células T $CD8^+$, em comparação com células T_{CM} (LUGLI et al., 2020).

Em contraste, as células T $CD8^+$ T_{EM} caracterizadas pelo perfil oposto ao de células T $CD8^+$ T_{CM} ($CD62L^{Lo}CCR7^{Lo}$) migram pela periferia, mas sem um direcionamento preferencial para os tecidos linfoides. Essas células são conhecidas por apresentar funções efetoras citotóxicas e pro-inflamatórias em níveis comparáveis a células T $CD8^+$ efetoras, porém sua capacidade proliferativa e de dar origem a novas células efetoras é significativamente limitada em comparação às células T $CD8^+$ T_{CM} (CUI; KAECH, 2010; KAECH; CUI, 2012).

As células T $CD8^+$ T_{RM}, tal qual as células T $CD8^+$ T_{EM} também apresentam a conservação das funções efetoras, porém, de forma exclusiva, têm sua migração limitada e são encontradas residindo em tecidos não-linfoides, principalmente, tecidos de barreira, como a pele e epitélios de mucosa. Esse subtipo de célula T $CD8^+$ de memória é caracterizado pela baixa expressão de CD62L e alta expressão das moléculas CD103 e CD69 ($CD103^{Hi}CD69^{Hi}CD62L^{Lo}$), bem como a expressão de integrinas e receptores de quimiocinas específicos para o direcionamento para tecidos específicos (como a integrina α4β7 para tecidos de mucosa intestinal) (CUI; KAECH, 2010; KAECH; CUI, 2012).

O processo de diferenciação de células T CD8$^+$ é um processo complexo e dinâmico, caracterizado pela atuação de diversos fatores regulatórios em concerto. É demonstrado que a sinalização associada à ativação contribui para a diferenciação de células T CD8$^+$ no fenótipo efetor ou de memória, provocando grandes mudanças em diferentes aspectos da célula, incluindo o controle da expressão gênica através da atuação de fatores de transcrição em conjunto com reguladores epigenéticos, do metabolismo e do ciclo celular dessas células. Muitos aspectos do controle da diferenciação para o fenótipo efetor ou de memória são compartilhados entre as células T CD8$^+$ e T CD4$^+$, no entanto, serão descritos a seguir as evidências levantadas em células T CD8$^+$, célula onde esse processo é mais bem demonstrado e à qual é o alvo do nosso estudo.

1.4 A diferenciação de células T CD8$^+$ no fenótipo efetor ou de memória

Diversos modelos já foram propostos para explicar como a diferenciação de células T CD8$^+$ ocorre após sua ativação (Figura 3). No entanto, nenhum dos modelos é capaz de, separadamente, reconciliar todos os achados experimentais descritos na literatura em diferentes modelos experimentais de resposta imune, sugerindo que o processo de diferenciação de células T CD8$^+$ é regido de maneira dinâmica e dependente do contexto (CHANG; WHERRY; GOLDRATH, 2014; KAECH; CUI, 2012; XU; PEREIRA; MARTINEZ, 2021).

Um desses modelos de diferenciação considera que células T CD8$^+$ efetoras e de memória são originadas de células T CD8$^+$ *naïve* distintas pré-programadas para a geração de células de um fenótipo ou de outro. No entanto, esse modelo é controverso uma vez que estudos demonstraram que uma única célula T CD8$^+$ *naïve* é capaz de originar ambos os estados diferenciados, inclusive múltiplos subtipos de célula de memória (GERLACH et al., 2010; STEMBERGER et al., 2007). No entanto, outro mais recente identificou subpopulações de células T CD8$^+$ *naïve* possuem potenciais de geração de células efetoras ou de memória distintos (SMITH et al., 2018).

Outros dois modelos para a diferenciação de células T CD8$^+$ hipotetizam que a duração da exposição aos diferentes sinais de ativação, ou a força deles, estão associados com o potencial para a diferenciação da célula (KAECH; CUI, 2012; KAECH; WHERRY, 2007). O modelo que utiliza a duração da exposição aos sinais de

ativação, também chamado de modelo de potencial decrescente, sugere que o estímulo constante ou repetitivo do antígeno e de sinais pró-inflamatórios promove a diferenciação de células T $CD8^+$ efetoras para um estado mais terminalmente diferenciado e, consequentemente, a perda do potencial de gerar células T $CD8^+$ de memória. Evidências para esse modelo, geradas em experimentos com a exposição interrompida ou limitada de antígeno às células T $CD8^+$ ativadas mostram que quanto menor o tempo de exposição maior o potencial de geração de células T $CD8^+$ de memória (BADOVINAC; PORTER; HARTY, 2004; D'SOUZA; HEDRICK, 2006). Já o modelo que relaciona a força dos sinais de ativação à diferenciação de células T $CD8^+$ sugere que quanto mais forte a sinalização mediada pelo complexo TCR, receptores co-estimulatórios e sinais pró-inflamatórios no microambiente de ativação, maior é o potencial de diferenciação da célula T $CD8^+$ ativada para um fenótipo terminalmente efetor (CHANG; WHERRY; GOLDRATH, 2014; JOSHI et al., 2007; KAECH; CUI, 2012; TEIXEIRO et al., 2009; ZEHN; LEE; BEVAN, 2009).

Por fim, um outro modelo proposto para explicar a diferenciação de células T $CD8^+$ é o modelo de divisão assimétrica. Nesse modelo há a divisão desigual de componentes celulares da célula T $CD8^+$ para suas células filhas após a primeira divisão pós-ativação. Dessa maneira, as células filhas herdariam potenciais distintos de diferenciação no fenótipo efetor ou de memória. Evidências indicaram que a células filha que herdam a sinapse imunológica são a que recebem sinalização via TCR e receptores co-estimulatórios mais forte, além de uma maior sinalização de citocinas pró-inflamatórias (como IL-12 e IFN-γ) devido a maior proximidade com a APC, e consequentemente, são fadadas à diferenciação no fenótipo efetor (CHANG et al., 2007). Mais recentemente, surgiram novas evidências mostrando que a herança assimétrica de proteínas intracelulares, como o complexo proteico sensor metabólico mTORC1, e a indução diferencial de reguladores transcricionais nas células-filhas, como de componentes do modulador epigenético complexo repressor Polycomb 2 (PRC2), determinavam o potencial de diferenciação de células T $CD8^+$ para o fenótipo efetor ou de memória (KAKARADOV et al., 2017; POLLIZZI et al., 2016).

Os modelos de duração e força de sinais de ativação e divisão assimétrica não são mutuamente excludentes, uma vez que todos possuem em comum a ideia de que os três sinais de ativação são os fatores que regem a determinação do fenótipo de células T $CD8^+$. Além do fato de que a regulação destes sinais (seja quantitativamente,

qualitativamente ou temporalmente) controla a geração de células T CD8⁺ em diferentes graus de diferenciação (Figura 3). Nesse eixo de diferenciação, as células T CD8⁺ T_{SCM} representariam o extremo menos terminalmente diferenciado e com maior capacidade de gerar células de outros fenótipos (maior caráter progenitor), enquanto células T CD8⁺ T_{TE} representariam o extremo mais terminalmente diferenciado (CHANG; WHERRY; GOLDRATH, 2014; KAECH; CUI, 2012; XU; PEREIRA; MARTINEZ, 2021). Além disso, em todos esses modelos, há o entendimento de que a estimulação diferencial de sinais associados à ativação da célula T CD8⁺ é transduzida para o interior na célula e promove a ativação de diferentes reguladores transcricionais e epigenéticos que vão direcionar a aquisição do programa de cada fenótipo, efetor ou memória.

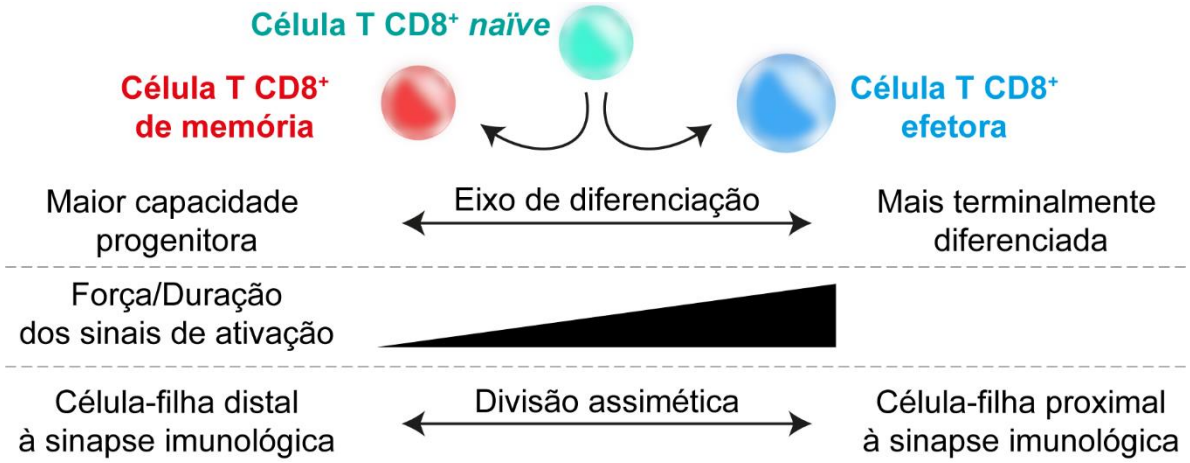


Figura 3. A diferenciação de células T CD8⁺ no fenótipo efetor e de memória. Células T CD8⁺ *naïve* se diferenciam em dois fenótipos após sua ativação, células T CD8⁺ efetoras ou de memória. Diversas evidências demonstram que células T CD8⁺ de memória se encontram em um estado menos terminalmente diferenciado em comparação às células efetoras e possuem uma maior capacidade progenitora, o que é observado em seu maior potencial proliferativo, de auto renovação e de geração de novas células efetoras mediante uma resposta secundária. São descritos na literatura diferentes modelos para explicar o processo de diferenciação de células T CD8⁺ e os modelos com um conjunto de evidências mais sólido apresentam uma característica em comum: que o processo de diferenciação é dependente dos sinais de ativação. Dois modelos alegam que quanto maior a força ou duração dos sinais de ativação, maior o potencial de diferenciação para o fenótipo efetor. Outro modelo (de divisão assimétrica) aponta que a primeira divisão celular da célula T CD8⁺ ativada dá origem a duas células-filhas com potenciais de diferenciação diferentes: a célula-filha mais próxima à sinapse imunológica e, portanto, que herdou a maior parte dos elementos envolvidos com a sinalização de ativação possui maior potencial de diferenciação para o fenótipo efetor, enquanto que a célula filha mais distante da sinapse possui maior potencial de diferenciação para o fenótipo de memória

Diferente do que ocorre em respostas imune agudas, onde a sinalização via TCR e pró inflamatória é interrompida após a eliminação do antígeno, em respostas imunes crônicas há a persistência do antígeno e, portanto, da sinalização associada ao reconhecimento dele. Essa persistência da sinalização antigênica, bem como de estímulos inflamatórios, em contextos de resposta imune crônica (como no caso de

infecções crônicas ou respostas antitumorais) provoca uma dinâmica de diferenciação de células T CD8$^+$ diferente da observada na resposta imune aguda. Em respostas imunes crônicas não é observada a geração de células T CD8$^+$ de memória e a população de células T CD8$^+$ efetora adquire um fenótipo hiporresponsivo, nomeado como “exaustão celular”. As características das células T CD8$^+$ exaustas e o processo de diferenciação dessas células será descrito no subtópico a seguir.

1.4.1 A diferenciação de células T CD8$^+$ no fenótipo de exaustão

Relatos iniciais da exaustão da imunidade adquirida datam de estudos da década de 1960, associando o fenômeno à exposição de altas doses de antígenos (BYERS; SERCARZ, 1968; ŠTERZL; SILVERSTEIN, 1967). Uma descrição mais clara do estado de hiporresponsividade de células T CD8$^+$ foi obtida em experimentos utilizando o modelo de infecção crônica pelo vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV), onde foi observada a persistência de células T CD8$^+$ respondedoras específicas para o vírus, porém com prejuízo em suas funções efetoras (GALLIMORE et al., 1998; ZAJAC et al., 1998). Desde então, esse estado diferenciado disfuncional foi relatado também em diversos contextos de resposta imune crônica, incluindo infecções virais, bacterianas, parasitárias e na resposta imune ao câncer (VIRGIN; WHERRY; AHMED, 2009). Estudos focados na investigação dessa população identificaram diversos atributos que descrevem esse estado hiporresponsivo e demonstraram que a exaustão de células T CD8$^+$ se trata de um processo de diferenciação, com estágios intermediários distintos que podem ser caracterizados fenotipicamente e funcionalmente (BLANK et al., 2019; KURACHI, 2019; MCLANE; ABDEL-HAKEEM; WHERRY, 2019; MILLER et al., 2019; PEREIRA et al., 2017; WHERRY, 2011).

As células T CD8$^+$ exaustas (T_{EX}) geradas no curso de uma resposta imune crônica apresentam um comprometimento progressivo e hierárquico de suas funções efetoras e capacidade proliferativa, caracterizado por alterações fenotípicas e metabólicas. Essas transformações são dirigidas por um programa transcricional e epigenético distinto dos observados na diferenciação para o fenótipo efetor e de memória. A principal característica fenotípica de células T CD8$^+$ T_{EX} é a progressiva expressão de múltiplos receptores inibitórios, sendo os principais os receptores PD-1, CTLA-4, Lag-3 e Tim-3, entre outros, de maneira que as fases terminais da exaustão são caracterizadas pela alta expressão de múltiplos receptores inibitórios. Esse

aumento na expressão e co-expressão de receptores inibitórios correlaciona com a progressiva diminuição e perda da produção de citocinas importantes para a funcionalidade da célula T $CD8^+$, como o IFN-γ, TNF, IL-2, e proteínas citotóxicas, como a Granzima B. Em conjunto com a queda na funcionalidade efetora, as células T $CD8^+$ T_{EX} também progressivamente perdem sua capacidade proliferativa e aumentam sua suscetibilidade à apoptose (Figura 4A) (MCLANE; ABDEL-HAKEEM; WHERRY, 2019; WHERRY, 2011; WHERRY; KURACHI, 2015).

A caracterização de estágios intermediários de células T $CD8^+$ possibilitou a identificação de subpopulações com diferentes características funcionais. Uma dessas subpopulações identificadas consiste em células T $CD8^+$ T_{EX} com atributos de células de memória e responsáveis por sustentar a resposta de células T $CD8^+$. Elas eram capazes de renovar e manter a população de células T $CD8^+$ T_{EX}, gerando novas células com o mesmo fenótipo e células efetoras. Essa população de células com características progenitoras, ou multipotentes, foi cunhada como célula T $CD8^+$ exausta precursora (T_{PEX}, do inglês *Precursor exhausted T cell*). Atualmente, ela representa um estágio mais inicial no curso da diferenciação para a exaustão. A principal característica desse estágio é a expressão do fator de transcrição Tcf-1, associado ao fenótipo de memória e à característica de multipotência (BELTRA et al., 2020; IM et al., 2016; PALEY et al., 2012; PEREIRA et al., 2017; UTZSCHNEIDER et al., 2016). Outra característica importante de células T $CD8^+$ T_{PEX} é a menor expressão de múltiplos receptores inibitórios, exceto a expressão de PD-1, que é requerida para a geração destas células (CHEN et al., 2019).

Além da identificação da população de células T $CD8^+$ T_{PEX}, outros estágios intermediários no espectro de diferenciação de células T $CD8^+$ para o fenótipo de exaustão também foram definidos utilizando uma caracterização baseada na expressão das moléculas Ly108 e CD69 (BELTRA et al., 2020). Beltra e colaboradores mostraram que a população de células T $CD8^+$ T_{PEX} possui uma heterogeneidade fenotípica e funcional, sendo possível separar uma subpopulação quiescente e residente de órgãos linfoides secundários com maior potencial progenitor ($Ly108^+CD69^+$), e uma subpopulação de células proliferativas com capacidade de circular pela periferia ($Ly108^+CD69^-$). Ambos os subtipos podem converter um no outro, porém, a subpopulação proliferativa também poderia irreversivelmente diferenciar-se para células T $CD8^+$ T_{EX} com características efetoras elevadas, como a

maior produção de proteínas citotóxicas e citocinas pró-inflamatórias. Essas células T CD8$^+$ T_{EX} que mantém potencial efetor (Ly108$^-$CD69$^-$, ditas “intermediárias”) progressivamente se diferenciam para células T CD8$^+$ T_{EX} terminais, apresentando a progressiva perda da funcionalidade e aquisição de características fenotípicas citadas no parágrafo anterior (Ly108$^-$CD69$^+$) (Figura 4B).

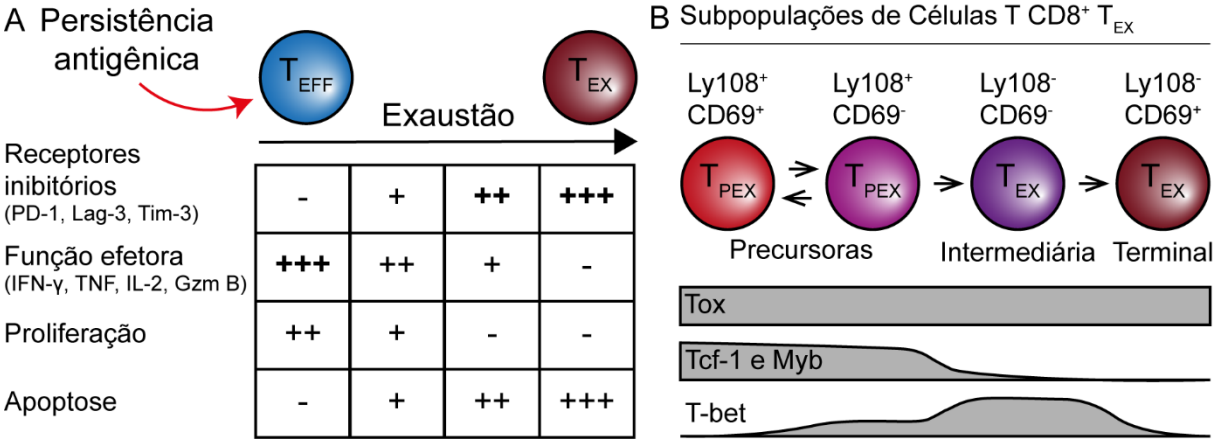


Figura 4. As principais características da exaustão de células T CD8$^+$ e as subpopulações de células T CD8$^+$ exaustas. (**A**) A exaustão de células T CD8$^+$ é um fenômeno que ocorre no contexto da resposta imune crônica, causado pela persistência da apresentação de antígeno à uma célula T CD8$^+$ efetora (T_{EFF}). O processo de diferenciação de células T CD8$^+$ exaustas (T_{EX}) é marcado por mudanças fenotípicas e funcionais como: o gradual aumento na expressão de múltiplos receptores inibitórios e na aquisição de um perfil hiporresponsivo caracterizado pela perda da função efetora, capacidade proliferativa e o aumento da apoptose. (**B**) A população de células T CD8$^+$ T_{EX} é heterogênea e subpopulações distintas podem ser identificadas pela expressão das moléculas Ly108 e CD69, incluindo as populações exaustas precursoras (T_{PEX}, Ly108$^+$CD69$^+$ e Ly108$^-$CD69$^-$), intermediárias (Ly108$^-$CD69$^-$) e terminais (Ly108$^-$CD69$^+$). Além disso, essas subpopulações também podem ser caracterizadas pela expressão dos fatores de transcrição Tox, Tcf-1, Myb e T-bet.

É argumentado na literatura de que a exaustão de células T CD8$^+$ é uma adaptação evolutiva para lidar com a resposta imune crônica, onde a persistência antigênica com a consequente persistência da sinalização inflamatória e estimulatória para células T CD8$^+$ promoveriam uma resposta inflamatória exacerbada desempenhada por estas células (BLANK et al., 2019; KALLIES; ZEHN; UTZSCHNEIDER, 2020; SPEISER et al., 2014). No entanto, essa adaptação impede a eliminação do patógeno ou antígeno, promovendo a resposta crônica, como a de células cancerosas. Essa desvantagem, do ponto de vista clínico, é um obstáculo para o tratamento de diversas doenças crônicas onde o papel de células T CD8$^+$ é crucial, como infecções virais crônicas (Ex: o HIV e HCV) e o câncer (MCLANE; ABDEL-HAKEEM; WHERRY, 2019; VIRGIN; WHERRY; AHMED, 2009).

Dessa maneira, diversos estudos focados na superação desse obstáculo foram levantados. A caracterização da exaustão de células T CD8$^+$ suscitou a descoberta

de que esse fenótipo é altamente dependente da sinalização inibitória e trabalhos seguintes mostraram que o bloqueio dessa sinalização utilizando anticorpos monoclonais antagonistas para receptores inibitórios promoviam a atenuação da exaustão da resposta de células T $CD8^+$ e o resgate dessas células, aumentando sua funcionalidade, proliferação e longevidade (KALLIES; ZEHN; UTZSCHNEIDER, 2020; SPEISER et al., 2014). Essa estratégia terapêutica, batizada de bloqueio de *checkpoints*, ou bloqueio de receptores inibitórios foi extremamente significativa e foi honrada pelo prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina de 2018, concedido aos pesquisadores James Allison e Tasuku Honjo. Apesar de não ser completamente conhecido como esse bloqueio promovia a restauração da resposta de células T $CD8^+$ (SPEISER et al., 2014), trabalhos seguintes demonstraram que a principal população afetada pelo bloqueio de checkpoints era a população de células T $CD8^+$ T_{PEX}, enquanto as células T $CD8^+$ T_{EX} terminais eram refratárias à terapia (HE et al., 2016; IM et al., 2016; UTZSCHNEIDER et al., 2016).

1.5 A regulação transcricional e epigenética de células T $CD8^+$ em resposta imune aguda e crônica

O processo de diferenciação de células T $CD8^+$ é dirigido pelo controle coordenado da expressão gênica, promovendo o desenvolvimento de um programa transcricional característico de um fenótipo diferenciado (CHANG; WHERRY; GOLDRATH, 2014; CHEN et al., 2018c; KAECH; CUI, 2012; XU; PEREIRA; MARTINEZ, 2021). Nesse mecanismo de controle há o arranjo da ativação de genes envolvidos com a aquisição e manutenção da identidade de um determinado fenótipo e com as funções desempenhadas por essas células, e o silenciamento de genes associados a outros fenótipos e funções. O estabelecimento do perfil transcricional característico de um determinado fenótipo ou estado diferenciado é orquestrado pela cooperação da atuação de fatores de transcrição com a regulação de mecanismos epigenéticos, como a metilação de DNA, a atuação de RNAs não codificantes ou a modificação pós-traducional de histonas. O sub-tópico abaixo irá tratar de conceitos importantes de epigenética e prover descrições breves a respeito de seus mecanismos.

1.5.1 Epigenética: Conceitos e mecanismos

Cunhado em 1942 por Waddington, epigenética é o termo que define os estudos voltados para as alterações fenotípicas independentes das alterações genotípicas no curso do desenvolvimento de um organismo (WADDINGTON, 2012). Desde então, diversos avanços sobre como essas alterações ocorrem, em outras palavras, como se dão os mecanismos epigenéticos e como eles são controlados, revelaram a importância desses mecanismos para o desenvolvimento de organismos multicelulares e para processos de diferenciação celular (ALLIS; JENUWEIN, 2016; BIRD, 2007). Os mecanismos epigenéticos trabalham não apenas no controle de programas de diferenciação, mas também no controle dinâmico da adaptação celular a estímulos externos, ambientais e na transferência destas alterações para sua progênie originada da divisão celular, característica nomeada como herança epigenética (ALLIS; JENUWEIN, 2016). A regulação epigenética permite que as células de um organismo possam, de apenas um genótipo idêntico entre elas, gerar diversos fenótipos caracterizados por um perfil transcricional diferente (ALLIS; JENUWEIN, 2016; BELK; DANIEL; SATPATHY, 2022).

A regulação epigenética funciona predominantemente através da modificação da estrutura de regiões cromossômicas, modulando a acessibilidade da cromatina, nome dado ao complexo formado por DNA genômico, moléculas de RNA e as proteínas associadas a estes ácidos nucléicos (ALLIS; JENUWEIN, 2016; BIRD, 2007). A cromatina é organizada através do enovelamento da dupla-fita de DNA genômico no octâmero proteico de proteínas histonas, formando o nucleossomo, a sua unidade básica de organização, e ela pode se encontrar em diferentes graus de compactação (Figura 5A) (KORNBERG, 1974). No entanto, de modo abrangente, a compactação da cromatina pode ser categorizada em dois estados: (i) eucromatina, definida pela cromatina levemente condensada e acessível para a entrada da maquinaria de transcrição gênica; e a (ii) heterocromatina, definida pela cromatina mais condensada, inacessível e silenciada quanto a expressão gênica (ALLIS; JENUWEIN, 2016).

Estudos iniciais focados na alteração da estrutura do DNA e cromatina identificaram que ambas poderiam ser modificadas quimicamente através da metilação de DNA em resíduos de citosina (formando a 5-metilcitosina), realizada por enzimas DNA metiltransferases (DNMT), e pela modificação pós-traducional de proteínas histona, na região da cauda da proteína. Foi demonstrado que ambos os

mecanismos epigenéticos estavam associados à regulação transcricional e a modificação química distinguia regiões de eucromatina e heterocromatina (ALLFREY; FAULKNER; MIRSKY, 1964; HOLLIDAY; PUGH, 1975; HOTCHKISS, 1948). Após essas descobertas, diversos trabalho descreveram a existência de diversos tipos de modificações em proteínas da família das histonas (diversos resíduos das proteínas), incluindo acetilações, metilações, fosforilações e ubiquitinações entre outras (ALLIS; JENUWEIN, 2016). Também foi evidenciado que essas modificações químicas possuíam um caráter consistente na regulação da transcrição gênica, sendo modificações ativadoras, como a acetilação de histonas, ou repressoras, como a metilação de DNA. Já a metilação em histonas pode apresentar caráter repressor ou ativador dependendo do resíduo onde a marca é depositada, como observado para a marca ativadora H3K4me3 e para as marcas repressoras H3K9me3 e H3K27me3 (ALLIS; JENUWEIN, 2016).

Esse montante de conhecimento em constante evolução a respeito das modificações químicas de histona suscitou a hipótese de que essas marcas formariam um “código de histonas” e a informação carregada pela combinação de marcas promoveria estados da cromatina que auxiliariam na definição de fenótipos através da regulação do perfil transcricional. Essa combinação de marcas poderia, inclusive, configurar regiões contendo concomitantemente marcas ativadoras e repressoras, sendo essas regiões chamadas de regiões bivalentes, ou estado bivalente da cromatina (ALLIS; JENUWEIN, 2016; BERNSTEIN et al., 2006ª). Esse “código de histonas” seria regulado e interpretado por uma série de proteínas que participariam do processo de modificação pós-traducional e dos mecanismos de sinalização que essas marcas gerariam. Essas proteínas foram divididas em três categorias: (i) proteínas escritoras, que realizariam a deposição da marca de histona, como histona acetiltransferases (HATs, do inglês “*Histone acetyltransferases*”) ou histona lisina metiltransferases (KMTs, do inglês “*Lysine methyltransferases*”); (ii) proteínas apagadoras que realizam a remoção da marca de histona, como histona deacetilases (HDACs, do inglês “*Histone deacetylases*”) ou histona lisina demetilases (KDMs, do inglês “*Lysine demethyltransferases*”) ou; (iii) proteínas leitoras, que são capazes de reconhecer uma marca de histona e desempenhar uma série de funções para reforçar ou alterar a sinalização promovida por essa marca, ou ainda modular a estrutura tridimensional da cromatina através do recrutamento de outras proteínas e complexos

capazes de alterar o grau de compactação dela (ALLIS; JENUWEIN, 2016; STRAHL; ALLIS, 2000).

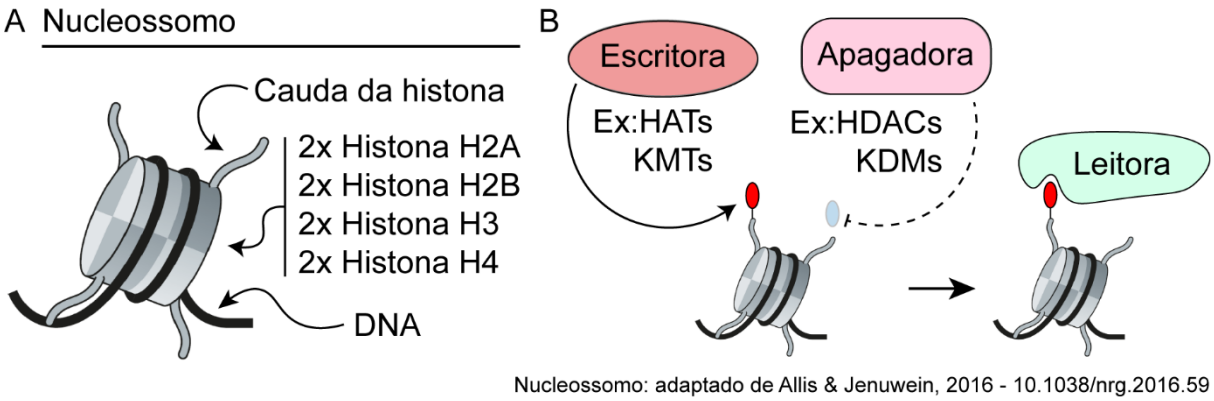


Figura 5. O nucleossomo e as modificações pós-traducionais de histonas. (**A**) O nucleossomo é a unidade básica de compactação da cromatina, constituído pelo enovelamento da dupla-fita de DNA em um complexo octâmero de histonas formado por duas proteínas histonas H2A, H2B, H3 e H4. (**B**) Cada proteína histona possui caudas que podem sofrer modificações pós-traducionais (ou marcas), como acetilações e metilações, que sinalizam a modulação da acessibilidade de cromatina e auxiliam na regulação epigenética do genoma. A deposição dessas marcas é catalisada por enzimas escritoras (Ex: HATs e KMTs) e removidas por enzimas apagadoras (Ex: HDACs e KDMs). Proteínas leitoras também pode se ligar à essas marcas para realizar mecanismos de modulação da acessibilidade da cromatina ou recrutar outros moduladores epigenéticos para reforçar ou atenuar a sinalização da marca identificada.

O controle da acessibilidade de cromatina, e consequentemente, a regulação da transcrição gênica, sinalizado pelas marcas epigenéticas é mediado pela modulação da interação física entre as proteínas histona e a molécula de DNA, como no caso da acetilação de histonas onde o grupamento acetil neutraliza a carga básica da histona e enfraquece a interação da mesma com o DNA, e pelo recrutamento de outros moduladores epigenéticos que podem contrapor ou amplificar o sinal daquela marca (ALLIS; JENUWEIN, 2016). Nesse grupo estão incluídos complexos remodeladores da cromatina, como SWI/SNF ou NURF, que por mecanismos dependentes de ATP são capazes de modificar a interação entre DNA e nucleossomos ou manipular a posição de nucleossomos na cromatina, “rolando-os” através da fita de DNA, ejetando-os ou substituindo-os (HARGREAVES; CRABTREE, 2011).

Esse controle da acessibilidade da cromatina através da regulação mediada pelo “código de histonas” é fundamental para a modulação da atividade de proteínas que compõem a maquinaria de transcrição, como a RNA polimerase II e fatores de transcrição, especialmente em regiões regulatórias de grande importância, como na região promotora do gene, o sítio de iniciação da transcrição (TSS, do inglês

"*Transcription starting site*") e regiões *enhancer* (que podem estar agrupadas, formando uma região *super-enhancer*) (ANDERSSON; SANDELIN, 2020; HNISZ et al., 2013; SCHOENFELDER; FRASER, 2019). Em células T, essa cooperação entre regulação epigenética e regulação transcricional é fundamental para o desenvolvimento e função destas células. Diversos trabalhos já mostraram a importância do funcionamento coordenado desses agentes regulatórios para o desenvolvimento tímico, manutenção da identidade de linhagem de células T e controle da expressão de moléculas de sinalização chave para a função destas células, como citocinas e receptores de citocinas (HOSOKAWA; ROTHENBERG, 2021; KANNO et al., 2012; MAQBOOL et al., 2020; ONODERA; NAKAYAMA, 2015; PACE; AMIGORENA, 2020).

1.5.2 A regulação transcricional e epigenética na diferenciação para o fenótipo efetor ou memória

Após a ativação de células T $CD8^+$, dinâmicas alterações transcricionais e epigenéticas ocorrem logo em seguida, dirigindo o processo de diferenciação. A análise transcricional de células T $CD8^+$ geradas na primeira divisão celular pós-ativação por scRNA-Seq mostrou que as células-filhas do clone de células T $CD8^+$ ativado adquirem um perfil transcricional com alta similaridade ao perfil de células plenamente diferenciadas, mostrando que a escolha do fenótipo no processo de diferenciação é iniciada muito precocemente, e dando suporte à hipótese da diferenciação de células T $CD8^+$ por divisão assimétrica (KAKARADOV et al., 2017). Da mesma maneira, logo após a ativação de células T $CD8^+$ há a indução de profundas alterações epigenéticas através de mecanismos de metilação do DNA e modificação pós-traducional de histonas, com a consequente alteração da acessibilidade de cromatina, em até mesmo poucas horas após a ativação de células T $CD8^+$ (KAKARADOV et al., 2017; LI et al., 2021; RUSS et al., 2014; SCOTT-BROWNE et al., 2016; YOUNGBLOOD et al., 2017).

Entre os diferentes agentes envolvidos nas alterações do perfil transcricional e epigenético da célula T $CD8^+$ ativada, é demonstrado que alguns fatores de transcrição e reguladores epigenéticos possuem um papel pioneiro nessas transformações, como T-bet, Eomes, Blimp1, Irf4, BATF e Runx3 (GODEC et al., 2015; KURACHI et al., 2014; WANG et al., 2018; YAO et al., 2013). Em células T $CD8^+$ naïve, os genes para esses fatores de transcrição possuem regiões promotoras em

estado bivalente de cromatina (H3K4me3^{+}H3K27me3^{+}), permitindo uma rápida conversão para um estado de cromatina permissível, removendo as marcas repressoras, e promovendo a ativação da expressão após a ativação celular (LI et al., 2021; RUSS et al., 2014).

A ativação de fatores de transcrição pioneiros é o primeiro passo para a aquisição do programa transcricional e epigenético que define o fenótipo da célula T CD8^{+}. Em cooperação com a atividade de reguladores epigenéticos, esses fatores de transcrição preparam a paisagem epigenética para a atuação de outros fatores de transcrição que vão trabalhar para a especificação e manutenção da célula T CD8^{+} em um determinado fenótipo (CHEN et al., 2018c; PIPKIN, 2021). O papel de diversos fatores de transcrição na diferenciação de células T CD8^{+} e manutenção do fenótipo efetor ou de memória já foi, e continua sendo, descrito. Entre esse grande grupo, alguns exemplos importantes que podem ser destacados são os fatores de transcrição T-bet, Blimp-1, Id2, Stat4 e Zeb2, associados com o fenótipo efetor, e os fatores Eomes, Bcl-6, Id3, Stat3 e Tcf-1, associados com o fenótipo de memória (CHANG; WHERRY; GOLDRATH, 2014; CHEN et al., 2018c; KAECH; CUI, 2012).

Uma característica marcante nessa rede de reguladores é que esses fatores de transcrição frequentemente atuam em pares antagônicos, onde o balanço da atividade entre os integrantes de cada par permite a facilitação da diferenciação da célula T CD8^{+} em um determinado fenótipo. Um exemplo bem documentado dessa dinâmica é o eixo definido pelos fatores de transcrição T-bet e Eomes. Ambos os fatores de transcrição, membros da mesma família, são ativados precocemente em resposta ao estímulo via TCR e requeridos para a expressão de proteínas importantes para a função de células T CD8^{+}, como o IFN-γ, Granzima B, Perforina e o receptor de quimiocina CXCR3. No entanto, ao longo do processo de diferenciação, é observado que o balanço da expressão entre esses fatores participa do processo de comprometimento da célula T CD8^{+} com um fenótipo. A maior expressão de T-bet favorece a diferenciação de células T CD8^{+} para um fenótipo efetor, estimulado pela sinalização desencadeada pela citocina pró-inflamatória IL-12, conectando a ideia de que sinais inflamatórios mais intensos propiciam a maior geração de células T CD8^{+} de fenótipo efetoras (BADOVINAC; PORTER; HARTY, 2004; INTLEKOFER et al., 2005; JOSHI et al., 2007).

Em paralelo, o fator de transcrição Eomes favorece a geração de células de memória e é essencial para a geração de células T $CD8^+$ de memória central (BANERJEE et al., 2010; INTLEKOFER et al., 2005). A oposição entre os fatores de transcrição é exemplificada pelo bloqueio da geração de células T $CD8^+$ de fenótipo efetor causado pela deleção de T-bet. Por outro lado, a ausência de T-bet não impacta a geração de células T $CD8^+$ de memória, e a deleção de Eomes resulta no oposto (JOSHI et al., 2007; PALEY et al., 2013). De maneira similar, uma relação dual antagônica entre fatores de transcrição também pode ser enxergada no eixo formado pelos pares Id2/Id3 e Bcl6/Blimp-1 (CANNARILE et al., 2006; KALLIES et al., 2009; RUTISHAUSER et al., 2009; YANG et al., 2011).

Os fatores de transcrição associados à diferenciação de células T $CD8^+$ em fenótipo efetor ou de memória também podem atuar de maneiras antagônicas competindo pelo sítio de regulação gênica. Um exemplo é a função de Bach2 de repressão de genes associados a diferenciação para o fenótipo efetor através da ligação com a região de *enhancer* desses genes, impedindo a entrada e atividade de fatores de transcrição ativadores como AP-1 e IRF4 e promovendo a diferenciação para o fenótipo de memória (ROYCHOUDHURI et al., 2016). A relação antagônica pode também ser dada não através de uma competição com outros fatores de transcrição, mas através da proteção de um determinado sítio regulatório contra mecanismos repressores. O fator de transcrição FOXO1 promove a expressão de diversos genes associados ao fenótipo de memória e à sobrevivência (como *Tcf7*, *Eomes*, *Bach2*, *Bcl2*, *Sell*, *Il7r* e *Ccr7*) se ligando a regiões regulatórias do gene e protegendo-as da marca repressora H3K27me3 depositada pela proteína Polycomb Ezh2, como será discutido a diante (GRAY et al., 2017; KIM et al., 2013).

Um outro exemplo é o fator de transcrição Blimp-1 capaz de recrutar a histona metiltransferase G9a e a histona deacetilase HDAC2 para promover a deposição de marcas repressoras H3K9Me2/3 e a remoção de H3Ac nos loci dos genes *Il2ra* e *Cd27*, prejudicando a diferenciação para o fenótipo de memória (SHIN et al., 2013). No entanto, alguns fatores de transcrição também possuem o potencial intrínseco de atuar como moduladores epigenéticos, como o fator de transcrição Tcf-1 que pode agir como uma proteína HDAC, com papel essencial para a aquisição do fenótipo de memória (JEANNET et al., 2010; ZHOU et al., 2010; ZHOU; XUE, 2012).

Como outros fatores de transcrição associados à capacidade progenitora, persistência e ao fenótipo de memória, como FOXO1 e LEF1, Tcf-1 é expresso em células T $CD8^+$ naïve e após a ativação sua expressão é suprimida na maior parte das células geradas na expansão clonal, correlacionando com a aquisição do fenótipo clássico de células T $CD8^+$ T_{SLEC} ou T_{TE} ($KLRG1^+CD127^-$) (DANILO et al., 2018; LIN et al., 2016; RAO et al., 2012). Essa regulação negativa de Tcf-1 é fortemente dependente dos mecanismos epigenéticos de metilação do DNA mediado pela Dnmt3a e deposição da marca repressora H3K27me3, depositada pela enzima Ezh2, subunidade catalítica do complexo PRC2 (DANILO et al., 2018; GRAY et al., 2017; YOUNGBLOOD et al., 2017). De forma recíproca, a população que possui alta expressão de Tcf-1 apresenta o fenótipo clássico de células T $CD8^+$ T_{MPEC} ($KLRG1^-$ $CD127^+$). Diferentes trabalhos demostraram que a expressão de Tcf-1 é requerida para a geração de células T $CD8^+$ de memória central, sua função de reativação em resposta secundária e longevidade através da manutenção da população por proliferação homeostática dependente de IL-15 (JEANNET et al., 2010; ZHOU et al., 2010; ZHOU; XUE, 2012).

Um estudo posterior também mostrou que células T $CD8^+$ precursoras de memória com alta expressão de Tcf-1 exibiam características limitadas de diferenciação em um fenótipo efetor, apresentando alta similaridade em seu transcriptoma e paisagem epigenética com células T $CD8^+$ de memória central plenamente diferenciadas, reforçando a ideia de que representavam precursores precocemente comprometidos com esse destino celular (PAIS FERREIRA et al., 2020). De maneira convergente, a deleção de Tcf-1 diminui drasticamente, porém não inibe completamente, a geração de células T $CD8^+$ precursoras de memória ou de memória central, indicando que esse fator de transcrição não é completamente responsável a formação dessas populações (PAIS FERREIRA et al., 2020; ZHOU et al., 2010).

Em 2019, foi relatado que o fator de transcrição Myb também atua como um dos reguladores centrais na geração de células T $CD8^+$ de memória central através do seu papel de restrição da diferenciação terminal de células T $CD8^+$ e promoção de um programa celular de multipotência e longevidade (GAUTAM et al., 2019). Foi demonstrado que a expressão de Myb é requerida para a geração de células T $CD8^+$ de memória central $CD62L^+$ com características de células-tronco multipotente, que

ela correlaciona positivamente com a expressão de *Tcf7* e *Bcl2*, enquanto correlaciona negativamente com a expressão de Zeb2, e seu papel como regulador desses genes foi evidenciado pela ligação direta de Myb aos loci genômicos de *Tcf7* e *Zeb2*. Foi observado também que sua superexpressão provoca o aumento da população de células T $CD8^+$ de memória central, a melhora na polifuncionalidade destas células (definida pela co-expressão múltiplas das citocinas IFN-γ, TNF e IL-2) e melhor reativação em resposta secundária, mostrando que o fator de transcrição também é importante para a regulação da funcionalidade destas células, além da regulação da diferenciação (GAUTAM et al., 2019).

1.5.3 A regulação transcricional e epigenética na diferenciação para o fenótipo de exaustão

Diferente do que se pensava quando primeiramente descrito, o fenótipo de exaustão de células T $CD8^+$ configura um estado diferenciado distinto dos fenótipos efetor e de memória, fenotipicamente, funcionalmente, bem como em relação a seu programa transcricional e epigenético (BELK; DANIEL; SATPATHY, 2022; MCLANE; ABDEL-HAKEEM; WHERRY, 2019; WHERRY; KURACHI, 2015). Estudos iniciais em modelo de infecção viral crônica por LCMV-cl13 mostraram que células T $CD8^+$ exaustas apresentavam um perfil transcricional distinto de células T $CD8^+$ efetoras ou de memória geradas em modelo de infecção viral aguda (DOERING et al., 2012; WHERRY et al., 2007). Em complementação, a análise comparativa de regiões acessíveis na cromatina entre células T $CD8^+$ exaustas, *naïve*, efetoras ou de memória em múltiplos trabalhos (avaliando células T $CD8^+$ exaustas geradas tanto em contexto de infecção viral crônica quanto em modelos de tumor) revelou que células T $CD8^+$ apresentam uma paisagem epigenética distinta dos outros fenótipos, com milhares de regiões diferencialmente acessíveis (BENGSCH et al., 2018; MOGNOL et al., 2017; PAUKEN et al., 2016; PHILIP et al., 2017; SCOTT-BROWNE et al., 2016; SEN et al., 2016). Diversas dessas regiões compreendiam genes associados ao fenótipo de exaustão e a diferenciação para esse fenótipo, como o gene codificante para os receptores inibitórios PD-1 (*Pdcd1*) e Tim-3 (*Havcr2*) ou o fator de transcrição Tox (*Tox*), que se apresentavam mais acessíveis, e genes associados a função efetora, como a citocina pró-inflamatória IFN-γ (*Ifng*), que se apresentavam menos acessíveis.

Consolidando a hipótese de que a exaustão de células T CD8$^+$ configura um estado diferenciado caracterizado por assinaturas transcricionais e epigenéticas próprias, foi demonstrado também que células T CD8$^+$ exaustas geradas em diferentes infecções virais crônicas humanas e em respostas à diferentes tipos de câncer possuem um perfil epigenético conservado com células T CD8$^+$ exaustas murinas (BENGSCH et al., 2018; PRITYKIN et al., 2021; SATPATHY et al., 2019; SEN et al., 2016). Além disso, células T CD8$^+$ exaustas provenientes de humanos e geradas em modelos murinos também apresentaram uma assinatura transcricional comum (BENGSCH et al., 2018). Adicionalmente, a análise do epigenoma de células T CD8$^+$ em tempos diferentes na resposta antitumoral mostrou que o programa de regulação epigenética associado ao processo de diferenciação de células T CD8$^+$ exaustas é dividido em duas fases distintas (PHILIP et al., 2017). Foi observado que após a primeira fase de remodelamento são geradas células T CD8$^+$ exaustas que guardam a capacidade funcional de resgatar suas funções efetoras caso removidas do microambiente tumoral, enquanto após a segunda fase as células T CD8$^+$ exaustas se mostraram terminalmente comprometidas (PHILIP et al., 2017). Esses resultados indicaram que a diferenciação para o fenótipo de exaustão era um processo com múltiplas etapas, o que foi corroborado por trabalhos posteriores que caracterizaram estágios precursores, intermediários e terminais de células T CD8$^+$ exaustas, como mencionado no tópico **1.4.1** (BELTRA et al., 2020; IM et al., 2016; MILLER et al., 2019; PALEY et al., 2012).

Todas essas evidências geradas em análises globais ressaltam a existência de uma rede regulatória constituída de moduladores epigenéticos e fatores de transcrição que arquiteta o processo de diferenciação de células T CD8$^+$ para o fenótipo de exaustão. Diversos fatores de transcrição que participam do processo de diferenciação de células T CD8$^+$ para o fenótipo efetor ou de memória também foram descritos envolvidos na diferenciação para o fenótipo de exaustão (BELK; DANIEL; SATPATHY, 2022; MCLANE; ABDEL-HAKEEM; WHERRY, 2019). Por exemplo, os fatores de transcrição T-bet e Eomes foram descritos como indispensáveis para a diferenciação de células T CD8$^+$ exaustas (PALEY et al., 2012). O fator de transcrição T-bet, associado a diferenciação terminal de células T CD8$^+$ efetoras, em contextos de resposta crônica é requerido para a geração de uma população de células exaustas em estado intermediário, que retém parcialmente sua capacidade funcional,

possivelmente através da sua função de repressão gênica de PD-1 (BELTRA et al., 2020; HUDSON et al., 2019; KAO et al., 2011; RAJU et al., 2021). Por outro lado, vários trabalhos mostraram que os níveis de expressão de Eomes correlacionavam positivamente com a diferenciação terminal de células T $CD8^+$ em células exaustas e sua função foi associada com a regulação de genes distintos em comparação ao seu papel na promoção do fenótipo de memória (DOERING et al., 2012; HUANG et al., 2017; ODORIZZI et al., 2015; PALEY et al., 2012).

Outro fator de transcrição que apresenta funções distintas no contexto de resposta crônica é o NFAT, ativado diretamente abaixo do estímulo via TCR, em um exemplo da importância de como a cooperatividade entre fatores de transcrição modula a trajetória da regulação transcricional. Em tempos precoces em uma resposta viral aguda, a ativação de NFAT e AP-1 promove a indução de genes envolvidos com a ativação de células T e sua resposta efetora, no entanto, em respostas crônicas, é favorecido a atuação de NFAT independente de AP-1, neste caso, promovendo a atenuação da função efetora (MARTINEZ et al., 2015). Em resposta a infecção viral crônica, foi demonstrado que há a prevalência da atividade independente de NFAT, possivelmente através da inibição da formação do complexo AP-1, formado pelas proteínas Jun e Fos, devido ao papel antagônico de BATF que compete por Jun (KURACHI et al., 2014; MARTINEZ et al., 2015; MCLANE; ABDEL-HAKEEM; WHERRY, 2019). O fator de transcrição NFAT na ausência de seu parceiro transcricional AP-1 se liga a genes chave para a diferenciação no fenótipo de exaustão, como os genes para os receptores inibitórios PD-1, Lag-3 e Tim-3 (MARTINEZ et al., 2015).

Em contraste aos exemplos citados acima, alguns outros fatores de transcrição que participam da regulação transcricional no processo de diferenciação de células T $CD8^+$ exaustas cumprem um papel semelhante ao descrito na diferenciação para o fenótipo efetor ou de memória. Dois exemplos são os fatores de transcrição Tcf-1 e Myb, ambos associados com a indução de um estado menos terminalmente diferenciado e com capacidades progenitoras e regenerativas, como as vistas em células T $CD8^+$ exaustas $CD62L^+$ (GAUTAM et al., 2019; TSUI et al., 2022; ZHAO; SHAN; XUE, 2022). Diversos trabalhos mostraram que Tcf-1 é indispensável para a diferenciação e manutenção de células T $CD8^+$ exaustas precursoras, que mantém capacidade progenitora de se renovar através de proliferação homeostática e gerar

outras populações de células exaustas em níveis mais avançados de diferenciação terminal (CHEN et al., 2019; MAN et al., 2017; MILLER et al., 2019; UTZSCHNEIDER et al., 2016; WU et al., 2016). Seguindo o mesmo paralelo, recentemente foi observado que Myb também é um fator de transcrição essencial para a geração de células T $CD8^+$ progenitoras no contexto de respostas crônicas, assim como foi demonstrado para respostas agudas (TSUI et al., 2022). Em células T $CD8^+$ exaustas precursoras, Myb é um regulador positivo da expressão gênica de Tcf-1 (*Tcf7*) e de diversos outros genes associados a esse fenótipo, como para as proteínas de superfície CD62L (*Sell*) e (*Ccr7*), e orquestra a diferenciação dessa população. Além disso, Myb também promove o controle da função efetora de células T $CD8^+$ exaustas, evitando respostas inflamatórias exacerbadas por parte de células T CD8, destacando o papel fundamental desse regulador para a resposta de células T $CD8^+$ em condições crônicas.

Por fim, um conjunto de diferentes trabalhos explorando a regulação transcricional e epigenética de células T $CD8^+$ exaustas culminou na identificação de um fator de transcrição determinístico para a diferenciação nesse fenótipo, o fator de transcrição Tox (ALFEI et al., 2019; KHAN et al., 2019; SCOTT et al., 2019a; YAO et al., 2019). Tanto em modelos de infecção crônica quanto em resposta antitumorais, Tox foi rapidamente induzido pelo estímulo via TCR e sua expressão é mantida em todos os subtipos de células com fenótipo de exaustão, caracterizando um regulador que define a linhagem de células T $CD8^+$ exaustas. Confirmando o seu papel crucial, a superexpressão de Tox em células T $CD8^+$ ativadas *in vitro* recapitula grande parte do fenótipo de exaustão, incluindo a regulação positiva de genes codificantes para receptores inibitórios (Ex: PD-1 e Tim-3), enquanto a deficiência desse fator de transcrição leva a diminuição da expressão destas proteínas em conjunto com o resgate da hiporresponsividade. A importância desse fator de transcrição também foi destacada em análises epigenéticas de células T $CD8^+$ deficientes para Tox, que mostraram que ele é fundamental para induzir acessibilidade de cromatina em genes de proteínas características do fenótipo, como PD-1 e CD39 (KHAN et al., 2019; SCOTT et al., 2019a; SEO et al., 2019).

1.5.4 O papel chave da regulação epigenética na diferenciação de células T $CD8^+$

A modulação da atividade de fatores de transcrição durante processo de diferenciação decorre, dentre outros fatores, do arranjo diferencial de outros

reguladores transcricionais e de regulações epigenéticas diferentes, que originam paisagens epigenéticas características de cada fenótipo. Dois trabalhos recentes investigando o perfil transcricional e epigenético de células T $CD8^+$ geradas em resposta aguda e crônica, utilizando técnicas de scRNA-Seq e scATAC-Seq identificaram assinaturas transcricionais e de regiões de cromatina aberta características de cada fenótipo gerado em ambas as respostas (DANIEL et al., 2022; GILES et al., 2022). De forma notável, foi observado que a caracterização epigenética através da análise de regiões de cromatina diferencialmente acessíveis apresentava uma definição mais consistente dos subtipos de células T $CD8^+$ do que a caracterização transcricional (GILES et al., 2022). Esse dado reforça a importância que a regulação epigenética possui para os processos de diferenciação de células T $CD8^+$ e para o estudo do mecanismo molecular por trás deles.

Várias evidências levantadas nos últimos anos destacaram o papel crucial que a marca epigenética H3K27me3 possui para a regulação epigenética do processo de diferenciação de células T $CD8^+$ tanto em contexto de resposta aguda quanto em contexto de resposta crônica (ARAKI et al., 2009; GRAY et al., 2017; KAKARADOV et al., 2017; LI et al., 2021; RUSS et al., 2014; WEBER et al., 2021; XU et al., 2021). Essa marca epigenética repressora é depositada (“escrita”) pela enzima Ezh2, subunidade catalítica do complexo repressor Polycomb 2 (PRC2), e removida (“apagada”) pela enzima Kdm6b. Muitos trabalhos focados na investigação do papel dessas enzimas foram publicados na literatura recentemente, demonstrando como ambas são cruciais para a diferenciação de células T $CD8^+$ no fenótipo efetor (GRAY et al., 2017; KAKARADOV et al., 2017; LI et al., 2021; XU et al., 2021). No entanto, PRC2 não é o único complexo epigenético formando por proteínas da família Polycomb, existindo também o complexo PRC1, o qual pouco se sabe sobre o seu papel na diferenciação de células T $CD8^+$. Se faz necessário mais estudos investigando o papel de PRC1 na diferenciação de células T $CD8^+$, uma vez que além de possuir a capacidade de participar de mecanismos epigenéticos independentes PRC1 pode atuar também em cooperação com PRC2.

1.6 Os complexos repressores Polycomb 1 e 2

Os complexos repressores Polycomb 1 e 2 (PRC1 e PRC2, respectivamente), são complexos constituídos por proteínas do grupo Polycomb (PcG), que atuam na regulação da estrutura da cromatina e na modulação epigenética da expressão gênica

(BLACKLEDGE; KLOSE, 2021; MARGUERON; REINBERG, 2011; MELO et al., 2022). Ambos os complexos apresentam função de repressão gênica, decorrente principalmente de seus mecanismos de modificação pós-traducional em caudas de histonas (BLACKLEDGE; KLOSE, 2021; KOUZARIDES, 2007; MELO et al., 2022).

O PRC1 realiza a deposição da marca repressora de ubiquitinação da lisina 119 da histona H2A (H2AK119Ub) através da sua subunidade catalítica E3 ubiquitina ligase Ring1A ou Ring1B. O PRC2, por sua vez, realiza a mono-, di- ou trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27me1-3) e, além do papel central de Ezh2 previamemente mencionado, pode contar com subunidade catalítica metiltransferase Ezh1. Ambos os complexos são constituídos por várias subunidades, além das subunidades catalíticas, que podem ser representadas em isoformas diferentes. Além disso, parte dessas subunidades são acessórias e ambos os complexos podem ser montados em diferentes configurações. Dessa maneira, tanto PRC1 quanto PRC2 se apresentam em diferentes variantes estruturalmente e funcionalmente distintas, sendo o grupo de complexos PRC1 o mais heterogêneo (BLACKLEDGE; KLOSE, 2021; MELO et al., 2022; PIUNTI; SHILATIFARD, 2021).

Apesar da gama de combinações possíveis em células de mamíferos, ambos PRC1 e PRC2 apresentam subunidades que não variam, que definem o cerne do complexo (BLACKLEDGE; KLOSE, 2021; GAO et al., 2012). O cerne do complexo PRC1 é formado pela subunidade catalítica Ring1A ou Ring1B e pela proteína PCGF (do inglês *Polycomb group ring finger*), que pode apresentar seis diferentes isoformas (PCGF1-6). Esse cerne pode interagir com outras subunidades de PRC1, uma das isoformas da proteína Chromobox (Cbx2, Cbx4, Cbx6, Cbx7 ou Cbx8) ou a proteína RYBP (do inglês *Ring1 and YY1 binding protein* ou seu homólogo YAF2), de forma mutualmente exclusiva. Complexos PRC1 constituídos pela interação das proteínas do cerne com proteínas Cbx são nomeados complexos PRC1 canônicos (cPRC1), mais similares aos complexos descritos na espécie modelo *Drosophila melanogaster*. Já as variantes de complexos PRC1 que interagem com RYBP/YAF2 são nomeados de PRC1 não canônicos (ncPRC1). Baseado na isoforma de PCGF, seis diferentes variantes de ncPRC1 já foram descritas, formadas pela interação com diferentes proteínas acessórias. Da mesma maneira que para o PRC1, o complexo PRC2 em mamíferos pode se apresentar em duas variantes diferentes, o PRC2.1 e o PRC2.2, e ambas apresentam subunidades constantes que definem um cerne. São elas a

subunidade catalítica Ezh1 ou Ezh2, a proteína EED, a proteína Suz12 e a proteína RBBP4/7 (ou RbAP48/46).

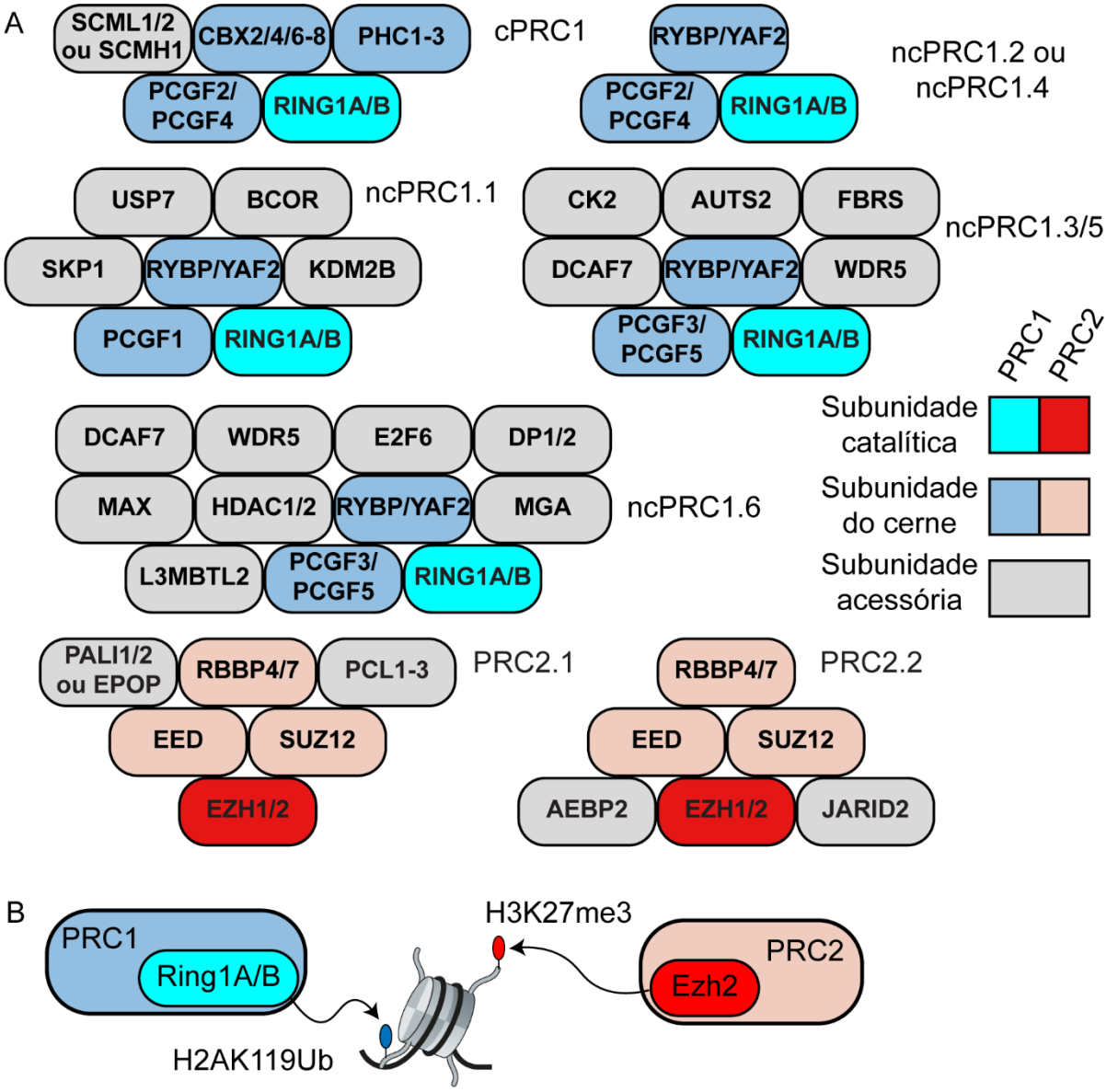


Figura 6. Os complexos repressores Polycomb 1 e 2. (**A**) Os complexos repressores Polycomb (PRC)1 e 2 são complexos proteicos com importante papel na regulação epigenética capazes de desempenhar diversas funções, sendo a principal delas a deposição de marcas repressoras através de suas subunidades catalíticas. Os PRCs podem se apresentar em diferentes configurações, sendo as possíveis configurações de PRC1 divididas em variantes canônicas (cPRC1) e não canônicas (ncPRC1). (**B**) O PRC1 realiza a ubiquitinação na lisina 119 da histona H2A (H2AK119Ub) catalisada pela subunidade Ring1A ou Ring1B, enquanto o PRC2 realiza a trimetilação na lisina 27 da histona H3 (H3K27me3) catalisada pela subunidade Ezh1 ou Ezh2.

A deposição da marca repressora H3K27me3 do PRC2 é um dos principais e mais bem descritos mecanismos de repressão mediados por proteínas Polycomb. A marca H3K27me3 promove a repressão de transcrição gênica diminuindo a acessibilidade da cromatina no local onde é depositada através do recrutamento da

maquinaria de compactação da cromatina, competindo com outros complexos moduladores da cromatina com função ativadora, como o complexo SWI/SNF, e inibindo a atividade de complexos que depositam marcas ativadoras, como a acetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27Ac) (BLACKLEDGE; KLOSE, 2021; SCHUETTENGRUBER et al., 2017). Além disso, é descrito que a H3K27me2 também possui função repressora ao inibir a acetilação da H3K27, ocupando o substrato dessa marca. O papel de grande importância da H3K27me3 para o controle da acessibilidade de cromatina e da diferenciação celular já foi demonstrada em vários tipos celulares de mamíferos, incluindo células embrionárias, células progenitores de diferentes linhagens (incluindo na linhagem hematopoiética), células do sistema imune (precursoras ou diferenciadas) e células cancerosas (MARGUERON; REINBERG, 2011; MELO et al., 2022; NUTT et al., 2020; PIUNTI; SHILATIFARD, 2021).

Em contraste com o papel da marca H3K27me3, a essencialidade da marca do PRC1, H2AK119Ub, para o mecanismo de repressão mediado por proteínas Polycomb é controverso (BLACKLEDGE; KLOSE, 2021; MELO et al., 2022; PIUNTI; SHILATIFARD, 2021). Embora alguns estudos mostrem que a atividade E3 ubiquitina ligase seja dispensável para a atividade repressora de PRC1 no modelo de *D. melanogaster* e em células tronco embrionárias murinas (mESC, do inglês *Mouse Embryonic Stem Cells*), estudos mais recentes levantaram evidências de que esse é um mecanismo essencial para a repressão da expressão gênica mediada por PRC1 (BLACKLEDGE et al., 2020; ENDOH et al., 2012; ESKELAND et al., 2010; ILLINGWORTH et al., 2015; PENGELLY et al., 2015; TAMBURRI et al., 2020). Além disso, também é descrito que variantes canônicas e não canônicas de PRC1 apresentam potenciais distintos de exercer a função catalítica de Ring1A/B, sendo observado que complexos ncPRC1 apresentam um papel mais proeminente na deposição de H2AK119Ub (GAO et al., 2012; ROSE et al., 2016; TAHERBHOY; HUANG; COCHRAN, 2015). Além da deposição de H2AK119Ub, os complexos PRC1 podem exercer outros mecanismos epigenéticos que incluem: (i) a indução da compactação local da cromatina mediada pela interação entre as subunidades Phc ou Cbx; (ii) a interferência com complexos remodeladores da cromatina ativadores (Ex:SWI/SNF) e RNA polimerase II e; (Iii) a estabilização de alças de cromatina, formando interações de longo alcance, que podem ser mediadas também pela

interação de subunidade Phc e Cbx (BLACKLEDGE; KLOSE, 2021; SCHUETTENGRUBER et al., 2017).

Primeiramente descrito em *D. melanogaster*, era suposto que os complexos PRC1 e PRC2 funcionavam de forma hierárquica (WANG et al., 2004). Isso devido ao potencial da subunidade do cerne do cPRC1, Cbx, de reconhecer e se ligar a marca de PRC2, a H3K27m3, através de seu cromodomínio (BERNSTEIN et al., 2006b; FISCHLE et al., 2003; KAUSTOV et al., 2011). Dessa maneira, PRC2 depositaria sua marca repressora em alvos genômicos e assim recrutaria também a atividade repressora de PRC1 para esses alvos, que sofreriam a deposição de H2AK119Ub, reforçando a sinalização repressora e de compactação da cromatina. No entanto, diversos trabalhos mostraram que ambos os complexos podem funcionar de forma independente ao outro, sendo observados regiões genômicas que receberam a deposição exclusiva da marca de apenas um dos complexos (KU et al., 2008; SCHOEFTNER et al., 2006). Foi demonstrado também que a atividade repressora de PRC2 poderia ser recrutada por H2AK119Ub, indicando um cenário muito mais complexo e dinâmico do que o anteriormente pensado, e mostrando que ambos os complexos podem cooperar sem uma hierarquia fixa (BLACKLEDGE et al., 2014; COOPER et al., 2014). Por fim, além do recrutamento via reconhecimento da marca depositada por um dos complexos, outros mecanismos de recrutamento independentes da cooperação entre os dois complexos já foram descritos para ambos, incluindo o recrutamento mediado pela ligação a ilhas de CpG (FARCAS et al., 2012; KU et al., 2008), o recrutamento mediado por RNAs longos não-codificantes (lncRNAs, do inglês *long non-coding RNAs*) (BONASIO et al., 2014; PINTACUDA et al., 2017), e o recrutamento por ligação a domínios de sequência específica (motivos T-box, E-box etc.) (HUANG et al., 2018; STIELOW et al., 2018).

Um outro aspecto que aumenta a variedade de contextos em que proteínas do grupo Polycomb podem atuar é que algumas das subunidades de ambos os complexos podem atuar de forma independente ao PRC (MELO et al., 2022; NUTT et al., 2020). Em especial, a subunidade catalítica do PRC2, Ezh2, já foi descrita exercendo função metiltransferase de proteínas não histona, incluindo fatores de transcrição, e exercendo funções fora do núcleo, como por exemplo na regulação da polimerização de actina (SU et al., 2005; VASANTHAKUMAR et al., 2017). Outros exemplos incluem as subunidades do PRC1: (i) Ck2, com função serina/treonina

quinase, importante reguladora de várias etapas do ciclo celular; (ii) KDM2B e HDAC1/2, proteínas apagadoras de marcas de histona que atuam na demetilação e deacetilação, respectivamente e; (iii) Cbx4, proteína Chromobox, alvo do presente trabalho, que além de seu cromodomínio também apresenta motivos de interação com SUMO (SIM, do inglês *SUMO Interacting Motifs*) (BLACKLEDGE; KLOSE, 2021; MERRILL et al., 2010). A família de proteínas SUMO consiste em proteínas modificadoras pequenas similares a ubiquitina que são conjugadas através da atividade de enzimas SUMO E1, E2 e E3, reação conhecida como SUMOilação. É importante notar que os domínios SIM de Cbx4 também estão associados à função E3 SUMO ligase independente à atuação no cPRC1 (MERRILL et al., 2010).

A compreensão dos processos de SUMOilação por Cbx4 é de fundamental importância visto que a conjugação de SUMO à uma proteína substrato pode desencadear diversos efeitos, como alterar a sua conformação, modular sua atividade ou estabilidade, ou ainda modificar sua interação a outras proteínas parceiras ou moléculas associadas, como o DNA (GEISS-FRIEDLANDER; MELCHIOR, 2007; ZHAO, 2018). É relatado na literatura que a função E3 SUMO ligase de Cbx4 e a interação de Cbx4 com SUMO podem influenciar mecanismos epigenéticos mediados por proteínas Polycomb, modulando a atividade de Ezh2, a subunidade catalítica de PRC2, e regulando o recrutamento de PRC1 para sítios marcados por H3K27me3 (ISMAIL et al., 2012; KANG et al., 2010; WU et al., 2022). Também é descrito que Cbx4 participa do controle da atividade e estabilidade de diversos reguladores transcricionais através da sinalização por SUMO, incluindo proteínas envolvidas na diferenciação de células T $CD8^+$, como o modulador epigenético Dnmt3a e o fator de transcrição Hif-1α (CHEN et al., 2018b; JIANG et al., 2020; LI et al., 2007, 2014a).

Apesar de serem extensamente estudadas em modelos de células mESC em mamíferos e terem seu papel bem descrito em etapas de diferenciação nas fases de desenvolvimento embrionário, a atuação dos PRCs em diversas etapas de diferenciação na linhagem de célula T já foi previamente investigado. No entanto, os mecanismos moleculares em que os PRCs participam na regulação da diferenciação de células T não são completamente conhecidos e diversas lacunas nesse conhecimento ainda permanecem em aberto. Na sessão a seguir serão descritas algumas das principais descobertas a respeito do papel das proteínas Polycomb em

células T, assunto que foi também explorado no trabalho de revisão recentemente publicado pelo grupo anexado a este documento (**ANEXO A**, MELO et al., 2022).

1.7 O papel das proteínas Polycomb em células T

1.7.1 O papel das proteínas Polycomb no desenvolvimento de células T

Diversos trabalhos utilizando modelo murino demonstraram o papel de proteínas Polycomb para a regulação da proliferação, sobrevivência e diferenciação de timócitos, em particular no estágio DN3 e em estágios menos diferenciados (IKAWA et al., 2016; JACOBSEN et al., 2017; ONODERA; NAKAYAMA, 2015; ORAVECZ et al., 2015). Em contraste, estudos utilizando modelos de deleção genômica condicional das subunidades catalíticas de PRC1 ou PRC2 a partir do estágio DP ($Ring1a^{-/-}Ring1b^{fl/fl}Cd4^{Cre}$ ou $Ezh2^{fl/fl}Cd4^{Cre}$, respectivamente) mostraram ausência de impacto no desenvolvimento tímico de células T, indicando a participação das atividades repressoras dos PRCs em fases mais precoces (SU et al., 2005; VASANTHAKUMAR et al., 2017).

Foi demonstrado que a deficiência da subunidade catalítica de qualquer um dos complexos leva a um grave prejuízo na diferenciação dos timócitos, marcado pela incapacidade de progressão da fase DN3. Isto ocorre pela ausência de mecanismos repressores de genes associados a outras linhagens celulares e falha na manutenção da identidade com a linhagem de célula T. Ezh2, em parceria com o fator de transcrição Ikaros, reprime genes ativados pela via de Notch e genes associados a HSCs, que precisam ser silenciados nos timócitos para a progressão além do estágio DN3 (ORAVECZ et al., 2015). Também foi descrito que os genes associados a linhagem de células B *Pax5* e *Ebf1* são alvo de silenciamento mediado pela atividade de PRC2 e PRC1 em timócitos, mecanismo importante para a manutenção da identidade com a linhagem de células T (IKAWA et al., 2016; OGURO et al., 2010).

Outro mecanismo molecular importante onde foi descrito o envolvimento de proteínas Polycomb é o controle da expressão de *Cdkn2a*, gene codificante para as proteínas com função de inibição do ciclo celular e indução de apoptose $p16^{INK4A}$ e $p19^{Arf}$ (AKASAKA et al., 1997; JACOBS et al., 1999; JACOBSEN et al., 2017; MIYAZAKI et al., 2008). Foi observado que Cdkn2a é um alvo direto da atividade metiltransferase de Ezh2 e alvo de ligação das proteínas do cPRC1 Pcgf4 e Cbx2, indicando possível atuação cooperativa de ambos os complexos para a repressão

desse gene. A desrepressão do gene em decorrência da deficiência em Ezh2 resultou em uma grave queda dos números de timócitos DN4 e DP, indicando que o aumento desse gene levou não somente a supressão da progressão do ciclo celular e proliferação, mas também do impedimento da diferenciação do timócitos.

Apesar de observadas essas evidências da participação dos complexos PRCs no processo de desenvolvimento de células T no timo, principalmente, em relação a atividade de deposição da H3K27me3, o papel de PRC1 ainda não é totalmente claro. Essa falta de informação é ainda maior em relação à identificação de qual variante de cada complexo participa desses mecanismos regulatórios e à possível cooperação entre os complexos nesses processos.

1.7.2 O papel das proteínas Polycomb na diferenciação de células T CD4$^+$

Como mencionado anteriormente, as células T CD4$^+$ se diferenciam em fenótipos distintos de células T auxiliares de acordo com o conjunto de sinais que recebem no momento da sua ativação (ver **1.2.1.1**). Esses sinais culminam na ativação e repressão de diferentes fatores de transcrição (reguladores mestres) que dirigem a aquisição de um programa relacionado a um dos fenótipos de células T CD4$^+$ auxiliar. A atuação desses reguladores mestres é modulada pelo controle da estrutura da cromatina através de mecanismos epigenéticos, e um dos mecanismos descritos na participação do processo de diferenciação de células T CD4$^+$ é a deposição de marcas epigenéticas, como a marca repressora do PRC2, H3K27me3.

Foi demonstrado em diferentes estudos que os genes codificantes para os reguladores mestres dos subtipos de células T CD4$^+$ T_H1 (*Tbx21*), T_H2 (*Gata3*) e T_{REG} (*Foxp3*) são alvos da atividade metiltransferase de Ezh2, subunidade catalítica do PRC2 em células T CD4$^+$ naïve. Além disso, também em células T CD4$^+$ naïve, a expressão gênica de citocinas chave desses fenótipos (*Ifng*, *Il4*, *Il5*, *Il13* e *Il10*) é reprimida através da deposição de H3K27me3 (TUMES et al., 2013; WEI et al., 2009; XIONG et al., 2012; ZHANG et al., 2014). Esses achados evidenciam o papel de PRC2 como regulador do processo de diferenciação e função das células T CD4$^+$. De maneira similar, genes essenciais para a função efetora de células T_H17, que codificam as citocinas IL-22, IL-10, IL-9 e para o fator de transcrição regulador positivo da IL-17A, Atf-3, são alvos de deposição de H3K27me3 e a inibição da atividade

metiltransferase de Ezh2 é essencial para a diferenciação nesse fenótipo (ESCOBAR et al., 2014).

Mesmo após a completa diferenciação das células T $CD4^+$, a atividade repressora de PRC2 sobre os diferentes genes de reguladores mestres e citocinas é essencial para a manutenção da identidade de linhagem da célula T $CD4^+$ e regulação da plasticidade destas células. Diferentes trabalhos mostraram que PRC2 é essencial para a repressão de genes associados a outros fenótipos em células T $CD4^+$ diferenciadas, como por exemplo a repressão dos genes associados ao fenótipo T_H2 *Gata3* e *Il4* em células T $CD4^+$ T_H1 e a repressão dos genes associados ao fenótipo T_H1 *Tbx21* e *Ifng* em células T $CD4^+$ T_H2 (TUMES et al., 2013). A estabilização do programa transcricional associado ao fenótipo regulatório em células T_{REG} e a repressão de uma transição para um fenótipo de célula T_{REG} inflamatória também é dependente da atividade repressora de PRC2 (ARVEY et al., 2014; DUPAGE et al., 2015).

Como nas células T em fase de desenvolvimento, foi observado que células T $CD4^+$ T_{FH} também reprimem a expressão de *Cdkn2a* através da deposição de H3K27me3. Esse mecanismo de inibição é importante para a manutenção da sobrevivência e do processo de diferenciação dessas células, uma vez que a proteína pró-apoptótica $p19^{Arf}$, codificada pelo gene *Cdkn2a*, é antagonista de Bcl-6, regulador mestre de células T_{FH} (LI et al., 2018). Evidências do papel de PRC2 na repressão de *Cdkn2a* e de outros genes de inibidores de ciclo celular e proteínas pró-apoptóticas (*Cdkn1a*, *Cdkn2b*, *Pmaip1* e *Perp*), também foram mostradas para células T $CD4^+$ polarizadas para o fenótipo T_H1 *in vitro*, assim como o prejuízo na proliferação e sobrevivência de células T $CD4^+$ T_H1 diferenciadas em resposta a infecção por *Toxoplasma gondii* em animais deficientes em Ezh2 ($Ezh2^{fl/fl}Cd4^{Cre}$) (YANG et al., 2015).

1.7.3 O papel das proteínas Polycomb na diferenciação de células T $CD8^+$

A regulação transcricional mediada pela deposição de marcas repressoras e ativadoras de histona é um fator importante na diferenciação de células T $CD8^+$ e nas alterações do programa transcricional associado a esse processo (ARAKI et al., 2009; HENNING; ROYCHOUDHURI; RESTIFO, 2018). Em exemplo disso, evidências iniciais mostraram que diversos fatores de transcrição associados à diferenciação de

células T $CD8^+$ no fenótipo efetor ou de memória apresentam rápidas alterações no perfil de modificações de histona em regiões bivalentes (que apresentam concomitantemente marcas repressoras e ativadoras) logo após a ativação da célula T $CD8^+$, caracterizadas principalmente pela perda da marca repressora H3K27me3 e aumento da marca ativadora H3K4me3 (RUSS et al., 2014). Diversos outros genes envolvidos com a função efetora e ativação da célula T $CD8^+$ também apresentam esse perfil de alteração (RUSS et al., 2014). Esse papel central da marca H3K27me3, depositada pelo PRC2, suscitaram vários estudos posteriores focados na investigação desse modulador epigenético em células T $CD8^+$.

Em modelo de infecção viral aguda por LCMV foi demonstrado que a atividade metiltransferase de Ezh2, subunidade catalítica do PRC2, é fundamental para o comprometimento de células T $CD8^+$ com a diferenciação para o fenótipo efetor através do silenciamento de genes associados a memória (Figura 7) (GRAY et al., 2017; KAKARADOV et al., 2017). Entre esses genes se destacam fatores de transcrição com papel crítico na diferenciação para o fenótipo de memória, como *Tcf7*, *Bach2* e *Id3* (GRAY et al., 2017). Em concordância, a análise fenotípica de células T $CD8^+$ deficientes em Ezh2 (de animais com nocaute condicional de Ezh2 em células T, $Ezh2^{fl/fl}Cd4^{Cre}$) nesse mesmo modelo de infecção revelou prejuízo na geração de células T $CD8^+$ de fenótipo efetor ($KLRG1^+CD127^-$) e o aumento da expressão de moléculas associadas ao fenótipo de memória CD62L, CD27 e os fatores de transcrição Tcf-1, Eomes e Foxo1 (GRAY et al., 2017; KAKARADOV et al., 2017). Somado a isso, a análise por scRNA-Seq de células T $CD8^+$ ativadas em resposta a infecção vira aguda por LCMV mostrou que células T $CD8^+$ destinadas com o fenótipo efetor logo após a primeira divisão pós-ativação regulavam positivamente a expressão dos genes codificantes para as subunidades do cerne do PRC2, indicando o recrutamento da atividade de PRC2 logo após a ativação da célula T $CD8^+$ (KAKARADOV et al., 2017). Essa participação precoce foi corroborada por outros trabalhos, que revelaram a regulação positiva da expressão de várias proteínas Polycomb horas após a ativação, mesmo antes da primeira divisão, bem como da expressão e atividade da demetilase Kdm6b, responsável por remover a marca H3K27me3 (LI et al., 2021; XU; PEREIRA; MARTINEZ, 2021). Em conjunto, esses estudos demonstram a importância da atividade de PRC2 e a regulação da marca

H3K27me3 para a diferenciação de células T $CD8^+$ em momentos bem precoces do curso da resposta dessas células.

A investigação da participação de Ezh2 na função efetora de células T $CD8^+$ em modelos distintos de resposta aguda mostraram resultados conflitantes. Em infecção viral aguda por LCMV foi observada a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN-γ e TNF) e prejuízo no controle da carga viral em células deficientes para Ezh2 ($Ezh2^{fl/fl}Gzmb^{Cre}$ e $Ezh2^{fl/fl}Cd4^{Cre}$), enquanto em modelo de infecção bacteriana por *L. monocytogenes* foi observado o aumento da função efetora, caracterizado pela maior produção de IFN-γ, TNF e Granzima B (CHEN et al., 2018a; GRAY et al., 2017; KAKARADOV et al., 2017).

Alinhado com a ideia de que Ezh2 promove uma melhor função efetora, foi observado em diferentes estudos que a atividade desse modulador epigenético correlaciona com uma melhor resposta antitumoral (HE et al., 2017; KOSS et al., 2020; WEBER et al., 2021). A inibição farmacológica de Ezh2 em células T $CD8^+$ provocou o prejuízo na resposta antitumoral, embora provocasse o aumento da citocina TNF e maior produção de Granzima B, como observado para células T $CD8^+$ $Ezh2^{fl/fl}Cd4^{Cre}$ em modelo de *L. monocytogenes* (KOSS et al., 2020). Além disso, a inibição de Ezh2 em células T $CD8^+$ ativadas *in vitro* levou ao aumento de moléculas associadas à exaustão, como os receptores inibitórios PD-1, Lag-3, CTLA-4 e TIGIT, e os fatores de transcrição Nr4a e Tox (KOSS et al., 2020). Em concordância, a superexpressão do mutante de Ezh2 com função histona metiltransferase aumentada ($Ezh2^{Y641F}$) aumentou a resposta antitumoral de células T $CD8^+$ exaustas e a inibição farmacológica de Ezh2 em células T $CD8^+$ CAR-T (do inglês *Chimeric Antigen Receptor CD8 T Cell*) mostrou que Ezh2 é essencial para a recuperação da funcionalidade células CAR-T em estratégias imunoterapêuticas (KOSS et al., 2020; WEBER et al., 2021).

Em modelos de resposta aguda e crônica, também foi demonstrado o papel de Ezh2 no controle do ciclo celular, proliferação e morte de células T $CD8^+$ através da repressão da expressão dos genes pró-apoptóticos Cdkn2a, Cdkn1c e Bim e foi visto que a sua deficiência provoca o aumento de apoptose em modelos de infecção viral aguda por LCMV e modelo de resposta antitumoral (CHEN et al., 2018a; HE et al., 2017; KAKARADOV et al., 2017).

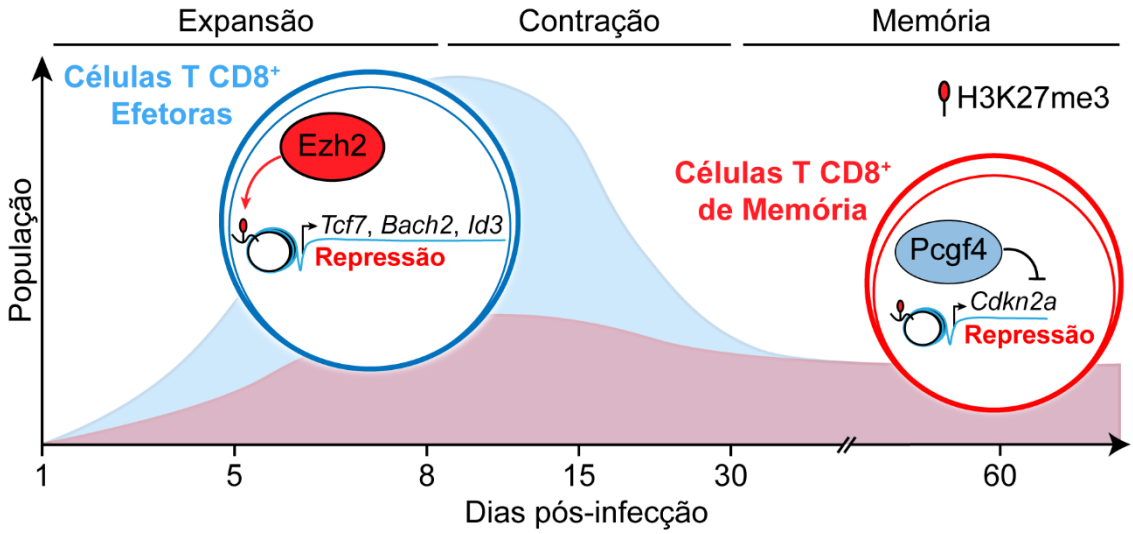


Figura 7. O papel relatado de proteínas Polycomb em células T CD8⁺. É descrito na literatura que a subunidade catalítica do PRC2, Ezh2, possui papel fundamental na diferenciação de células T CD8⁺ para o fenótipo efetor através da repressão de genes associados com a diferenciação para o fenótipo de memória, como os genes de fatores de transcrição *Tcf7*, *Bach2* e *Id3*. Também é descrito que a proteína Pcgf4, subunidade do PRC1, é fundamental para a manutenção da sobrevivência de células T CD8⁺ de memória através da inibição do gene Cdkn2a, que codifica as proteínas pró-apoptóticas e reguladoras do ciclo celukar $p16^{INK4a}$ e $p19^{Arf}$.

Por fim, existem poucas descrições sobre o papel de outras proteínas Polycomb, além de Ezh2, na regulação da diferenciação e função de células T CD8⁺. Uma dessas descrições é sobre o papel da regulação do gene *Cdkn2a* pela proteína Pcgf4 (Bmi-1) (HEFFNER; FEARON, 2007; JACOBS et al., 1999; MIYAZAKI et al., 2008). Foi mostrado que células T CD8⁺ *naïve* e de memória (quiescentes e em proliferação homeostática) apresentavam repressão de *Cdkn2a* dependente da expressão de Pcgf4, e células T CD8⁺ efetoras terminalmente diferenciadas, caracterizadas pela expressão de KLRG1, perdiam a expressão desse membro Polycomb e regulavam positivamente o gene pró-apoptótico inibidor do ciclo celular (Figura 7) (HEFFNER; FEARON, 2007).

2 JUSTIFICATIVA

O processo de diferenciação de células T CD8⁺, após sua ativação, no fenótipo efetor ou de memória é altamente dinâmico e complexo, coordenado pela participação cooperativa de diversos fatores de transcrição que regulam o programa transcricional da célula T CD8⁺ e moduladores epigenéticos que controlam a acessibilidade da cromatina e a atividade desses fatores de transcrição (CHANG; WHERRY; GOLDRATH, 2014; CHEN et al., 2018c; DIAO; PIPKIN, 2019; HENNING;

ROYCHOUDHURI; RESTIFO, 2018; KAECH; CUI, 2012; PEREIRA et al., 2017; XU; PEREIRA; MARTINEZ, 2021). Diversos participantes desse processo, e sua contribuição para o mecanismo molecular de diferenciação, já foram identificados e descritos. Entre eles, está o PRC2.

Foi demonstrado, em modelo de infecção viral aguda por LCMV, que a atividade metiltransferase de PRC2 possui um papel central na diferenciação de células T $CD8^+$, auxiliando no comprometimento com o fenótipo efetor e silenciando genes associados ao fenótipo de memória (GRAY et al., 2017; KAKARADOV et al., 2017; LI et al., 2021; XU et al., 2021). Foi observado ainda que o controle da deposição de H3K27me3 ocorre de forma muito precoce no processo de diferenciação, com evidências de que PRC2 e a demetilase Kdm6b (que atua em contraparte, removendo a marca H3K27me3), atuam tão cedo quanto na primeira divisão da célula T $CD8^+$ ativada (KAKARADOV et al., 2017; LI et al., 2021; QUEZADA et al., 2023). A função repressora de PRC2 é direcionada contra importantes orquestradores do programa transcricional de memória, como os fatores de transcrição Tcf-1, Bach2 e Id3, e foi mostrado que a ausência da sua atividade leva a um significativo prejuízo na geração de células T $CD8^+$ efetoras (GRAY et al., 2017). Vários trabalhos mostraram também que a subunidade catalítica de PRC2, Ezh2, participa da regulação da função efetora de células T $CD8^+$ ativadas em diferentes modelos de infecção e em modelo de resposta antitumoral. Além disso, foi observado que tanto subunidades de PRC2 (Ezh2) quanto de PRC1 (Bmi-1) participam do controle do regulador chave do ciclo celular e sobrevivência *Cdkn2a* em células T $CD8^+$ (CHEN et al., 2018a; HEFFNER; FEARON, 2007).

Embora muitas evidências do papel de PRC2 no controle da diferenciação, função efetora, metabolismo e ciclo celular de células T $CD8^+$ tenham sido descritas nos últimos anos, pouco se sabe sobre o papel de PRC1 nesses processos (MELO et al., 2022). Além disso, devido à variedade de formas que o PRC1 pode apresentar, é fundamental a identificação de quais as subunidades desse complexo estão associadas à regulação dos diferentes processos citados acima, podendo assim ser identificado a variante de PRC1 em trabalho. Por fim, é crucial a investigação das possíveis interações de cooperação entre os complexos para que seja completamente compreendido o mecanismo de repressão mediado por proteínas Polycomb em células T $CD8^+$.

Nesse contexto, se faz necessário investigações mais profundas a respeito do papel de proteínas do grupo Polycomb no mecanismo molecular responsável pela regulação dos processos biológicos de células T CD8$^+$, com ênfase na diferenciação e na função efetora dessas células. A descoberta dessas informações é importante para a conquista de uma melhor compreensão dos circuitos regulatórios por trás desses processos e para a sua utilização na proposta de novas estratégias terapêuticas ou na melhoria das estratégias já aplicadas em clínica.

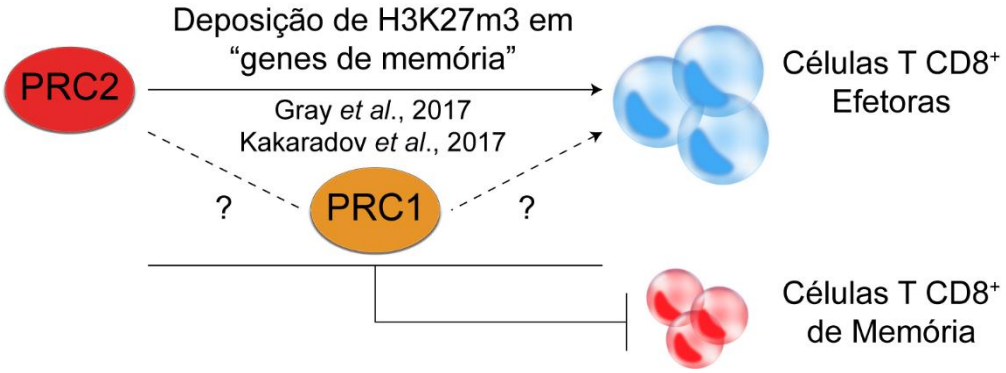


Figura 8. Esquematização da hipótese de que PRC1 participa da regulação da diferenciação de células T CD8$^+$ em colaboração com PRC2. É demonstrado que PRC2 promove a diferenciação para o fenótipo efetor através da deposição da sua marca repressora, H3K27me3, nos *loci* de genes associados ao fenótipo de memória. No entanto, não é conhecido se PRC1 também participa desse mecanismo, atuando em cooperação ou de forma independente, para a regulação da diferenciação de células T CD8$^+$ no fenótipo efetor ou de memória.

3 OBJETIVOS

Investigar o papel do Complexo Repressor Polycomb 1 canônico (cPRC1), com foco na subunidade Cbx4, no processo de diferenciação de células T CD8$^+$. Para cumprir com esse objetivo, foram estipulados os objetivos específicos:

1. Investigar o efeito da deficiência em subunidades do PRC1 na regulação do fenótipo e funcionalidade de células T CD8$^+$ diferenciadas em modelo de infecção viral aguda;

2. Estudar o impacto da deficiência em subunidades do PRC1 para a regulação do perfil transcricional de células T CD8$^+$ diferenciadas em modelo de infecção viral aguda por LCMV;

3. Investigar o efeito da deficiência em Cbx4 na regulação do fenótipo e funcionalidade de células T CD8$^+$ diferenciadas *in vitro*;

4. Avaliar a consequência da deficiência em Cbx4 para regulação do fenótipo e funcionalidade de células T $CD8^+$ reativadas em resposta secundária;

5. Investigar o efeito da superexpressão de Cbx4 e de construções mutantes de Cbx4 na regulação do fenótipo e funcionalidade de células T $CD8^+$ diferenciadas *in vitro* e em modelo de infecção viral aguda;

6. Estudar a contribuição do cromodomínio e dos motivos SIM de Cbx4 para seu papel no controle da diferenciação e função de células T CD8;

7. Investigar o efeito da deficiência em Cbx4 na regulação do fenótipo e funcionalidade de células T $CD8^+$ diferenciadas em modelo de infecção viral crônica.

4 METODOLOGIA

4.1 Camundongos

Todos os camundongos utilizados no projeto de pesquisa foram de fundo genético da linhagem C57BL/6. Os animais utilizados nos experimentos descritos neste trabalho apresentavam idade entre 6 e 8 semanas de vida e os grupos experimentais foram combinados para que os camundongos fossem igualmente distribuídos em relação ao sexo e idade. Em colaboração com o Profº Dr. Gustavo Martinez, foram utilizados animais das linhagens de camundongos transgênicos P14 Thy1.1 e P14 Thy1.1 $CD4^{Cre}$. A linhagem de camundongos P14 (Taconic) é manipulada geneticamente para que as células T $CD8^+$ destes animais sejam constituídas de apenas um clone, que possui a expressão de um TCR que reconhece de forma específica o epítopo gp33-41 do LCMV. No laboratório do Prof. Gustavo Martinez, essas linhagens foram cruzadas com a linhagem transgênica $Cbx4^{fl/fl}$ (obtidos através da colaboração com o professor Dr. Guoliang Xu – Instituto de Bioquímica e Biologia Celular, China) (LIU et al., 2013) para a geração de animais $Cbx4^{fl/fl}Cd4^{Cre}$ e P14 $Thy1.1^+$ $Cbx4^{fl/fl}Cd4^{Cre}$. Todos os animais foram mantidos em biotérios livres de patógenos específicos e utilizados seguindo os protocolos aprovados e estabelecidos pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) na UFRJ (experimentos envolvendo a utilização de animais foram aprovados sobe os protocolos 079/16 e 054/20 aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRJ) e pelo comitê institucional de cuidados e uso de

animais (*Institutional Animal Care and Use Committee*, IACUC), na Rosalind Franklin University of Medicine and Science (North Chicago, IL, EUA).

4.2 Isolamento de células T CD8$^+$ *naïve* de camundongos

Camundongos foram eutanasiados e dissecados em ambiente estéril no interior de cabines de biossegurança de fluxo laminar para a extração de órgãos linfoides secundários. Foram extraídos o baço e linfonodos inguinais, axilares, sub-braquiais e cervicais. Em uma placa de Petri estéril, os órgãos foram processados macerando-os sobre uma malha de nylon autoclavada de aproximadamente 100 µm, ou um *cell strainer* de 70 µm, resultando em uma suspensão de células únicas que foram transferidas para um tubo de centrífuga de 15 mL. Essa suspensão foi centrifugada a 400 x g, por 5 minutos, a 4ºC e o precipitado de células foi clarificado através da remoção do sobrenadante e ressuspensão das células na solução tampão comercial para lise de hemácias *ACK* (do inglês, *Ammonium-Chloride-Potassium(K)*) *Lysing Buffer* (Gibco™ Thermo-Fisher Scientific), na proporção de 1 mL para cada animal utilizado no experimento. A suspensão de células foi incubada em tampão de lise de hemácias por 2 minutos, mantendo o tubo de centrífuga no gelo por todo o tempo e ao fim da incubação à suspensão foram adicionados 10 mL de solução de PBS suplementado com Soro Fetal Bovino a 2% (v/v) (*South American Origin*, Gibco™ Thermo-Fisher Scientific), seguido de mais uma centrifugação (400 g / 5 minutos / 4ºC). O sobrenadante foi descartado, o precipitado de células ressuspendido em 5 mL de PBS + SFB 2% e o número de células vivas foi quantificado em uma câmara de Neubauer ou no aparelho de contagem de células CellDrop™ (Denovix®) pelo método de exclusão de corante misturando uma alíquota diluída cem vezes da suspensão com uma alíquota do corante Azul de Trypan 0,1% (v/v), em uma proporção de 1:1.

A suspensão foi enriquecida para a população de células T CD8$^+$ totais através do uso do kit comercial de seleção negativa por coluna magnética *Dynabeads™ Untouched™ Mouse CD8 cells* (Thermo-Fisher Scientific), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Após essa etapa de enriquecimento, as células T CD8$^+$ *naïve* (aqui caracterizadas pela expressão da molécula CD62L e a ausência de expressão da molécula de superfície CD44 – CD44$^-$CD62L$^+$) foram isoladas por FACS (do inglês, *Fluorescence-Activated Cell Sorting*) (item **4.9**), utilizando os anticorpos fluorescentes anti-CD8, anti-CD44 e anti-CD62L murino (ver **Tabela 1**).

Alternativamente ao enriquecimento de células T CD8$^+$ seguido por FACS, nos experimentos realizados nos EUA, a suspensão de células extraídas de baço e linfonodos foi tratada com o kit de purificação de células T CD8$^+$ *naïve Mouse Naïve CD8$^+$ T Cell Isolation Kit* (StemCell Technologies), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

As células T CD8$^+$ *naïve* isoladas foram então preparadas para cultivo *in vitro* imediato ou lavadas através da precipitação por centrifugação (400 g / 5 minutos à 4ºC) seguida de ressuspensão com PBS 1X gelado, duas vezes, para finalmente ressuspender o precipitado em tampão de lise para futura extração de RNA, utilizando o kit comercial *Quick-RNA MiniPrep* (Zymo Research).

4.3 Cultivo *in vitro* de células T CD8$^+$ e diferenciação em fenótipo tipo efetor e fenótipo tipo memória

As células T CD8$^+$ *naïve* isoladas foram ressuspendidas em meio de cultura DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com Soro Fetal Bovino inativado 10% (v/v) (*Performance*, Gibco^{TM} Thermo-Fisher Scientific), L-Glutamina 2 mM (Gibco^{TM} Thermo-Fisher Scientific), Penicilina-Estreptomicina 100 U/mL (Gibco^{TM} Thermo-Fisher Scientific), aminoácidos essenciais de MEM 1X (Sigma-Aldrich/Merck), aminoácidos não essenciais de MEM 1X (Gibco^{TM} Thermo-Fisher Scientific), Piruvato de Sódio 1 mM (Gibco^{TM} Thermo-Fisher Scientific), solução de vitaminas para MEM 1X (Gibco^{TM} Thermo-Fisher Scientific), HEPES 10 mM (Gibco^{TM} Thermo-Fisher Scientific) e β-mercaptoetanol 50 µM (Sigma-Aldrich/Merck). As células T CD8$^+$ *naïve* foram ativadas em uma concentração de 1 milhão de células/mL em placas de cultivo de 24, 12 ou 6 poços pré-recobertas de anticorpos monoclonais de cabra anti-IgG de hamster em uma solução de 300 µg/mL (*Pierce^{TM} Protein Biology*, Thermo-Fisher Scientific). Para a ativação, as células T CD8$^+$ *naïve* foram incubadas pelos dois primeiros dias de cultivo (48h) na presença de anticorpos monoclonais de hamster anti-CD3 (clone 2C11) e anti-CD28 (clone 37.51) (BD Biosciences), que servem de agonistas para os respectivos receptores de superfície, mimetizando o primeiro e o segundo sinal de ativação. Por todo o período de cultivo, as células T CD8$^+$ foram mantidas a 37ºC em atmosfera úmida com concentração de CO_2 a 5-10%.

Para a diferenciação das células em um fenótipo tipo efetor ou tipo memória *in vitro*, as células foram cultivadas em condições de ativação e suplementação do meio de cultura diferentes (NEITZKE-MONTINELLI et al., 2022; PIPKIN et al., 2010). Para a diferenciação no fenótipo efetor, as células T $CD8^+$ *naïve* foram ativadas através do estímulo com anti-CD3 e anti-CD28 em uma concentração de 1 µg/mL e, após 48h, as células foram recultivadas diariamente até o sexto dia de cultura. O recultivo das células foi feito duplicando o volume do meio de cultura a cada dia e suplementando-o, a partir do segundo dia de cultura, com IL-2 murina recombinante a 200 U/mL (Peprotech). Alternativamente, nos experimentos realizados nos EUA, as células eram recultivadas em uma concentração de 0,5 milhões/mL em meio suplementado a partir do segundo dia de cultura com IL-2 humana recombinante a 100 U/mL (NIH). Para a diferenciação no fenótipo tipo memória, as células T $CD8^+$ *naïve* foram ativadas através do estímulo com anti-CD3 em uma concentração de 50 ng/mL e anti-CD28 a 1 µg/mL e mantidas em cultivo até o decido quarto dia de cultura. Após 48h da ativação, as células diferenciadas para o fenótipo tipo memória foram recultivadas até o sexto dia de cultura, seguido da substituição de metade do meio de cultura por um meio de cultura novo no dia 8 (sem perturbação do aglomerado de células) e substituição de todo o volume de meio de cultura por um volume igual de meio novo nos dias 10 e 12 de cultura (com a separação das células por centrifugação a 400g, 5 minutos, a 4ºC). O recultivo das células até o sexto dia foi feito duplicando o volume do meio de cultura a cada dia e suplementando-o com IL-2 murina recombinante em 20 U/mL do segundo até o décimo quarto dia de cultura, IL-7 murina recombinante em 10 ng/mL (Peprotech) nos primeiros 3 dias de cultura e IL-15 murina recombinante em 10 ng/mL (Peprotech) por todo o período de cultura. Nos experimentos realizados nos EUA, as células foram recultivadas em uma concentração de 0,5 milhões/mL em meio suplementado com IL-2 humana recombinante a 10 U/mL do segundo até o décimo quarto dia de cultura, IL-7 humana recombinante em 10 ng/mL nos primeiros 3 dias de cultura e IL-15 humana recombinante em 10 ng/mL por todo o período de cultura.

A expansão e viabilidade das células T $CD8^+$ cultivadas *in vitro* foi analisada diariamente por microscopia óptica utilizando corante vital Azul de Trypan 0,1% (v/v). Para diminuir o impacto da variância do número absoluto de células encontradas no cultivo das células entre os experimentos, a expansão das células foi analisada através do cálculo da razão do número de células quantificados em um dia (N^d)

dividido pelo número de células quantificados no dia anterior (N^{d-1}). Para a melhoria da visualização dos dados, os valores foram também transformados utilizando a fórmula $\log_2$ de maneira que valores resultantes abaixo de 1 se tornassem negativos após a transformação. Para visualizar o acúmulo da expansão através dos dias em uma curva quando os dados fossem desenhados em um gráfico, os valores de expansão foram sendo somados cumulativamente no decorrer dos dias. A fórmula resultante para a geração dos gráficos com a curva de expansão acumulada foi:

$$X^d = X^{d-1} + log_2(\frac{N^d}{N^{d-1}})$$

X^d = expansão encontrada em um dia; X^{d-1} = expansão encontrada no dia anterior; N^d = número total de células em cultivo quantificados em um dia; N^{d-1} = número total de células em cultivo quantificados no dia anterior.

4.4 Transdução de células T CD8⁺ ativadas e diferenciadas *in vitro* com partículas retrovirais

As células T CD8⁺ cultivadas *in vitro* foram transduzidas com partículas retrovirais expressando: (i) shRNA (short hairpin RNA) para o silenciamento de componentes do PRC1 (shCbx4, shScml2 ou shRing1) ou; (ii) a sequência codificante inalterada ou mutante do gene *Cbx4* (Cbx4-OE, ΔChromo ou ΔSIM1-2). As partículas retrovirais usadas para os ensaios de silenciamento foram produzidas a partir da transfecção de células empacotadoras Phoenix-Eco, linhagem baseada em 293T (linhagem embrionária de rim humano) estavelmente transfectadas com os genes codificantes para gag, pol e envelope para vírus ecotrópicos (com tropismo para células de camundongos e ratos). As células Phoenix-Eco foram transfectadas com plasmídeos pLMP-Amt (derivados de MSCV) subclonados com a sequência do shRNA no contexto do microRNA mir30. Além disso, o plasmídeo pLMP-Amt também carrega a sequência codificante para a proteína fluorescente repórter Ametrina. As construções plasmidiais baseadas no vetor pLMP-Amt foram preparadas em um trabalho prévio e gentilmente cedidas pelo nosso colaborador Dr. Matthew Pipkin (*The Scripps Research Institute*, Jupiter, FL, EUA). Para os ensaios de superexpressão, células empacotadoras ecotrópicas Platinum-E (Plat-E) foram transfectadas com plasmídeos pMIGR-GFP (que expressam GFP como repórter) clonados com a sequência codificante para o gene desejado (*Cbx4* selvagem ou as formas mutantes). Para a inativação da função dependente de cromodomínio da proteína Cbx4, foram efetuadas duas mutações pontuais (p.F11A / p.W35L) na sequência codificante do

cromodomínio. Para a inativação da função dependente dos domínios SIM, foi realizada a deleção de ambos os domínios SIM presentes na sequência codificante de Cbx4 (p.262_265del(IVIV) / p.462_495del(VILL)). Ambas as construções foram preparadas em um trabalho anterior e gentilmente cedidas pelo Dr. Yong-Xu Wang (*University of Massachusetts Medical School*, Worcester, MA, EUA) (CHEN et al., 2018b; LI et al., 2014a).

Para a produção das partículas retrovirais, foram cultivadas células Phoenix-Eco ou Plat-E a 37ºC em atmosfera úmida com 5% de CO_2 e em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino 10% (v/v) (*South American Origin*, Gibco™ Thermo-Fisher Scientific), 2 mM L-Glutamina, Penicilina-Estreptomicina 100 U/mL, Piruvato de Sódio 1 mM e HEPES 10 mM. As células empacotadoras foram transfectadas por método de cloreto de cálcio com plasmídeo controle (shRNA para o mRNA de CD4 nos experimentos de silenciamento de RNA ou plasmídeo vazio – "Mock" – nos experimentos de superexpressão) ou plasmídeo contendo a sequência codificante desejada (shRNA para componentes do PRC1 ou mRNA de Cbx4 selvagem ou em formas mutantes). Em conjunto com o plasmídeo controle ou experimental, foi também transfectado o plasmídeo pCL-ECO, contendo a sequência codificante para a produção de proteínas do capsídeo (embora estas já sejam expressas na linhagem empacotadora, como forma de aumentar a eficiência da transdução). As células transfectadas foram incubadas com meio de cultura contendo cloroquina a 100 µM (Sigma-Aldrich/Merck) pelo período de 8 horas e ao fim da incubação este foi substituído por meio de cultura novo, sem cloroquina. Após 16 horas da substituição do meio de cultura, este agora enriquecido com partículas retrovirais secretadas pelas células empacotadoras foi coletado para ser utilizado na transdução de células T $CD8^+$. O sobrenadante enriquecido em partículas retrovirais produzidas pela célula empacotadora foi recolhido e utilizado para a transdução de células T $CD8^+$ em cultura nos dias 1 e 2 de cultura. Nos experimentos encaminhados no EUA, o sobrenadante enriquecido em partículas virais foi coletado duas vezes, no dia anterior a ativação e no dia da ativação das células T $CD8^+$, e concentrado em ultracentrífuga refrigerada a 6000 g por um período *overnight* (16-18h), a 4ºC. No dia seguinte, primeiro dia após a ativação das células T $CD8^+$, o sobrenadante clarificado foi descartado e o precipitado de partículas retrovirais foi ressuspendido com sobrenadante enriquecido em partículas retrovirais das células empacotadoras. O

sobrenadante concentrado de partículas retrovirais foi então utilizado para uma única transdução, no segundo dia de cultura das células T $CD8^+$.

A transdução das células foi feita recolhendo 80% do volume de sobrenadante das células T $CD8^+$ (e guardando-o para reposição futura) e adicionando por cima das células o volume máximo de sobrenadante concentrado ou enriquecido de partículas retrovirais acrescido de polibreno (Sigma-Aldrich/Merck) em uma concentração de 8 µg/mL. Em seguida, a placa de cultura contendo as células T $CD8^+$ foi centrifugada a 2000 rpm (~800 g) por 1 hora a 37ºC em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 pelo período de 3-4 horas. Ao fim dessa incubação o sobrenadante contendo partículas retrovirais foi removido e substituído por meio de cultura condicionado recolhido antes da transdução. Para os experimentos de transferência adotiva de células T $CD8^+$ em modelo de infecção viral por LCMV as células ativadas e transduzidas foram imediatamente colhidas e transferidas para os camundongos via injeção intravenosa. Para os experimentos de diferenciação *in vitro*, as células foram mantidas e expandidas como de acordo no item anterior.

4.5 Propagação *in vitro* de vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV)

Células da linhagem BHK21, gentilmente cedidas pelo Prof. Amilcar Tanuri (UFRJ) foram cultivadas a 37ºC e atmosfera úmida com 5% de CO_2 em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino 10% (v/v), 2 mM L-Glutamina, Penicilina-Estreptomicina 100 U/mL, Piruvato de Sódio 1 mM e HEPES 10 mM. As culturas de BHK21 foram expandidas até atingirem 50-75% de confluência da monocamada de células e então infectadas com LCMV de cepa Armstrong (Arm) ou clone 13 (cl13) em um MOI (multiplicidade de infecção) de 0.03 UFP/célula (WELSH; SEEDHOM, 2008). Após 48h de infecção, o sobrenadante da cultura foi coletado, aliquotado e armazenado em -80ºC para posterior titulação por ensaio de plaque (item **4.7**) e utilização nos experimentos de infecção. Os estoques iniciais de LCMV-Arm e LCMV-cl13 foram gentilmente cedidos pelo Profº Dr. Shane Crotty (*La Jolla Institute for Immunology*, Califórnia, EUA).

4.6 Modelo de infecção viral aguda e crônica por LCMV e transferência adotiva de células T $CD8^+$ transduzidas *in vitro*

Para a execução do modelo de infecção viral aguda, grupos de pelo menos cinco camundongos C57BL/6 selvagens ou C57BL/6 $Cbx4^{fl/fl}Cd4^{Cre}$ machos foram

infectados por via intraperitoneal (i.p.) com 2 x 10^5 UFP de LCMV-Arm ou 1,5 x 10^5 UFP de LCMV-cl13, diluídos em DMEM (HERRATH; WHITTON, 2000). Para o modelo de infecção viral crônica, foi inoculado por via intravenosa (i.v.) 4 x 10^6 UFP de LCMV cl13 (AHMED et al., 1984). Os camundongos infectados foram analisados em diferentes pontos da infecção, em fase aguda (8º dia pós-infecção) ou tardia (60º dia pós-infecção) da resposta imune adaptativa. Para a análise, os camundongos infectados foram eutanasiados em câmara de inalação de CO_2 e tiveram seu baço excisado e imediatamente processado para análises de citometria de fluxo como descrito no tópico **4.2**. Além disso, o sangue total foi coletado por punção cardíaca logo após a eutanásia para a titulação da carga viral dos animais.

Para experimentos de transferência adotiva de células T $CD8^+$ transduzidas *in vitro* para os camundongos infectados, foram utilizadas linhagens de camundongo P14 congênicas expressando as proteínas de superfície Thy1.1 ou Thy1.2. Camundongos C57BL/6 Thy1.2 recipientes receberam por via intravenosa (i.v.) na veia caudal 5 x 10^5 células T $CD8^+$ ativadas e transduzidas *in vitro* (ver tópicos **4.3** e **4.4**) de um camundongo doador de linhagem P14 Thy1.1. No mesmo dia, os camundongos recipientes foram infectados com LCMV, em um modelo de infecção viral aguda, através do inóculo por via i.p. de 1,5 x 10^5 UFP de LCMV cl13.

Todos os experimentos de infecção de camundongos por LCMV foram realizados em biotérios de nível de biossegurança 2 e os animais infectados foram armazenados em salas separadas dos animais mantidos em cruzamento e estoque. Além disso, todo material utilizado no processo foi desinfetado utilizando solução de hipoclorito de sódio concentrada 5-10% (v/v).

4.7 Titulação de carga viral de LCMV por ensaio de plaque

Para a titulação por ensaio de plaque, foram utilizadas células da linhagem Vero (WELSH; SEEDHOM, 2008). As células Vero foram cultivadas a 37ºC em atmosfera úmida com 5% de CO_2 em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino 10% (v/v), 2 mM L-Glutamina, Penicilina-Estreptomicina 100U/mL, Piruvato de Sódio 1 mM e HEPES 10 mM. Células Vero foram expandidas e recultivadas em placas de 12 poços, na quantidade de 0,2 x 10^6 de células por poço. Após 48h de recultivo, 80% do volume de sobrenadante de cada poço foi removido e substituído por 200 µL de uma alíquota concentrada ou diluída de sobrenadante isolado de linhagem BHK21 (com

alta concentração de partículas virais de LCMV) ou soro extraído de sangue coletado de camundongos infectados. Para a diluição da amostra a ser titulada, a amostra original foi diluída em α-MEM (Gibco^{TM} Thermo-Fisher Scientific). Após a infecção da monocamada de células Vero, as células foram incubadas em temperatura ambiente pelo período de 1 hora, balançando gentilmente as placas a cada 15 minutos. Ao fim da incubação, o sobrenadante viral foi descartado em solução de hipoclorito de sódio concentrada 10% (v/v) e em seguida adicionado 1 mL de solução de agarose "*low melting temperature*" 0,5% (v/v) diluído em α-MEM suplementado com soro fetal bovino 1% (v/v). As placas de cultura foram incubadas em temperatura ambiente até que a solução com agarose gelificasse e depois devolvidas para a incubadora de CO_2, onde foram mantidas por quatro dias até a coloração das placas. Passados os quatro dias, as placas foram fixadas com paraformaldeído 10% (v/v) (Sigma-Aldrich/Merck) durante 2 horas e depois a camada de gel de agarose foi removida submergindo as placas em uma cuba de água destilada. A monocamada de células foi corada adicionando 0,5 mL de solução de cristal violeta 0,25% (m/v) em metanol 20% (v/v), incubando as placas por 10 minutos seguido do descarte do corante e extensa lavagem das placas com água corrente. Após a secagem das placas de cultura, as placas na monocamada de células foram contadas para a estimativa do título viral usando a seguinte fórmula:

$$\frac{número\ de\ placas}{(fator\ de\ diluição)\ x\ (volume\ de\ amostra/poço)} = UFP/\ mL$$

4.8 Reestimulo de células T CD8$^+$ para análise da funcionalidade por citometria de fluxo

Para analisar a sua capacidade de produção de citocinas pró-inflamatórias, células T CD8$^+$ cultivadas, transduzidas e diferenciadas *in vitro* foram reestimuladas no último dia de cultura (dia 6 para células de fenótipo efetor ou dia 14 para células de fenótipo de memória). Foi também avaliada a produção da proteína citotóxica Granzima B. Para isso, 0–2 - 1,0 x 10^6 de células T CD8$^+$ ressuspendidas em meio de cultura suplementado para cultivo foram separadas em poços de placa de 96 poços ou tubos de FACS de 5 mL e incubadas por 6 horas na presença de Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, do inglês *Phorbol 12-myristate 13-acetate*) (Sigma-Aldrich/Merck) em uma concentração de 10 nM e Ionomicina (Sigma) em uma concentração de 1 µM. Nas últimas 4 horas, foi adicionada à suspensão o inibidor de transporte vesicular

Brefeldina A (BioLegend) na concentração final de 5 µg/mL. Ao fim da incubação, as células foram lavadas em PBS + SFB 2% (v/v) e preparadas para marcação com anticorpos fluorescentes para análise de citometria de fluxo.

Alternativamente, células isoladas a partir do processamento de órgãos linfoides secundários (baço e linfonodos) foram reestimuladas *ex vivo* com o peptídeo recombinante gp33-41, análogo ao epítopo da glicoproteína gp33 do LCMV, modelo de infecção usado no estudo. Foram separadas 3 x 10^6 de células ressuspendidas em meio suplementado para cultivo de células T $CD8^+$ em poços de placas de 96 poços, que em seguida foram incubadas por 4 horas na presença do peptídeo gp33-41 na concentração de 0,2 µg/mL e Brefeldina A. Após as 4 horas, as células também foram lavadas em PBS + SFB 2% (v/v) e preparadas para marcação com anticorpos fluorescentes para análise de citometria de fluxo.

4.9 Citometria de fluxo e FACS

Células T $CD8^+$ cultivadas *in vitro* ou células obtidas do processamento de órgãos linfoides secundários (baço e linfonodos) foram utilizadas para ensaios de citometria de fluxo e isolamento de subpopulações por FACS. Para os ensaios de citometria de fluxo, as células foram ressuspensas ou lavadas (centrifugadas a 400 g por 5 minutos a 4ºC, seguido de ressuspensão) em solução de PBS + SFB 2% (v/v) ou tampão de FACS constituído de PBS suplementado com soro fetal bovino 1% (v/v), albumina bovina séria 1% (v/v) (Sigma-Aldrich/Merck) e azida monossódica 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich/Merck).

Para marcação com molécula de tetrâmero conjugado com molécula fluorescente, alíquotas de 3 x 10^6 de células derivadas de órgãos linfoides secundários foram distribuídas em poços de placa de 96 poços ou microtubos e lavadas duas vezes em PBS + SFB 2% (v/v) ou tampão de FACS. Ao fim da segunda lavagem, as células foram ressuspensas em solução contendo a molécula de tetrâmero H2Db-gp33-41 (KAVYNFATC) conjugada ao fluorocromo Alexa Fluor 647 ou APC (NIH Tetramer Core Facility) e incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente antes de seguir diretamente para a marcação com anticorpos específicos para proteínas de superfície, sem qualquer etapa de lavagem.

Para a marcação das células com anticorpos monoclonais fluorescentes específicos para proteínas de superfície, alíquotas de 0,2-1 x 10^6 de células de cultura

in vitro ou 3 x 10^6 de células derivadas de órgãos linfoides secundários que não foram marcadas com tetrâmero foram distribuídas em poços de placa de 96 poços ou microtubos e lavadas duas vezes em PBS + SFB 2% (v/v) ou tampão de FACS. Ao fim da segunda lavagem ou ao fim da incubação com molécula de tetrâmero, foram adicionadas as células uma solução contendo um ou uma mistura de anticorpos monoclonais fluorescentes diluídos em PBS + SFB 2% (v/v) ou tampão de FACS e incubadas nessa solução por 30 minutos a 4ºC. Após a incubação, as células foram lavadas mais duas vezes e ressuspensas em PBS + SFB 2% (v/v) ou tampão de FACS para a sua aquisição imediata no citômetro. Alternativamente, após incubação com anticorpos e duas lavagens consecutivas, as células foram incubadas em solução de paraformaldeído (Sigma-Aldrich/Merck ou Molecular Probes) 1% (v/v) por 30 minutos, lavadas mais duas vezes, ressuspendidas em PBS + SFB 2% (v/v) ou tampão de FACS e armazenadas em 4ºC para posterior aquisição dentro do período máximo de três dias.

Para a marcação de citocinas com anticorpos monoclonais fluorescentes, foram reestimuladas alíquotas de 0,2-1,0 x 10^6 de células T $CD8^+$ cultivadas *in vitro* ou 3 x 10^6 de células derivadas de órgãos linfoides secundários (como descrito no item **4.8**). Após o reestimulo, as células foram marcadas com anticorpos específicos para proteínas de superfície (como descrito acima) ou diretamente lavadas em PBS + SFB 2% (v/v) e incubadas em solução comercial de fixação BD Cytofix (BD Biosciences) ou *FoxP3/Transcription Factor Fixation/Permealization Buffer* (eBiosciences) por 30 minutos em 4ºC, protegidas da luz. Ao fim da incubação, as células foram lavadas duas vezes em solução comercial de permeabilização BD Cytoperm (BD Biosciences) ou *FoxP3/Transcription Factor Permeabilization Buffer* (eBiosciences). Em seguida, as células foram incubadas por 40 minutos com anticorpos fluorescentes para marcação de proteínas intracelulares ou intranucleares diluídos em solução de permeabilização. Ao fim dos 40 minutos, as células foram lavadas duas vezes com solução de permeabilização e finalmente ressuspendidas em PBS + SFB 2% (v/v) para aquisição imediata no citômetro ou posterior aquisição dentro do período de três dias (armazenamento a 4ºC).

Para o isolamento de células por FACS, células provenientes de órgãos linfoides secundários foram marcadas com anticorpos fluorescentes específicos para proteínas de superfície na proporção de 20 µL de solução de anticorpos diluídos em

PBS + SFB 2% (v/v) para cada 1 milhão de células. Ao fim da incubação, as células foram lavadas e ressuspendidas em PBS + SFB 2% (v/v). Alternativamente, células ativadas e transduzidas *in vitro* foram purificadas por FACS baseadas na sua expressão de proteína fluorescente repórter do vetor retroviral (GFP ou Ametrina), sendo previamente removidas do meio de cultura e lavadas em PBS + SFB 2% (v/v). Em ambos os casos, antes da aquisição no citômetro, a suspensão de célula foi filtrada utilizando uma malha de nylon de 100 µm ou tubo de FACS contendo tampa com *cell strainer* de 70 µm. As células foram sortadas em aparelho MoFlo XDP (Beckman Coulter) ou FACS Aria IIu (BD Biosciences) e coletadas em tubo de centrífuga de 15 mL contendo 5 mL de PBS + SFB 2% (isolamento de células $CD8^+$ T *naïve*) ou DMEM suplementado para cultivo de células T $CD8^+$ (isolamento de células transduzidas).

As células marcadas com anticorpos fluorescentes para análise de citometria de fluxo foram adquiridas em aparelhos FACSAria IIu, LSRII ou LSR Fortessa (BD Biosciences) e os dados resultantes da aquisição foram analisados no software FlowJo v.10.0.7 ou v.10.7.1. Todos os anticorpos fluorescentes utilizados para citometria de fluxo no presente estudo estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Listagem de anticorpos fluorescentes utilizados em experimentos de análise por citometria de fluxo e FACS

Anticorpo	*Cor*	*Reatividade*	*Clone*	*Marca*	*# Cat.*	*Diluição*
Anti-CD8α	PE	Murino	53-6.7	Biolegend	100708	1:800
Anti-CD44	FITC	Murino	IM7	Biolegend	103006	1:200
Anti-CD62L	APC	Murino	MEL-14	Biolegend	104412	1:200
Anti-CD25	PE	Murino	PC61	Biolenged	102007	1:200
Anti-CD127	PE-Cy7	Murino	A7R34	TONBO	60-1271-U100	1:200
Anti-IL-2	PE	Murino	JES6-5H4	BD	561061	1:50
Anti-IFN-γ	APC	Murino	XMG.12	BD	562018	1:50
Anti-TNF	PerCP-Cy5.5	Murino	MP6-XT22	Biolegend	506321	1:50
Anti-Granzima B	FITC	Murino/ Humano	GB11	Biolegend	515403	1:50
Anti-CD8α	FITC	Murino	53-6.7	Biolegend	100706	1:500
Anti-CD4	APC-Cy7	Murino	GK1.5	Biolegend	100414	1:500
Anti-CD44	BV605	Murino	IM7	Biolegend	103047	1:200
Anti-CD127	PE	Murino	A7R34	Biolegend	135010	1:200
Anti-KLRG1	BV510	Murino	2F1/KLRG1	Biolegend	138421	1:200
Anti-CXCR3	PE-Cy7	Murino	CXCR3-173	Biolegend	126515	1:400
Anti-CD127	APC	Murino	A7R34	Biolegend	135011	1:100
Anti-IFN-γ	PE	Murino	XMG1.2	Biolegend	505807	1:100
Anti-TNF	BV421	Murino	MP6-XT22	Biolegend	506327	1:100
Anti-Granzima B	FITC	Murino	QA16A02	Biolegend	372206	1:100
Anti-T-bet	BV421	Murino	4B10	Biolegend	644815	1:50
Anti-Eomes	PE-Cy7	Murino	Dan11mag	eBioscence	25-4875-82	1:50
Anti-Tcf-1	PE	Murino	S33-966	BD	564217	1:500

Anti-CD25	APC	Murino	PC61	Biolegend	102012	1:200
Anti-CD62L	PerCP-Cy5.5	Murino	MEL14	Biolegend	104432	1:100
Anti-CD8β	PerCP-Cy5.5	Murino	YTS156.7.7	Biolegend	126609	1:500
Anti-Thy1.1	PerCP-Cy5.5	Murino	OX-7	Biolegend	202516	1:100
Anti-PD-1	BV421	Murino	29F.1A12	Biolegend	135220	1:100
Anti-Lag-3	PE	Murino	C9B7W	Biolegend	125208	1:100
Anti-Tim3	PE-Cy7	Murino	RMT3-23	Biolegend	119716	1:100
Anti-CD69	BV605	Murino	H1.2F3	Biolegend	104529	1:100
Anti-Ly108 (Slamf6)	PE	Murino	330-AJ	Biolegend	134605	1:100
Anti-CD8α	BV510	Murino	53-6.7	Biolegend	100752	1:500

4.10 Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

Para avaliar a função citotóxica de células T CD8$^+$ *in vitro*, células T CD8$^+$ de fenótipo *naïve* de camundongos da linhagem P14 foram ativadas e transduzidas *in vitro* com vetores retrovirais expressando shRNA com alvo para o mRNA dos genes *Cd4* (shCD4) ou *Cbx4* (shCbx4), como descrito anteriormente. As células ativadas foram cultivadas pelo período de seis dias em DMEM suplementado para cultivo de células T CD8$^+$ e do 2º. dia até o 6º. dia a cultura foi suplementada com IL-2 humana recombinante a 10 U/mL. No sexto dia de cultivo, as células transduzidas com shCD4 ou shCbx4 foram purificadas por FACS, utilizando como critério a expressão da proteína fluorescente repórter do vetor retroviral, Ametrina. Após a purificação, as células T CD8$^+$ P14 Ametrina$^+$ foram co-cultivadas com células da linhagem tumoral de carcinoma mamário EO771 para avaliar a função citotóxica não específica, ou células EO771 expressando o antígeno cognato ao TCR de células T CD8$^+$ P14, a peptídeo gp33-41, para avaliar a citotoxicidade direcionada pelo TCR. Ambas as linhagens EO771 e EO771-gp33-41 expressavam a proteína fluorescente repórter GFP. O co-cultivo das células T CD8$^+$ P14 e células tumorais EO771 foi realizado em diferentes proporções de célula T CD8$^+$ para célula tumoral (1:32, 1:16, 1:8, 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1) durante o período de 12 horas. A função citotóxica das células T CD8$^+$ P14 co-cultivadas com as células tumorais foi aferida através da detecção de células tumorais vivas expressando GFP por análise de citometria de fluxo. Para a detecção da taxa de morte basal das células tumorais, foi incluída nos experimentos a condição controle onde as células tumorais EO771 foram cultivadas na ausência de células T CD8$^+$.

4.11 Análise do perfil transcricional de células T CD8$^+$ através de sequenciamento de RNA (RNA-Seq)

Células T CD8$^+$ P14 Thy1.1 deficientes em Cbx4 ou Scml2, ou selvagens (transduzidas com shCD4) geradas em modelo de infecção viral aguda por LCMV foram purificadas por FACS do baço de animais infectados no 8º dia pós-infecção (ver **4.6**) com base na expressão da proteína fluorescente repórter Ametrina, codificada pelo vetor retroviral usado na transdução *in vitro* das células), e baseada no marcador congênico Thy1.1, que caracterizava as células transferidas adotivamente. Além disso, também foram isoladas subpopulações de células T CD8$^+$ P14 Thy1.1 deficientes em Cbx4 (Ametrina$^+$) baseadas na expressão do marcador KLRG1, separando em subpopulações de alta expressão (KLRG1^{Hi}) ou baixa expressão de KLRG1 (KLRG1^{Lo}). As células purificadas foram lavadas duas vezes em solução tampão PBS 1X gelado. Em seguida, as células foram resuspendidas em tampão de lise e reação de síntese de cDNA do kit comercial *SMARTer Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing-v3*, seguindo as instruções do fabricante. As bibliotecas de transcritos para RNA-Seq foram sequenciadas utilizando o protocolo "*rapid run*" do aparelho de sequenciamento de nova geração HiSeq 2500 (Illumina), gerando leituras "*paired-end*" armazenadas em arquivos de extensão FASTQ.

As leituras "*paired-end*" geradas no RNA-Seq de cada amostra foram filtradas para a remoção de adaptadores de sequenciamento e leituras correspondentes a sequências de tRNA e rRNA. Além disso, as leituras geradas no sequenciamento foram analisadas quanto a sua qualidade utilizando o programa Fastqc (v.0.11.6) e foi realizada a remoção de sequências de baixa qualidade (que não obedeciam a um tamanho e pontuação Phred mínimo), utilizando o programa PRINSEQ Lite (v.0.20.3). As leituras filtradas foram alinhadas e mapeadas ao genoma murino de referência UCSC mm9 usando o programa TopHat (v.1.4.1.). A pontuação DUST das leituras mapeadas foi calculada usando o programa PRINSEQ Lite e leituras de baixa complexidade (DUST > 4) foram filtradas dos arquivos de extensão BAM gerados no mapeamento. A contagem das leituras mapeadas nos elementos genômicos de referência foi obtida através do programa htseq-count (v.0.6.0), utilizando a configuração pré-definida "*union*". Após a remoção dos elementos ausentes no conjunto de leituras (elementos com contagem nula em todas as amostras sequenciadas), a contagem bruta das leituras foi importada no pacote de análise

estatística DESeq2 (v.1.24.0), carregado em ambiente de desenvolvimento integrado para linguagem r RStudio (v.1.0.136). Utilizando o pacote DESeq2, foram identificados os genes diferencialmente expressos entre as amostras de células T $CD8^+$ P14 selvagens (transduzidas com shCD4) e células T $CD8^+$ P14 deficientes em Cbx4 ou Scml2 (transduzidas com shCbx4 ou shScml2, respectivamente) diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV. O parâmetro de linha de corte utilizado para a identificação de genes diferencialmente expressos foi a obtenção de um valor de p menor que 0.05 na comparação entre os dois grupos amostrais.

Os genes diferencialmente expressos foram visualizados em diferentes tipos de gráficos gerados utilizando os pacotes ggplot2 ("*volcano plot*") e ComplexHeatmaps ("*heat map*"), também carregados no RStudio. Os "*heat maps*" foram gerados utilizando os valores de taxa de aumento em log2 ("*Log2 fold change*") ou a pontuação de Z-score calculada utilizando as contagens de leituras brutas normalizadas pelo DESeq2. Os "*heat maps*" foram "*clusterizados*" utilizando algoritmo de clusterização hierárquica ("ward.D2", método de Ward) ou *k-clusterizados* utilizando pacote kmeans (carregado no Rstudio). A lista de genes diferencialmente expressos calculados pelo DESeq2 foi utilizada como lista de genes pre-ranqueada em análises de enriquecimento de conjunto gênico (GSEA, do inglês "*Gene Set Enrichment Analysis*"), utilizando conjuntos gênicos depositados no banco de dado de assinaturas imunológicas do MsigDb (Broad Institute), no banco de dados Gene Ontology ou no banco de dados Reactome. Foi também utilizado como conjunto gênico a assinatura transcricional de células T $CD8^+$ efetoras precursoras de memória (definidas pelo fenótipo $KLRG1^-CD127^+$) geradas em resposta viral aguda por LCMV Armstrong 5, número de acesso de GEO GSE111143 (WANG et al., 2018). A lista de genes diferencialmente expressos entre células T $CD8^+$ P14 selvagens e células T $CD8^+$ P14 deficientes em Cbx4 também foi utilizada para análises de enriquecimento de vias utilizando o pacote ClusterProfiler (v.4.2.2), utilizando o banco de dados de vias de processos biológicos do Gene Ontology e vias depositadas no banco de dados Reactome.

4.12 Análise da expressão gênica por reação de transcrição reversa seguida de PCR quantitativo (RT-qPCR)

O RNA total de células T $CD8^+$ cultivadas *in vitro* foi isolado através da utilização do reagente comercial TRIzol (Invitrogen) nos experimentos encaminhados nos

Estados Unidos ou através do kit comercial *QuickRNA MiniPrep* (Zymo) nos experimentos encaminhados no Brasil, seguindo as instruções do fabricante em ambos os métodos. Após o isolamento do RNA total, nos experimentos encaminhados nos Estados Unidos, este foi quantificado em aparelho NanoDrop 2000 (Thermo-Fisher Scientific) e a biblioteca de cDNA das amostras foi preparada através de reação de transcriptase reversa utilizando o kit comercial *Superscript III Reverse Transcriptase System* (Invitrogen), seguindo as informações do fabricante. Nos experimentos encaminhados no Brasil, o RNA total isolado foi quantificado em aparelho NanoDrop ONE (Thermo-Fisher), tratado com DNAse livre de RNAse RQ1 (Promega) e a síntese da biblioteca de cDNA das amostras foi preparada utilizando o kit comercial *ImProm-II Reverse Transcriptase System* (Promega), seguindo as informações do fabricante. A expressão gênica de diferentes alvos foi quantificada através de PCR quantitativo, utilizando método de intercalante de DNA fluorescente *SYBR Green*. Nos experimentos encaminhados nos Estados Unidos, foi utilizado o kit comercial *Power SYBR Green Master Mix* (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific) e as reações de PCR foram realizadas em um aparelho *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific). Nos experimentos encaminhados no Brasil, foi utilizado o kit *GoTaq qPCR Master Mix* (Promega) e as reações de PCR foram realizadas em um aparelho *StepOne Real Time PCR System* (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific) ou *Viia7 Real Time PCR System* (Applied Biosystems) ou *QuantiStudio 3 Real Time PCR System* (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific). A expressão gênica foi normalizada utilizando a quantificação da expressão do gene Rpl22 (que codifica a proteína ribossomal L22). As informações referentes aos *primers* utilizados para os ensaios de qPCR estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Listagem de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados em experimentos de análise de expressão gênica por RT-qPCR

Alvo	*Orientação*	*Sequência*
Rpl22	*Forward*	5’-ACCCTGGACTGCACTCACCCTG-3’
	Reverse	5’-CCGCCGAGGTTGCCAGCTTT-3’
mCbx4	*Forward*	5’-AGTGGAGTATCTGGTGAAATGGA-3’
	Reverse	5’-TCCTGCCTTTCCCTGTTCTG-3’
Sell	*Forward*	5’-CATTCCTGTAGCCGTCATGG-3’
	Reverse	5’-AGGAGGAGCTGTTGGTCATG-3’
Il7r	*Forward*	5’-GCGGACGATCACTCCTTCTG-3’
	Reverse	5’-AGCCCCACATATTTGAAATTCCA-3’
Il2ra	*Forward*	5’- CCACATTCAAAGCCCTCTCCTA-3’

	Reverse	5’-GTTTTCCCACACTTCATCTTGC-3’
Tcf7	*Forward*	5’-CAAGGCAGAGAAGGAGGCTAAG-3’
	Reverse	5’-GGCAGCGCTCTCCTTGAG-3’
Tbx21	*Forward*	5’-AGGGGGCTTCCAACAATG-3’
	Reverse	5’-AGACGTGTGTGTTAGAAGCACTG-3’
Eomes	*Forward*	5’-ACCGGCACCAAACTGAGA-3’
	Reverse	5’-AAGCTCAAGAAAGGAAACATGC-3’
Myb	*Forward*	5’-AGACCCCGACACAGCATCTA-3’
	Reverse	5’-CAGCAGCCCATCGTAAT-3’

4.13 Ensaio de imunoprecipitação de cromatina seguido de PCR quantitativo (ChIP-qPCR)

Células T $CD8^+$ cultivadas *in vitro* e polarizadas para o fenótipo tipo efetor ou tipo memória foram isoladas no seu último dia de cultivo (6º e 14º dia, respectivamente) para utilização em ensaio de imunoprecipitação de cromatina seguido de PCR quantitativo (ChIP-qPCR). As células isoladas foram transferidas para tubos de centrífuga Falcon de 15 mL (até 15 x 10^6 de células) ou 50 mL (mais de 15 x 10^6 de células), lavadas duas vezes em PBS 1X gelado através de centrifugação a 300 g, por 10 minutos, a 4ºC. Após a segunda lavagem, as células foram ressuspendidas a 1 x 10^6 de células/mL, em tampão de fixação contendo formaldeído 1% (m/v), livre de metanol (*Pierce™ Protein Biology*, Thermo-Fisher Scientific), HEPES-KOH 50 mM, pH 7,5 (Vetec), NaCl 100 mM (Sigma-Aldrich/Merck), EDTA 1 mM, pH 8,0 (Sigma-Aldrich/Merck) e EGTA 0,5 mM, pH 8,0 (Sigma-Aldrich/Merck). Após a ressuspensão no tampão de fixação, as células foram incubadas por 5 minutos em agitador em velocidade leve, para a constante homogeneização da suspensão. Ao fim dos 5 minutos, foi adicionada à suspensão uma alíquota de Glicina 2,5 M (Sigma-Aldrich/Merck) de modo a tornar a concentração final 0,125 M (uma diluição de 20 vezes) e a suspensão foi incubada novamente por 5 minutos em agitação constante. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas, dessa vez em uma velocidade de 800 g, por 10 minutos, a 4ºC, e o precipitado de células foi cuidadosamente lavado em PBS 1X gelado duas vezes. Após a remoção do sobrenadante ao fim da centrifugação, o precipitado foi solto batendo levemente no fundo do tubo e o PBS era adicionado ao tubo sem que houvesse homogeneização com auxílio de pipeta ou micropipeta, a fim de minimizar perdas. Ao final das duas lavagens o sobrenadante era totalmente removido e aspirado com o auxílio de uma

micropipeta e o precipitado de células congelado instantaneamente no tubo mergulhando-o em nitrogênio líquido. Após o congelamento instantâneo, a amostras foram armazenadas em freezer de -80ºC até o momento do seu processamento.

Para o ensaio de ChIP foi utilizado o kit comercial *SimpleChIP ® Enzymatic Chromatin IP* (CST #9003), seguindo o protocolo e as recomendações do fabricante. Foram utilizadas 4 x 10^6 de células para cada condição de imunoprecipitação (IP). Foi utilizado o protocolo de digestão com nuclease de micrococos como recomendado pelo fabricante (0,5 µL da enzima comercial por 20 minutos a 37ºC, com agitação manual a cada 3-5 minutos). Para a fragmentação do envelope nuclear foi utilizado um sonicador Branson 450 em um programa de 20 ciclos de 1 segundo de sonicação seguido de 1 segundo de intervalo, em amplitude de 10%. A fragmentação foi avaliada em microscópio óptico após a sonicação (verificando total ou quase total ausência de envelopes nucleares intactos). Para as IP, foram utilizados 3 ou 8 µg de cromatina por IP. Foram utilizados os anticorpos anti-H2AK119ub (CST #8240), anti-H3 (CST #4620) e anticorpos de IgG de coelho (CST #2729P). Para a purificação do DNA genômico imunoprecipitado foi utilizado o kit comercial *Zymo ChIP DNA Clean & Concentrator* (Zymo Research)

Para a quantificação do DNA gênomico imunoprecipitado foi aplicado o método de intercalante de DNA fluorescente *SYBR Green*, usando o kit comercial *GoTaq qPCR Master Mix*. As reações de amplificação foram realizadas em um aparelho *StepOne Real Time PCR System* ou *Viia7 Real Time PCR System*. Para a quantificação do material genético imunoprecipitado, foram amplificadas em paralelo amostras não imunoprecipitadas com diferentes números de células para o estabelecimento de uma curva padrão e o cálculo de uma função de reta (do valor de Ct em função do número de células). A função gerada foi utilizada para a estimativa de quantidade de DNA imunoprecipitado em cada condição e os valores finais foram normalizados em relação ao valor encontrado para o material imunoprecitado associado a H3.

4.14 Análise das fases do ciclo celular de células T CD8$^+$ cultivadas *in vitro*

Para a análise do ciclo celular, células T CD8$^+$ ativadas e transduzidas *in vitro* e diferenciadas para o fenótipo tipo memória, como descrito acima (item **4.3**). Para o enriquecimento da cultura para células transduzidas, as células T CD8$^+$ Ametrina$^+$

foram purificadas por FACS no 4º dia de cultura e, logo em seguida, recultivadas na concentração de 1 x 10^6 células/mL, ressuspendendo as células em um volume onde metade do volume era constituído do meio de cultura onde se encontravam anterior à purificação por FACS e metade em meio de cultura fresco, recém-preparado. As células T $CD8^+$ cultivadas foram isoladas no seu último dia de cultivo (14º dia) em alíquotas de 0,5 x 10^6 de células em microtubos de 1,5 mL e lavadas duas vezes em PBS 1X gelado, através de centrifugação a 400 g, por 5 minutos, a 4ºC. Após as duas lavagens, foi removido completamente o sobrenadante e as células foram fixadas com etanol 70% (v/v) gelado, em uma concentração de 1 x 10^6 células/mL, através da adição de etanol gota-a-gota por cima do microtubo em constante agitação. Após a fixação, a suspensão de células foi imediatamente armazenada em freezer -20ºC e as amostras foram processadas para análise de ciclo celular em até um mês após a fixação.

A análise do ciclo celular foi feita através da marcação das células com Iodeto de Propídeo (PI, do inglês *Propidium Iodide*), uma molécula fluorescente intercalante de DNA ou RNA. A marcação com PI foi realizada utilizando o reagente comercial *BD Pharmingen PI/RNAse Staining Buffer* (BD Biosciences), que possui RNAse em sua composição para eliminação de sinal de ruído por incorporação do PI em material de RNA celular. As amostras fixadas foram descongeladas no gelo e imediatamente centrifugadas a 800 g, por 10 minutos, a 4ºC. Foi cuidadosamente removido o sobrenadante e o precipitado foi lavado duas vezes com PBS 1X gelado, como descrito no parágrafo anterior. Após a segunda lavagem o precipitado foi ressuspendido no reagente *PI/RNAse Staining Buffer* na concentração de 2 x 10^6 células/mL (250 µL do reagente) e incubado em temperatura ambiente por 15 minutos. Após a incubação as amostras foram adquiridas em um citômetro de fluxo LSR Fortessa imediatamente ou dentro de no máximo 30 minutos.

A análise das subpopulações em estágios do ciclo celular foi feita através da função de análise de ciclo celular ("*Cell Cycle*") do *software* FlowJo v. 10.7.1, utilizando o modelo Watson (pragmático).

4.15 Análise da morte celular de células T $CD8^+$ cultivadas *in vitro*

A análise da morte celular de células T $CD8^+$ cultivadas *in vitro* foi feita através da marcação com Anexina V e 7-AAD utilizando o kit comercial *BD Pharmingen PE*

Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences). A molécula Anexina V possui a capacidade de se ligar a fosfatidilserina na membrana celular de células apoptóticas, que expõem essa molécula para a superfície uma vez que entram no processo de morte celular programada. A molécula 7-AAD é um intercalante de DNA e corante vital, e sua incorporação indica a permeabilidade de membrana, característica marcante de células necróticas.

Células T $CD8^+$ ativadas e transduzidas *in vitro*, e diferenciadas para o fenótipo tipo memória, foram purificadas por FACS no 4º dia de cultivo, como mencionado no item anterior (**4.14**). No seu último dia de cultivo (14º dia), estas células foram isoladas em alíquotas de 1 x 10^5 de células em microtubos de 1,5 mL e lavados duas vezes em PBS 1X gelado, através de centrifugação a 400 g, por 5 minutos, a 4ºC. As células foram processadas de acordo com as recomendações do fabricante. Após a adição de Anexina V e 7-AAD às células ressuspensas no tampão de ligação fornecido pelo fabricante, as amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente protegidas da luz e ao fim da incubação diluídas 5 vezes em seu volume final com tampão de ligação e adquiridas imediatamente (ou em até 30 minutos) no citômetro de fluxo LSR Fortessa.

4.16 Preparo de extratos proteicos, quantificação de proteínas e *Western blotting*

Células T $CD8^+$ cultivadas *in vitro* (ver **4.3** e **5.4**) foram isoladas em seu último dia de cultivo (6º dia para células polarizadas para o fenótipo tipo efetor e 14º dia para células polarizadas para o fenótipo tipo memória) para o preparo de extratos totais de proteína. As células isoladas para a preparação dos extratos protéicos foram transferidas para tubos de centrífuga de 15 mL em uma concentração de 2 x 10^6 células/ mL (portanto, sendo processadas no máximo 30 x 10^6 células por tubo) e centrifugadas a 400 g durante 10 minutos a 4ºC. A partir desse momento, todas as etapas foram realizadas mantendo as células sempre refrigeradas em gelo, minimizando ao máximo a exposição das células a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuspendido manualmente, com leves batidas, para minimizar perda de células. Após completa ressuspensão do precipitado, as células foram lavadas em tampão PBS 1X gelado, mantendo a suspensão em uma concentração de no máximo 2 x 10^6 de células, e centrifugadas nas mesmas condições citadas na etapa anterior. As células foram

lavadas mais uma vez com PBS 1X gelado e ao final da segunda lavagem foram ressuspendidas em 1 mL de PBS 1X gelado, transferindo-se essa alíquota para um novo microtubo e centrifugando-as mais uma vez nas mesmas condições. Ao final da centrifugação, as células foram ressuspendidas em um dos seguintes tampões de lise para preparação do extrato protéico: (I) tampão de lise, nomeado de Tampão I, baseado no tampão para ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA, do inglês *Radioimmunoprecipitation Assay*), constituído por Tris 50 mM, pH 8,0 (Sigma-Aldrich/Merck), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP-40 1% (v/v) (Sigma-Aldrich/Merck), SDS 0,1% (m/v) (Sigma-Aldrich/Merck) e Deoxicolato de Sódio 0,5% (m/v) (Sigma-Aldrich/Merck); ou (II) tampão baseado em um tampão para RIPA, nomeado Tampão II, constituído por Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Triton X-100 1% (v/v) (Bio-Rad), SDS 0,1% (m/v) e N-etilmaleimida 20 mM (Sigma-Aldrich/Merck). Ambos os tampões foram suplementados com coquetel de inibidor de protease (Roche), em tablete, momentos antes da sua utilização, certificando a completa homogeneização do tablete.

O precipitado de células lavadas em PBS foi ressuspendido na concentração de 1 x 10^6 milhões de células por 5 µL de tampão de lise. As células ressuspendidas em Tampão I foram imediatamente incubadas em um recipiente com gelo e o recipiente foi mantido dentro de uma geladeira, incubando-as por 30 minutos. As células ressuspendidas em Tampão II foram imediatamente congeladas instantaneamente mergulhando o microtubo contendo o extrato em uma camada de nitrogênio líquido (*flash freeze*) e armazenando-o em um ultrarefrigerador a -80ºC. Após a incubação de 30 minutos, o lisado de proteínas foi clarificado centrifugando-o em uma velocidade de 18.000 g por 20 minutos a 4ºC e o lisado clarificado (sobrenadante) foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga, que foi imediatamente congelado instantaneamente por *flash freeze* e armazenado em ultrarefrigerador a -80ºC. Antes do congelamento, em cada protocolo de preparo de extrato proteico, uma alíquota de 5 µL (equivalente a 1 x 10^6 de células) do extrato foi reservada em um tubo de microcentrifuga separado para posterior quantificação do rendimento da extração de proteínas. Essa alíquota também foi congelada instantaneamente e armazenada em ultrarefrigerador. A quantificação do rendimento de extração foi feita através do método colorimétrico de Lowry modificado, utilizando o kit comercial *Pierce™ Modified Lowry Protein Assay Kit* (*Pierce™ Protein Biology*,

Thermo-Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. A leitura dos resultados foi feita no leitor de placas GloMax (Promega).

A análise qualitativa de níveis de proteicos das proteínas SUMO-1 e β-actina foi feita através da separação de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida em tampão desnaturante contendo SDS (SDS-PAGE) seguido de *Western blotting*. Para a SDS-PAGE, foram carregadas uma massa de 30 µg de lisado para a análise de níveis de SUMO-1 ou 5 µg para análise de β-actina. Extratos proteicos lisados no Tampão II foram clarificados imediatamente antes da sua utilização para a SDS-PAGE, centrifugando-os a 18.000 g, por 20 minutos, a 4ºC e em seguida separando o sobrenadante para um novo microtubo. Alíquotas correspondentes às respectivas massas citadas foram diluídas em tampão de amostra 5X constituído de Tris-HCl 250 mM, pH 6,8, DTT 500 mM (Promega), SDS 10% (m/v), azul de bromofenol 0,5% (m/v) (Bio-Rad) e Glicerol 50% (Sigma-Aldrich/Merck), de modo a diluir o tampão para 1X. As amostras foram fervidas por 5 minutos e carregadas nas canaletas de géis de poliacrilamida. A eletroforese do extrato proteico utilizado para a análise de SUMO-1 foi realizada utilizando a combinação de gel de empilhamento com concentração de poliacrilamida (Sigma-Aldrich/Merck) 3% (v/v) e gel de separação na concentração de 9% (v/v), enquanto para a análise de β-actina foi utilizado gel de empilhamento na mesma concentração, porém um gel de separação na concentração de 15% (v/v). Os géis de empilhamento foram preparados através da polimerização de poliacrilamida em solução de Tris 125 mM, pH 6,8, SDS 0,1% (m/v), persulfato de amônio 0,1% (Sigma-Aldrich/Merck) e TEMED (Promega). Os géis de separação foram preparados através da polimerização de poliacrilamida em solução de Tris 375 mM, pH 8,8, SDS 0,1% (m/v), persulfato de amônio 0,1% e TEMED. A eletroforese foi conduzida por 2 horas e 30 minutos, a 80V, em um sistema de eletroforese vertical Mini-Protean (Bio-Rad), utilizando um tampão de corrida 1X constituído de Tris 25 mM, Glicina 250 mM e SDS 0,1% (m/v).

As proteínas separadas por eletroforese foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) utilizando um sistema de transferência semi-seco Trans-Blot (Bio-Rad). A transferência foi conduzida por 1 hora e 30 minutos em uma voltagem de 15V, utilizando um tampão de transferência constituído de Tris 25 mM, Glicina 250 mM e Metanol (Sigma-Aldrich/Merck) 20% (v/v). A transferência de proteínas foi confirmada incubando as membranas em corante vermelho Ponceau 4R

(Sigma-Aldrich/Merck). O corante e o tampão de transferência foram lavados da membrana através de uma série de três lavagens em tampão TBS 1X (do inglês, *Tris Buffer Saline*), incubando a membrana submersa no tampão durante 5 minutos sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi bloqueada para evitar a ligação inespecífica de anticorpos incubando a membrana em uma solução de TBST 0,1% (v/v), constituída de TBS 1X acrescida de detergente Tween 20 na concentração 0,1% (v/v), suplementada com leite em pó desnatado (Nestlé) na concentração de 5% (m/v). A incubação para o bloqueio da membrana foi feita por 1 hora a 4ºC. Após o bloqueio, as membranas com proteínas transferidas foram lavadas três vezes, sob as mesmas condições de lavagem utilizadas após a transferência, utilizando dessa vez o tampão TBST 0,1% (v/v). Em seguida, as membranas foram incubadas em anticorpos específicos para SUMO-1 ou β-actina por um período de 2 horas. Os anticorpos foram diluídos em TBST 0,1% (v/v) suplementados com leite em pó 5% (m/v) na proporção de 1:150 para o anticorpo murino anti-SUMO1 (Sc-5308, Santa Cruz Biotechnology) e 1:2000 para o anticorpo murino anti-β-actina (# A5441, Sigma-Aldrich/Merck). Ao final da incubação, as membranas foram lavadas três vezes com TBST 0,1% (v/v) e incubadas com anticorpos secundários fluorescentes de burro anti-IgG murina contra anticorpos murinos IRDye 800CW (LI-COR) por um período de 1 hora. Os anticorpos secundários foram diluídos em TBST 0,1% (v/v) na proporção de 1:15000. Ao final da incubação, as membranas foram lavadas três vezes em TBS 1X e foram reveladas em um aparelho Odyssey Classic (LI-COR).

4.17 Análise do perfil de proteínas SUMOiladas em células T CD8$^+$ cultivadas *in vitro* por co-imunoprecipitação seguido de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Para analisar e identificar o perfil de proteínas SUMOiladas expressas em células T CD8$^+$ cultivadas *in vitro* foi realizada uma abordagem de co-imunoprecipitação (co-IP) de proteínas SUMOiladas seguido de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC:MS, do inglês *Liquid Chromatography: Mass Spectrometry*). Extratos totais de proteína foram obtidos através da ressuspensão de células T CD8$^+$ cultivadas *in vitro* em tampão de lise celular *Mild*-RIPA, constituído de Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, NP-40 1% (v/v) e EDTA 1 mM, seguido do congelamento por *flash freeze* (ver **4.16**) e armazenamento em

freezer -80ºC. O extrato proteico foi quantificado utilizando o kit comercial *Pierce™ Modified Lowry Protein Assay Kit*, seguindo as recomendações do fabricante.

Alíquotas contendo 300 µg de proteína foram utilizados em reações de imunoprecipitação contendo partículas de agarose Protein A/G PLUS (Santa Cruz Biotechnology) e 3 µg de anticorpo primário anti-SUMO-1. Uma reação de imunoprecipitação controle foi feita utilizando todos os componentes citados, com exceção do anticorpo. As reações foram incubadas a 4°C por 16 horas sob agitação. Os complexos proteicos ligados na resina foram submetidos a três lavagens em tampão de lise celular *Mild*-RIPA e ressuspendidos em tampão de amostra (ver **4.16**). As amostras foram carregadas para resolução das proteínas em SDS-PAGE, utilizando a combinação de gel de empilhamento com concentração de poliacrilamida 3% (v/v) e gel de separação na concentração de 9% (v/v). O gel resultante foi corado com corante coomassie blue (Sigma-Aldrich/Merck) e descorado com água ultrapura.

As proteínas de interesse foram extraídas do gel e aplicadas no sistema *Waters Nano Acquity* (Waters). As amostras foram dessalinizadas usando a pré-coluna *C18 Waters Symmetry* (180 µm X 20 mm, 5 µm). Utilizou-se 7,5µl do volume para a injeção da amostra, a qual foi separada por cromatografia líquida utilizando a coluna HSS T3, (100 µm x 10 mm x 1.8 µm) (Waters) em eluição a 0,5 µl/min, com gradiente linear de acetonitrila (10–40% (v/v)) contendo ácido fórmico 0,1% (v/v). Os espectros de massa sequenciais foram obtidos utilizando o espectrômetro Synapt HDMS (Waters) com interface para o sistema de cromatografia capilar Nano Acquity. A ionização por eletrospray foi realizada utilizando 4000 V, com temperatura da fonte de 80 °C e voltagem de cone 40 V.

A aquisição dos dados e controle do instrumento foi conduzida no programa MassLynx (Versão 4.1, Waters). Foram realizadas corridas cromatográficas com amplitude de 400-2000 razão massa/carga (m/z), usando intervalos de 1 segundo aplicados durante todo o processo cromatográfico. Dados dependentes da aquisição de fragmentação MS/MS foram realizados nos precursores com cargas 2, 3 e 4, ao longo de um intervalo de 50-2000 (m/z) com um intervalo de 2 m/z. A partir de cada espectro (MS) no máximo 3 íons foram selecionados para posterior fragmentação por MS/MS. A dissociação induzida por colisão foi obtida através da utilização do gás argônio a uma pressão de 1 bar e uma energia de colisão com variação de 18 a 90 V dependendo da carga e massa do precursor. Todos os dados foram processados

usando o servidor ProteinLynx Global v.3.0.2 (Waters) onde o valor da massa/carga de cada precursor (MS) e fragmento (MS/MS) foi determinada a partir dos espectros de massas oriundos desses cromatogramas, utilizando para calibração o sistema Q-Tof LockSpray™ (Waters). Os peptídeos obtidos foram identificados utilizando a plataforma Mascot MS/MS Ions Search (Matrix Science).

4.18 Análise do perfil de acessibilidade de cromatina de células T CD8$^+$ por ATAC-Seq

Como na análise do perfil transcricional (item **4.11**), 5 x 10^4 células T CD8$^+$ P14 Thy1.1 KLRG1^{Hi} ou KLRG1^{Lo} deficientes em Cbx4 (transduzidas com shCbx4) ou selvagens (transduzidas com shCD4) geradas em modelo de infecção viral aguda por LCMV foram purificadas por FACS do baço de animais infectados no 8º dia pós-infecção com base na expressão da proteína fluorescente repórter Ametrina, no marcador congênico Thy1.1 e na expressão do marcador de superfície KLRG1. As células recuperadas do FACS foram lavadas através de centrifugação a 500 g por 5 minutos a 4ºC, seguido da retirada do sobrenadante e ressuspensão do precipitado de células em PBS 1X gelado. As células foram lavadas mais uma vez, seguindo as mesmas condições de centrifugação citadas acima, e ressuspendidas em tampão de lise gelado constituído de Tris 10 mM, pH 7,5, NaCl 10 mM, $MgCl_2$ 3 mM e NP-40 0,1% (v/v). As células foram incubadas em tampão de lise por 30 minutos, no gelo. Após a lise, os núcleos celulares foram precipitados através de centrifugação a 500 g, por 10 minutos, a 4ºC e imediatamente ressuspendidos em tampão de reação de transposase *TD Buffer* e enzima transposase do kit comercial *Nextera DNA* (Illumina). As amostras foram incubadas para reação de transposição por 30 minutos a 37ºC e em seguida foram purificadas utilizando o kit comercial Qiagen MinElute (Qiagen). O DNA transposto purificado foi amplificado por PCR com primers marcados com códigos de barra ("*barcoded*") utilizando o kit comercial *Kapa Hi-Fi Real Time Library Amplification Kit* (Kapa) por 10-12 ciclos, de acordo com as instruções do fabricante. As bibliotecas amplificadas foram purificadas utilizando o kit comercial Qiagen MinElute (Qiagen) e quantificadas com o kit comercial *Kapa Real-Time Library Quantification Kit* (Kapa). A distribuição dos tamanhos das bibliotecas amplificadas foi analisada utilizando o aparelho Bioanalyzer (Agilent). As bibliotecas foram sequenciadas em um aparelho NextSeq 2000 P1 (Illumina) gerando leituras "*paired-end*" armazenadas em arquivos de extensão FASTQ.

As leituras "*paired-end*" geradas no sequenciamento foram filtradas para a remoção de adaptadores de sequenciamento e leituras correspondentes a sequências de tRNA e rRNA utilizando o programa Trimmommatic (v.0.32) e analisadas quanto a sua qualidade utilizando o programa MultiQC (v.1.7). As leituras filtradas foram alinhadas e mapeadas ao genoma murino de referência UCSC mm39 usando o programa bowtie2 (v.2.5.1.). As leituras duplicadas marcadas pela função *MarkDuplicates* do programa picard toolkit (v.2019) e leituras mapeadas ao DNA mitocondrial foram removidas da análise. Picos de acessibilidade de cromatina foram identificados utilizando fragmentos de DNA menores que 100 pares de base (não contendo um nucleossomo) no programa MACS2 (v.2.2.7.1). Os picos de acessibilidade de cromatina mapeados em regiões marcadas previamente como regiões de alto sinal de ruído não específico (*ENCODE blacklisted regions*) (AMEMIYA; KUNDAJE; BOYLE, 2019; THE ENCODE PROJECT CONSORTIUM, 2012) e regiões do cromossomo Y foram removidas da análise. Faixas genômicas contendo as anotações de pico de acessibilidade de cromatina e contendo a sobreposição das leituras de cada replicata sequenciada foram visualizadas no programa *Integrative Genomics Viewer* (v.2.16.0).

4.19 Análise estatística

Os gráficos de barra e dispersão foram produzidos utilizando o software GraphPad Prism (versão 7.0 ou 8.0). A análise estatística dos dados foi feita utilizando teste t de Student bicaudal pareado ou não pareado, teste ANOVA de um fator (*one-way*) corrigido com teste de Tukey de múltiplas comparações, teste ANOVA de dois fatores (*two-way*) corrigido com teste de Sidak ou Dunnet de múltiplas comparações ou teste ANOVA de dois fatores (*two-way*) sem correção de múltiplas comparações (teste de Fisher de menor diferença significativa).

5 RESULTADOS

5.1 Análise do papel de membros do PRC1 na diferenciação de células T CD8

Os experimentos descritos neste tópico foram realizados pelo grupo anteriormente ao desenvolvimento desta tese. Entretanto, a análise, compilação dos dados e interpretação dos resultados constituiu uma das tarefas do presente projeto de tese de doutorado.

Para iniciar a investigação do papel do complexo modulador epigenético PRC1 na definição do destino celular de linfócitos T $CD8^+$, foram avaliados os efeitos da ausência de algumas subunidades chaves deste complexo para o processo de diferenciação destas células em resposta à infecção viral aguda por LCMV. Foi estudado o papel das seguintes subunidades do PRC1: (i) a proteína Ring1, subunidade catalítica do PRC1, responsável pela deposição da marca repressora H2AK119Ub; (ii) a proteína Cbx4, capaz de recrutar o complexo PRC1 para sítios-alvos de PRC2 através do reconhecimento e ligação à marca repressora H3K27me3 mediado pela função de seu cromodomínio; (iii) a proteína Scml2, subunidade acessória do PRC1, capaz de interagir com RNA longos não codificantes (lncRNA) que medeiam o recrutamento do PRC1 para sítios genômicos. O efeito da deficiência em proteínas do PRC1 na resposta de células T $CD8^+$ antígeno-especificas foi avaliado utilizando células T $CD8^+$ isoladas de camundongos transgênicos da linhagem P14 (que possui resposta monoclonal de células T $CD8^+$ com especificidade para o epítopo gp33-41 restrito por H-2Db, derivado da glicoproteína gp33 do LCMV). Células T $CD8^+$ naïve de camundongos P14 Thy1.1 foram ativadas e transduzidas *in vitro* com vetor retroviral (MSCV modificado), contendo a sequência de shRNAs direcionados para cada subunidade do PRC1, além do gene repórter Ametrina, codificado por RNA bicistrônico e sob controle de uma sequência IRES (do inglês *Internal Ribossome Entry Site*). Em seguida, as células foram transferidas adotivamente para animais C57BL/6 Thy1.2 que foram subsequentemente infectados por LCMV, cepa clone13 (LCMV-cl13), em modelo de indução de infecção viral aguda (Figura 9A). Classicamente a cepa LCMV-cl13 é utilizada para a indução de infecção viral crônica, através da inoculação intravenosa de 4×10^6 UFP, no entanto, quando esta cepa é inoculada por via intraperitoneal no inóculo de $1,5 \times 10^5$ UFP é induzida uma infecção viral aguda (CHEN et al., 2014). No 8º dia pós-infecção os esplenócitos dos animais infectados foram analisados por citometria de fluxo para a avaliação da expressão de moléculas relacionadas aos fenótipos efetor ou de memória, KLRG1 e CD127 (Il-7rα), em células T $CD8^+$ transduzidas ($Ametrina^{Hi}$) e transferidas adotivamente ($Thy1.1^+$) (Figura 9B).

A estratégia e o protocolo de silenciamento foram previamente validados em um estudo de *screening* de possíveis reguladores candidatos do processo de diferenciação de células T $CD8^+$ (CHEN et al., 2014). Resultados deste *screening*

também serviram como subsídio para a escolha dos alvos do presente trabalho e o silenciamento dos alvos foi validado por ensaios de RT-qPCR (dados não mostrados)

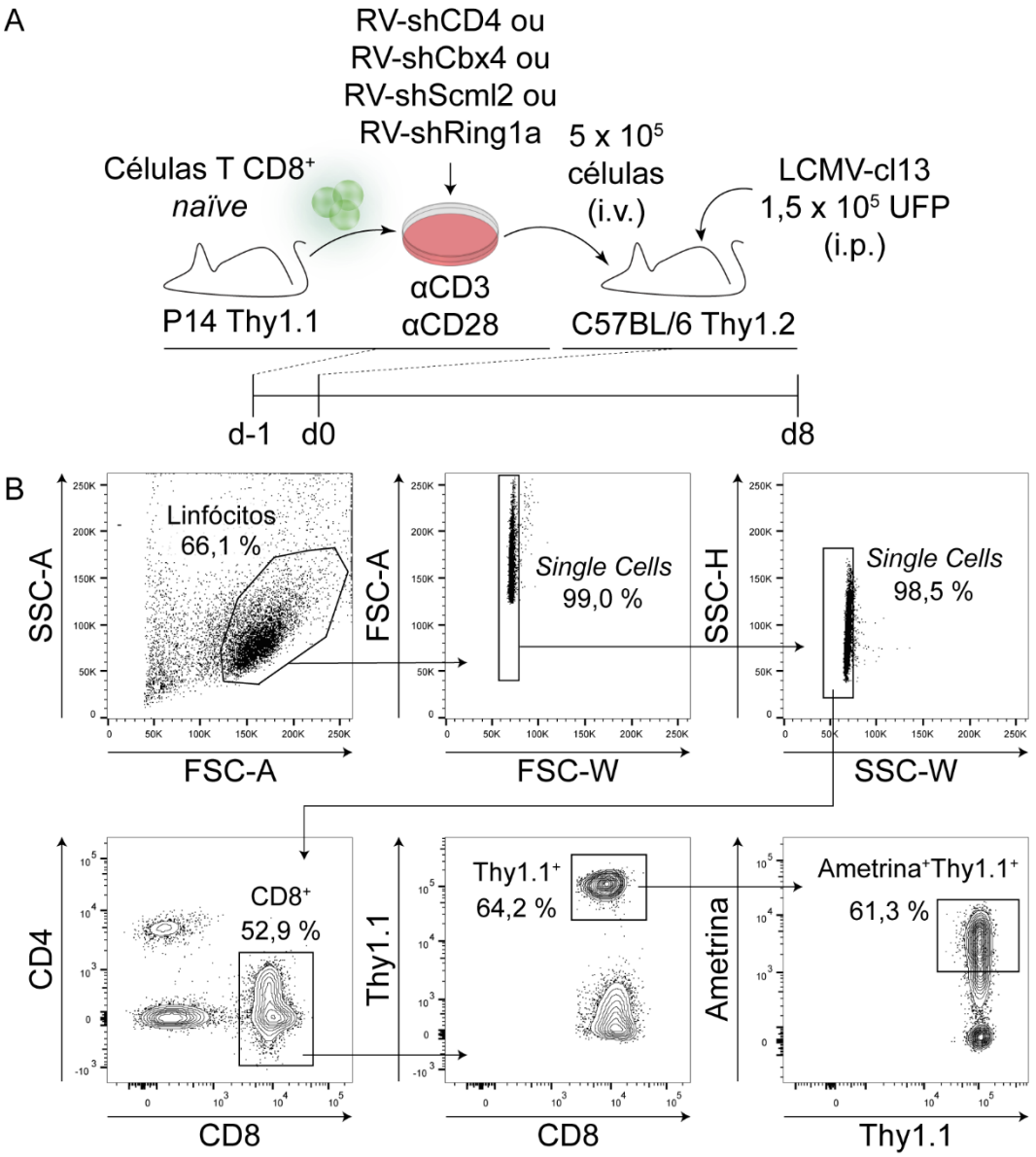


Figura 9. Desenho experimental para a análise de células T CD8⁺ P14 deficientes em subunidades de PRC1 diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV. (**A**) Células T CD8⁺ *naïve* de camundongos de linhagem P14 Thy1.1 foram isoladas, ativadas e transduzidas com vetor retroviral *in vitro* contendo plasmídeos expressando shRNA para as subunidades de PRC1 (shCbx4, shScml2 ou shRing1a) ou para o gene *Cd4* (shCD4), como controle. No mesmo dia da ativação e transdução, as células foram transferidas para camundongos congênicos C57BL/6 Thy1.2 (5 x 10^5 células) por via intravenosa. No dia seguinte esses animais foram infectados por via intraperitoneal com 1,5 x 10^5 UFP de LCMV-cl13. No 8º dia pós-infecção, os esplenócitos dos animais infectados foram isolados e as células T CD8⁺ transduzidas e transferidas adotivamente (Thy1.1⁺Ametrina^{Hi}) presentes nessa suspensão foram analisadas por citometria de fluxo quanto ao seu fenótipo utilizando as moléculas KLRG1 e CD127. (**B**) Esquema com *dot plots* e *contour plots* representativos ilustrando a estratégia de *gate* utilizada para a análise do fenótipo de células transduzidas e adotivamente transferidas.

O primeiro membro de PRC1 a ser investigado foi a subunidade catalítica do complexo, a proteína Ring1 (Figura 10). O silenciamento da expressão do gene

Ring1a (que codifica a proteína Ring1) em células T CD8$^+$ P14 diferenciadas em resposta à infecção viral aguda por LCMV não provocou alteração significativa na frequência de subpopulações de células efetoras na fase aguda da resposta (8º dia pós-infecção), com exceção de um aumento na frequência de células duplo negativas para as moléculas KLRG1 e CD127 (KLRG1$^-$CD127$^-$), subpopulação constituída de células em estágios precoces de diferenciação (Figura 10A e B). Portanto, os resultados indicaram que a ausência dessa proteína não impactou significativamente o perfil de diferenciação de células T CD8$^+$, sugerindo apenas um retardo neste processo.

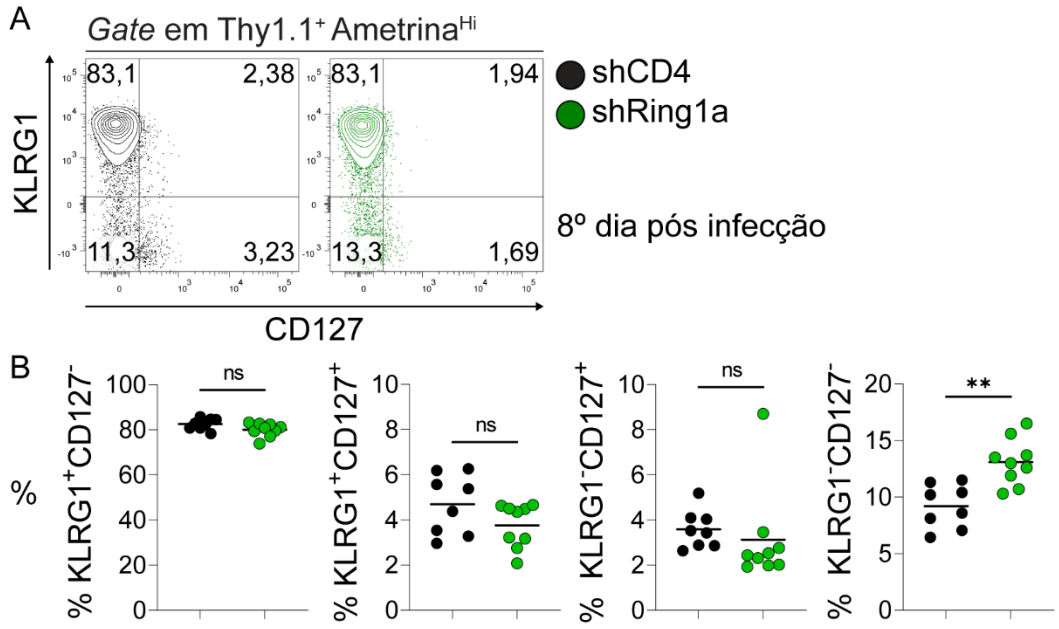


Figura 10. Análise fenotípica de células T CD8$^+$ P14 deficientes em Ring1 diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV em fase aguda da resposta (8º dia pós-infecção). (**A**) *Contour plot* representativo da *gate* utilizada para a definição das subpopulações de células T CD8$^+$ na análise fenotípica de células T CD8$^+$ P14 do grupo controle ("shCD4", em preto) ou deficientes para *Ring1a* ("shRing1a", em verde). (**B**) Frequência das subpopulações de células T CD8$^+$ P14 Thy1.1$^+$Ametrina^{Hi}. Dados da compilação de dois experimentos independentes (n ≥ 3 em cada experimento). Cada círculo representa um animal em um dos experimentos, barra representa o valor de média do grupo. ns = não significativo, **p < 0.01 calculado por teste t de Student bicaudal não pareado.

Quando investigado o efeito da ausência da proteína Cbx4 nas células T CD8$^+$ P14 (Figura 11), foi observado que a sua deficiência levou a uma redução na frequência da população de células efetoras de vida curta, definida pelo padrão de expressão KLRG1$^+$CD127$^-$, e um consequente aumento na frequência das populações de precursor de memória, KLRG1$^-$CD127$^+$, e duplo-positiva, KLRG1$^+$CD127$^+$ (Figura 11B). Esse padrão de alteração na frequência das populações foi acompanhado pela alteração no número absoluto de células de cada

respectiva população (Figura 11C). Dessa maneira, foi notório que, em oposição à deficiência em Ring1, a deficiência em Cbx4 levou a uma expressiva alteração na diferenciação das células T CD8$^+$ P14 em resposta a infecção viral aguda caracterizada pelo prejuízo na geração de células efetoras e o favorecimento da geração de células de fenótipo precursor de memória.

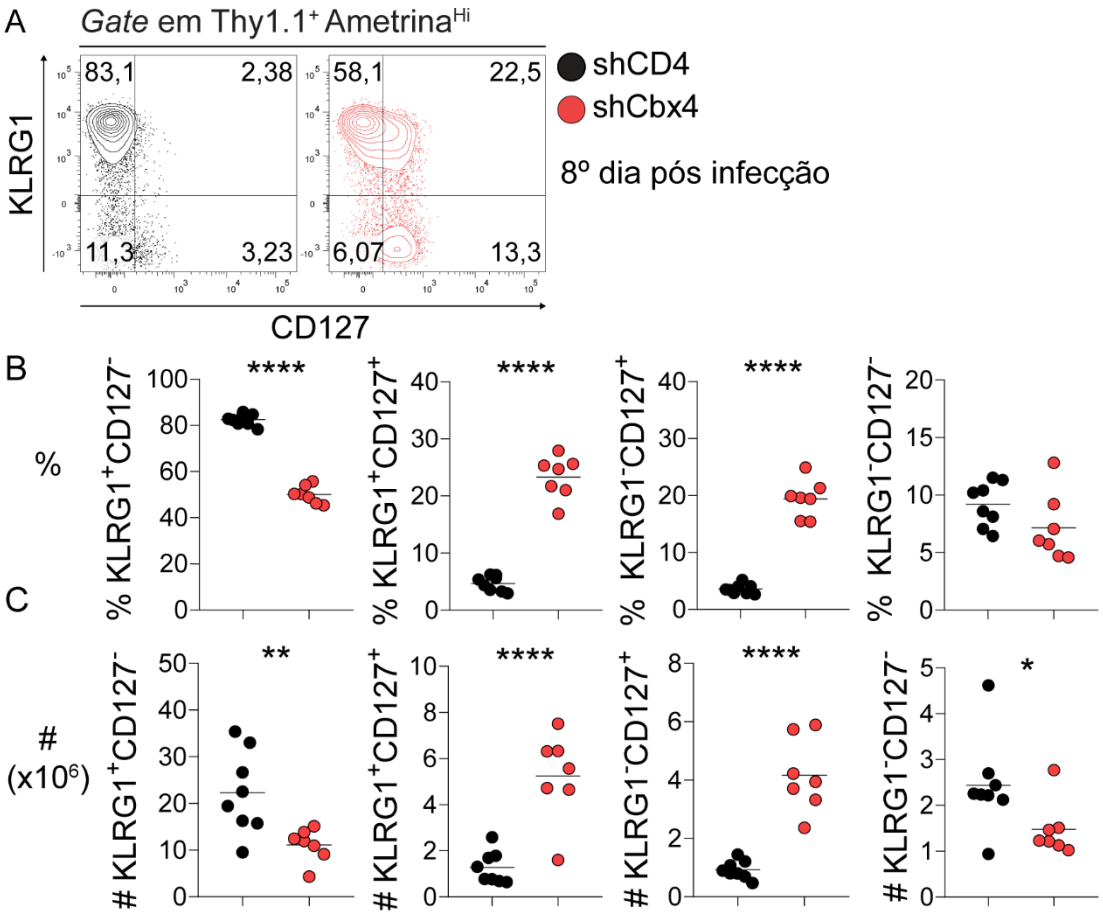


Figura 11. Análise fenotípica de células T CD8$^+$ P14 deficientes em *Cbx4* diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV em fase aguda da resposta (8º dia pós-infecção). (**A**) *Contour plot* representativo da *gate* utilizada para a definição das subpopulações de células T CD8$^+$ na análise fenotípica de células T CD8$^+$ P14 do grupo controle ("shCD4", em preto) ou deficientes em Cbx4 ("shCbx4", em vermelho). (**B**) Frequência e (**C**) números totais das subpopulações de células T CD8$^+$ P14 Thy1.1$^+$Ametrina^{Hi}. Dados da compilação de dois experimentos independentes (n ≥ 3 em cada experimento). Cada círculo representa um animal em um dos experimentos, barra representa o valor de média do grupo. *p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001 calculado por teste *t* de Student bicaudal não pareado.

Em contraste, os efeitos da deficiência da subunidade Scml2 na diferenciação de células T CD8$^+$ não foi o mesmo encontrado na ausência de Cbx4 (Figura 12). A deficiência em Scml2 em células T CD8$^+$ P14 levou a uma diminuição significativa na frequência de células efetoras de vida curta (KLRG1$^+$CD127$^-$) e um aumento bem menos expressivo na frequência de células precursoras de memória

(KLRG1$^+$CD127$^+$). No entanto, foi observado um notável aumento da frequência de células duplo negativas (KLRG1$^-$CD127$^-$) (Figura 12. B).

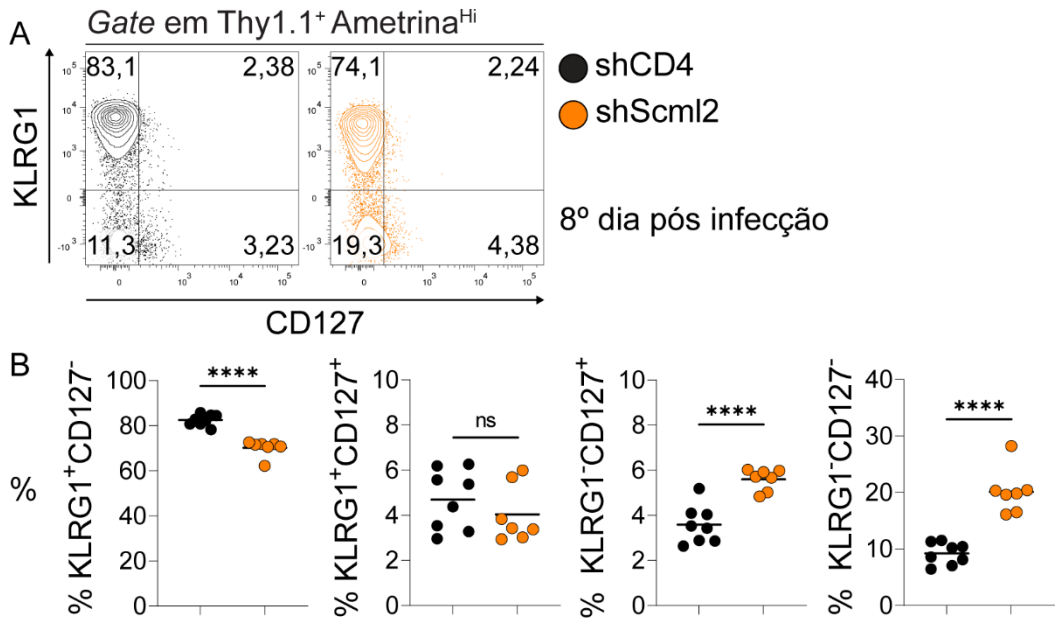


Figura 12. Análise fenotípica de células T CD8$^+$ P14 deficientes em Scml2 diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV em fase aguda da resposta (8º dia pós-infecção). (**A**) *Contour plot* representativo da *gate* utilizada para a definição das subpopulações de células T CD8$^+$ na análise fenotípica de células T CD8$^+$ P14 do grupo controle ("shCD4", em preto) ou deficientes para *Scml2* ("shScml2", em laranja). (**B**) Frequência das subpopulações de células T CD8$^+$ P14 Thy1.1$^+$Ametrina^{Hi}. Dados da compilação de dois experimentos independentes (n ≥ 3 em cada experimento). Cada círculo representa um animal em um dos experimentos, barra representa o valor de média do grupo. ns = não significativo, ****p < 0.0001 calculado por teste t de Student bicaudal não pareado.

O coletivo de resultados levantados na análise fenotípica e funcional de células T CD8$^+$ deficientes para diferentes subunidades do PRC1 sugerem que as subunidades Cbx4 e Scml2 participam da regulação da diferenciação de células T CD8$^+$ em um fenótipo efetor ou de memória, bem como também da modulação da sua função efetora citotóxica. Dessa maneira, a investigação do papel dessas subunidades na diferenciação de células T CD8$^+$ avançou analisando o impacto da deficiência dessas proteínas no perfil transcricional de células T CD8$^+$ em resposta a infecção viral aguda por LCMV.

5.2 Análise do perfil transcricional de células T CD8$^+$ deficientes para subunidades de PRC1

Além de investigar o papel das subunidades de PRC1 na regulação da diferenciação de células T CD8$^+$ através da análise do fenótipo de células T CD8$^+$ P14 deficientes para essas proteínas, também foi analisado o impacto que a deficiência

das subunidades Cbx4 e Scml2 de PRC1 poderia promover para o perfil transcricional dessas células (Figura 13). Para isso, células T $CD8^+$ P14 foram isoladas por FACS no 8º dia pós-infecção por LCMV-Arm, utilizando como critério o marcador congênico das células adotivamente transferidas (Thy1.1) e a proteína repórter do vetor retroviral (Ametrina) (Figura 13A). As células isoladas tiveram seu RNA total extraído e preparado para o sequenciamento de RNA (RNA-Seq).

Os dados do RNA-Seq foram utilizados para calcular genes diferencialmente expressos entre as células T $CD8^+$ P14 controle ("shCD4") e células T $CD8^+$ P14 deficientes para subunidades do PRC1 ("shCbx4" ou "shScml2"), utilizando o pacote R DESeq2. Na comparação entre as células T $CD8^+$ P14 controle e células T $CD8^+$ P14 deficientes em Cbx4 foram encontrados 836 genes diferencialmente expressos (DEGs, do inglês *Differentially Expressed Genes*), enquanto na comparação com células T $CD8^+$ P14 deficientes em Scml2 foram encontrados 586 DEGs. Os genes diferencialmente expressos encontrados em uma comparação ou na outra, totalizando 1240 genes, foram visualizados em um gráfico de *heatmap* utilizando os valores de expressão diferencial em escala de $\log_2$ ("Log_2FoldChange") (Figura 13B). Dados prévios do nosso grupo, obtidos na comparação entre células T $CD8^+$ de memória e células T $CD8^+$ efetoras (células T $CD8^+$ antígeno-específicas isoladas no 30º e 8º dias pós-infecção, respectivamente, em modelo de infecção viral aguda por LCMV) foram utilizados como referência para o perfil transcricional de cada estado diferenciado (SCOTT-BROWNE et al., 2016). Esses dados foram analisados em conjunto para a determinação de genes com o mesmo comportamento de alteração, definindo-se *clusters*, pelo método de "clusterização" por *k-means*.

A "clusterização" dos conjuntos de dados em união permitiu a visualização de genes associados ao fenótipo efetor ou fenótipo de memória que sofreram alteração mediante a deficiência em uma das subunidades de PRC1 (Figura 13C). É possível observar que células T $CD8^+$ P14 deficientes em Cbx4 apresentaram regulação positiva de diversos genes associados ao fenótipo de memória. Nesse grupo, incluem-se o gene *Tcf7*, que codifica o fator de transcrição chave para o comprometimento com o destino de memória e indução de capacidade multipotente ("*stemness*") Tcf1, e os genes *Sell* e *Il7r*, que codificam as proteínas de superfície CD62L e IL-7Rα (ou CD127), respectivamente, que são moléculas associadas ao fenótipo de memória (Figura 13C). Também foi observada a regulação positiva do gene para o fator de

transcrição associado ao fenótipo de memória *Eomes* e o gene *Slamf6*, associado ao caráter de multipotência de células T $CD8^+$ (Figura 13C). Além disso, destaca-se a regulação negativa de genes associados ao fenótipo efetor nas células deficientes em Cbx4, como os codificantes para o fator de transcrição *Zeb2*, as proteínas de superfície *Klrg1* e *Cx3cr1* e a proteína citotóxica Perforina (*Prf1*) (Figura 13C). Em conjunto, as alterações na expressão gênica em decorrência da deficiência em Cbx4 sugerem um desvio para a aquisição de um perfil transcricional característico do fenótipo de memória em células T $CD8^+$ efetoras, corroborando os resultados observados na análise fenotípica das células T $CD8^+$ P14.

Em contraste, a análise de genes diferencialmente expressos em células T $CD8^+$ P14 deficientes para Scml2 não apresentou os mesmos resultados encontrados para Cbx4, o que também se alinha aos achados da análise de fenótipo. Embora também alterados, a maioria dos genes associados ao fenótipo de memória ou fenótipo efetor não apresentaram uma mudança tão marcante quanto a visualizada na condição de deficiência em Cbx4, indicando uma maior participação de Cbx4 na regulação do perfil transcricional de células T $CD8^+$ (Figura 13C).

Para avaliar a hipótese de que a deficiência em Cbx4 provoca um desvio do perfil transcricional de células T $CD8^+$ efetoras para um perfil associado ao fenótipo de memória, foi utilizado o teste de análise de enriquecimento de conjunto gênico (GSEA, do inglês "*Gene Set Enrichment Analysis*") (Figura 13D). No teste, foi utilizado como conjunto gênico de referência a assinatura de células T $CD8^+$ precursoras de memória (genes regulados positivamente na população $KLRG1^-CD127^+$ de células T $CD8^+$ isoladas no 8º dia pós-infecção) em modelo de infecção viral aguda por LCMV, em comparação com as outras populações de células T $CD8^+$ definidas pelas moléculas KLRG1 e CD127 (WANG et al., 2018). O resultado do teste mostrou um enriquecimento de genes da assinatura de células T $CD8^+$ precursoras de memória no grupo de genes regulados positivamente em células deficientes pra Cbx4, em comparação à condição controle, corroborando a hipótese levantada.

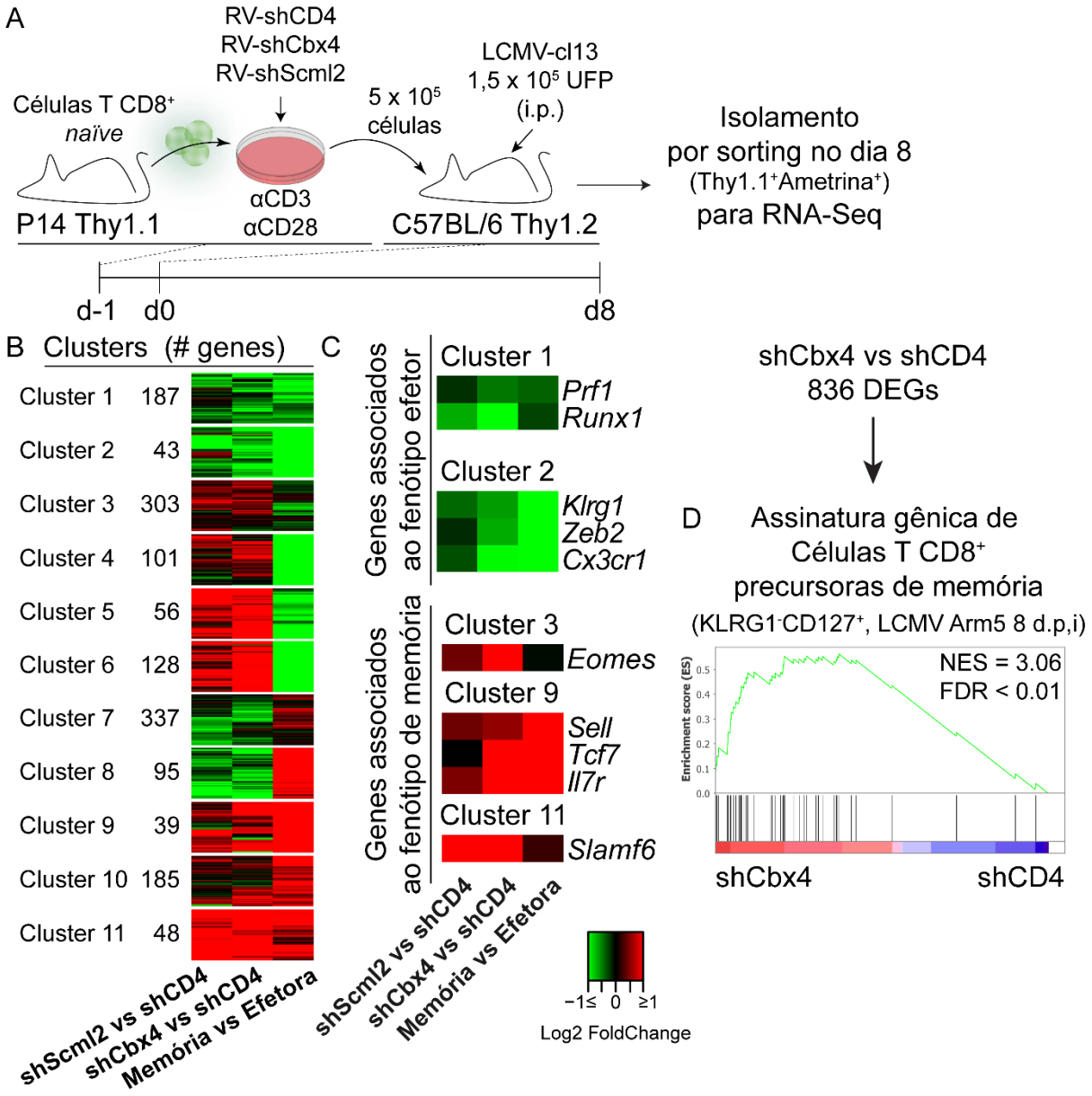


Figura 13. Análise do perfil transcricional por RNA-Seq de células T CD8⁺ P14 deficientes em subunidades do PRC1. (**A**) Células T CD8⁺ *naïve* de camundongos de linhagem P14 Thy1.1 foram isoladas, ativadas e transduzidas com vetor retroviral *in vitro* e, no mesmo dia, transferidas para camundongos congênicos C57BL/6 Thy1.2 (5 x 10^5 células). No dia seguinte esses animais foram infectados por via intraperitoneal com 1,5 x 10^5 UFP de LCMV-cl13. Oito dias após a infecção, os esplenócitos dos animais infectados foram isolados e as células transduzidas e transferidas adotivamente (Thy1.1⁺Ametrina⁺) presentes nessa suspensão foram isoladas por FACS, processadas para extração de RNA e preparação de biblioteca de transcriptoma e, posteriormente, analisadas por RNA-Seq. (**B**) Os genes diferencialmente expressos (DEGs) entre as comparações de células T CD8⁺ deficientes em Scml2 (primeira coluna) ou Cbx4 (segunda coluna) foram visualizados em heatmap k-clusterizado de valores de $\log_2$ Fold Change e comparados com DEGs encontrados na comparação de células T CD8⁺ efetoras e de memória geradas em modelo de infecção viral aguda por LCMV (terceira coluna). (**C**) Destaque de DEGs associados ao fenótipo efetor ou fenótipo de memória em células T CD8⁺. (**D**) Os 836 genes diferencialmente expressos (DEGs) encontrados na comparação entre as condições shCbx4 e shCD4 foram utilizados em um teste de GSEA, testando o enriquecimento de uma assinatura gênica de células T CD8⁺ precursoras de memória (KLRG1⁻CD127⁺) (WANG et al., 2018); número de acesso do GEO: GSE111143. Resultado descrito em gráfico de enriquecimento e pontuação de enriquecimento normalizada (NES, do inglês *Normalized Enrichment Score*). Significância calculada por taxa de falsa descoberta (FDR, do inglês *False Discovery Rate*).

A análise das alterações no perfil transcricional de células T CD8$^+$ P14 deficientes em Cbx4 e Scml2 indicou que a ausência de Cbx4 durante o processo de diferenciação dessas células provocou um perceptível desvio para um programa transcricional característico de células comprometidas com o fenótipo de memória em tempos precoces de uma resposta viral aguda. Os resultados observados na análise de RNA-Seq corroboram ainda os resultados encontrados na análise fenotípica (Figuras 11 e 12) previamente feita, onde há um prejuízo na geração de células T CD8$^+$ de fenótipo efetor, um prejuízo na função efetora citotóxica e um concomitante aumento da população de células de memória mediante a deficiência em Cbx4. Portanto, o conjunto de resultados encontrados até então evidenciam um papel mais claro da subunidade Cbx4, e dessa maneira foi optado pelo foco na investigação da participação desta proteína no processo de diferenciação de células T CD8$^+$.

Para também analisar os efeitos da deficiência em Cbx4 no perfil transcricional de uma forma global, sem um foco específico em genes associados aos fenótipos efetor e de memória, foi buscado a quais processos biológicos pertenciam os genes diferencialmente expressos encontrados nas células T CD8$^+$ P14 deficientes em Cbx4 através da análise de enriquecimento de vias de processos biológicos classificados no banco de dados Gene Ontology (GO) (Figura 14). A análise mostrou um expressivo enriquecimento em genes envolvidos com processos biológicos relacionados a divisão celular e controle do ciclo celular, entre eles os processos de segregação de cromossomos (“*chromossome segregation*”), montagem do complexo de centrômero (“centromere complex assembly”) e replicação do DNA (“*DNA replication*”). Entre os genes incluídos nesses processos podem ser citados genes codificantes para diversos reguladores e proteínas envolvidas com a divisão celular, incluindo *Mki67*, *Brca1*, *Aurkb*, *Cdk1* e diversos membros do complexo protéico do cinetócoro (Figura 14A e B). Também foi observado o enriquecimento em processos biológicos envolvidos com a resposta imune, destacado por exemplo nas categorias de regulação positiva da ativação de células T (“*positive regulation of T cell activation*”), como os genes *Myb*, *Cd160* e *Il2ra* e genes envolvidos com o processo de apoptose de leucócitos (“*leukocyte apoptotic process*”) (Figura 14A e B).

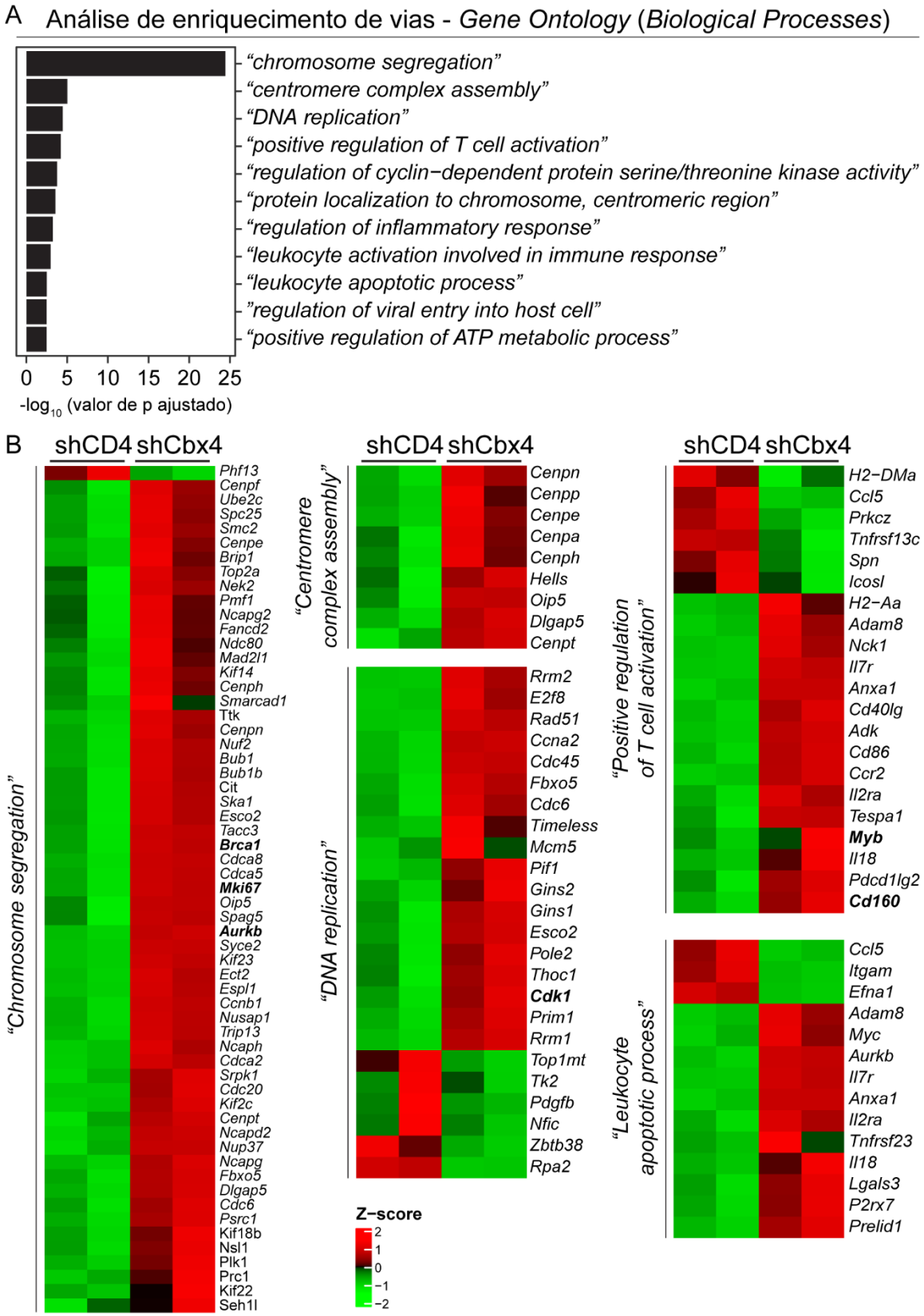


Figura 14. Análise de enriquecimento de vias utilizando genes diferencialmente expressos em células T CD8⁺ P14 deficientes em Cbx4. (**A**) Genes diferencialmente expressos (DEGs) encontrados na comparação entre o perfil transcricional de células T CD8⁺ P14 deficientes em Cbx4 e células T CD8⁺ P14 controle foram testados em uma análise de enriquecimento de vias utilizando o banco de dados de termos de processos biológicos do *Gene Ontology*. Os processos biológicos com maior representatividade dentro dos DEGs foram visualizados em um gráfico de barras indicando o nível de

significância do resultado (antilog do log de base 10 do valor de p ajustado). (**B**) Visualização em *heatmap* de valores de z-score dos DEGs pertencentes a cada processo biológico de alguns processos selecionados para destaque.

Uma vez que as análises de RNA-Seq foram realizadas na população total de células T CD8$^+$, uma possível explicação para as alterações gênicas detectadas em células T CD8$^+$ P14 deficientes em Cbx4 seria o aumento na frequência da subpopulação de precursores de memória. Dessa maneira, o aumento na expressão diferencial de genes associados ao fenótipo de memória e diminuição de genes associados ao fenótipo efetor seria em decorrência da oferta no número de transcritos na população total de células T CD8$^+$ e não devido a uma regulação transcricional nas subpopulações. Para eliminar esse viés, foi realizado o isolamento das subpopulações KLRG1^{Hi} (contendo células T CD8$^+$ efetoras de vida curta) e KLRG1^{Lo} (contendo células T CD8$^+$ precursoras de memória) (Figura 15A) e ambas tiveram seu perfil transcricional analisado separadamente em comparação com seu equivalente do grupo controle (Figura 15B e C). Mesmo na subpopulação KLRG1^{Hi} pode ser notado o aumento significativo na expressão de genes associados ao fenótipo de memória, incluindo o *Tcf7* e o *Il7r* (Figura 15B). Esse resultado dá suporte à hipótese de que a deficiência em Cbx4 impacta globalmente o perfil transcricional de células T CD8$^+$ diferenciadas em resposta a infecção aguda viral por LCMV, demonstrando que o resultado obtido no RNA-Seq da população total de células T CD8$^+$ P14 não é devido a um viés estabelecido pelo aumento da frequência de células T CD8$^+$ precursoras de memória.

Em concordância, quando analisado as diferenças no perfil de células KLRG1^{Lo}, também é possível observar o aumento de genes associados ao fenótipo de memória, como o *Il7r*, *Slamf6* e *Cxcr3* (associado ao fenótipo de memória efetora), e queda na expressão de genes associados ao fenótipo efetor, como o *Zeb2*, em células T CD8$^+$ P14 deficientes em Cbx4 (Figura 15. C). É possível ver também uma maior expressão do gene *Tcf7*, apesar de não ser estatisticamente significativa, o que pode ser explicado pelo fato de que essa análise é feita através da comparação de duas populações enriquecidas em células com o fenótipo de memória e, portanto, os níveis de expressão de *Tcf7* já seriam altos em tanto na condição controle quanto nas células deficientes em Cbx4.

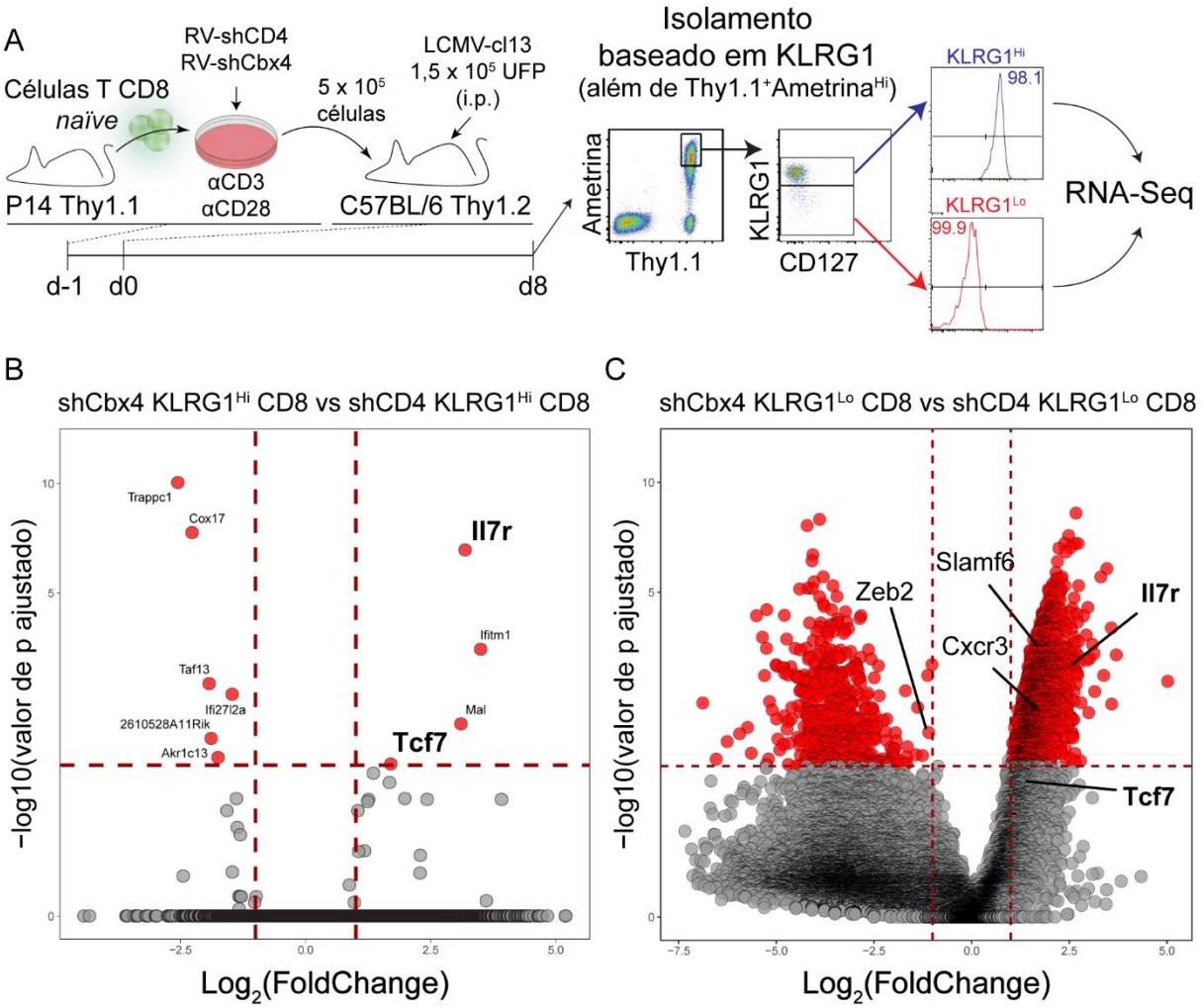


Figura 15. Análise do perfil transcricional de células T CD8⁺ P14 deficientes em Cbx4 nas subpopulações KLRG1^{Hi} e KLRG1^{Lo}. (**A**) Células T CD8⁺ P14 Thy1.1 transduzidas e transferidas adotivamente para camundongos congênicos C57BL/6 Thy1.2 infectados com LCMV-cl13 foram isoladas por FACS para análise de RNA-seq, como descrito anteriormente (ver Figura 6). Porém, nessa análise as células foram isoladas por FACS baseadas na sua expressão de KLRG1 (em grupos de alta expressão, KLRG1^{Hi}, e baixa expressão, KLRG1^{Lo}), além do critério de Ametrina^{Hi}Thy1.1⁺. *Volcano plot* com os valores de expressão diferencial (em Log2 *Fold Change*) e significância (valor de p ajustado) das comparações entre células T CD8⁺ P14 do grupo controle ("shCD4") e células T CD8⁺ P14 deficientes em Cbx4 ("shCbx4") nas subpopulações (**B**) KLRG1^{Hi} e (**C**) KLRG1^{Lo}. Em linhas pontilhadas na horizontal e vertical, linhas de corte de significância (valor de p ajustado < 0,05) e alteração da expressão (Log2 *Fold Change* > |1|) definidos para o estabelecimento de expressão diferencial. Em círculos vermelhos, representação de genes diferencialmente expressos, em círculos cinza, genes não diferencialmente expressos.

Para investigar com maior foco e detalhe o papel da proteína Cbx4 na determinação do destino celular de células T CD8⁺, diferentes abordagens e modelos de diferenciação de células T CD8⁺, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, foram empregados. Essas estratégias foram brevemente resumidas no tópico a seguir.

5.3 Abordagens metodológicas e modelos de diferenciação para a investigação do papel de Cbx4 na diferenciação e função de células T CD8⁺

Para investigar o papel da subunidade Cbx4 do complexo regulador epigenético PRC1 na determinação do destino celular de células T $CD8^+$, foram utilizadas diferentes abordagens visando a manipulação da expressão dessa proteína em células murinas, tanto inibindo a expressão ou superexpressando o gene codificante de Cbx4, em diferentes modelos de diferenciação de células T $CD8^+$ *in vitro* e *in vivo* (Figura 16).

O impacto da ausência da expressão do gene codificante para a proteína Cbx4 foi avaliado tanto através de uma estratégia de inibição da expressão gênica (Figura 16A), previamente mencionado, quanto por uma estratégia de deleção genômica (nocaute) (Figura 16B). O silenciamento da expressão do gene *Cbx4* em células T $CD8^+$ murinas foi realizado através da utilização do vetor contendo a sequência para expressão de um shRNA com direcionamento para o mRNA de Cbx4, descrito anteriormente nos experimentos *in vivo*. A expressão dos shRNAs foi induzida através da transdução de células T $CD8^+$ *naïve* ativadas *in vitro*, utilizando vetores retrovirais baseados em MSCV (do inglês, *Murine Stem Cell Virus*), contendo a sequência do shRNA no contexto do microRNA mir30 e a sequência do gene para proteína repórter Ametrina (Figura 16A). Alternativamente, a estratégia de deleção genômica foi realizada utilizando uma linhagem de camundongos com nocaute condicional do gene *Cbx4* em células T, utilizando o sistema *loxP-Cre* (animais $Cbx4^{fl/fl}Cd4^{Cre}$). Nesse sistema os animais possuem a expressão da recombinase Cre sob o controle do promotor do gene *Cd4* e a região N-terminal do gene *Cbx4* (incluindo os dois primeiros éxons do gene) é flanqueada por sítios loxP, reconhecidos por Cre. Dessa maneira, todas as células T (de TCR αβ) maduras, que passaram pela fase de desenvolvimento de timócito duplo positivo ($CD4^+CD8^+$), apresentam a deleção de uma porção do gene *Cbx4*, impedindo o sucesso da transcrição do gene (Figura 16B).

Foi avaliado também o impacto da reposição da expressão gênica de *Cbx4* em células T $CD8^+$ de animais com nocaute condicional para *Cbx4* ($Cbx4^{fl/fl}Cd4^{Cre}$) ou ainda a superexpressão de Cbx4 em células T $CD8^+$ de animais selvagens (C57BL/6) ou controle ($Cbx4^{fl/fl}$) (Figura 16C). Além disso, para a investigação do papel de diferentes domínios funcionais da proteína Cbx4 no mecanismo molecular de diferenciação de células T $CD8^+$, também foi realizada a superexpressão de formas mutantes da proteína Cbx4: (i) contendo um cromodomínio não funcional ou; (ii) desprovida de ambos os domínios de interação ao SUMO (SIM). Para os ensaios de

superexpressão, foi empregado o mesmo método de transdução retroviral com plasmídeos contendo as sequências de mRNA selvagem ou mutantes de *Cbx4*, e sequências de interesse, como o gene para proteína repórter, GFP (para a seleção de populações positivas em ensaios de citometria de fluxo).

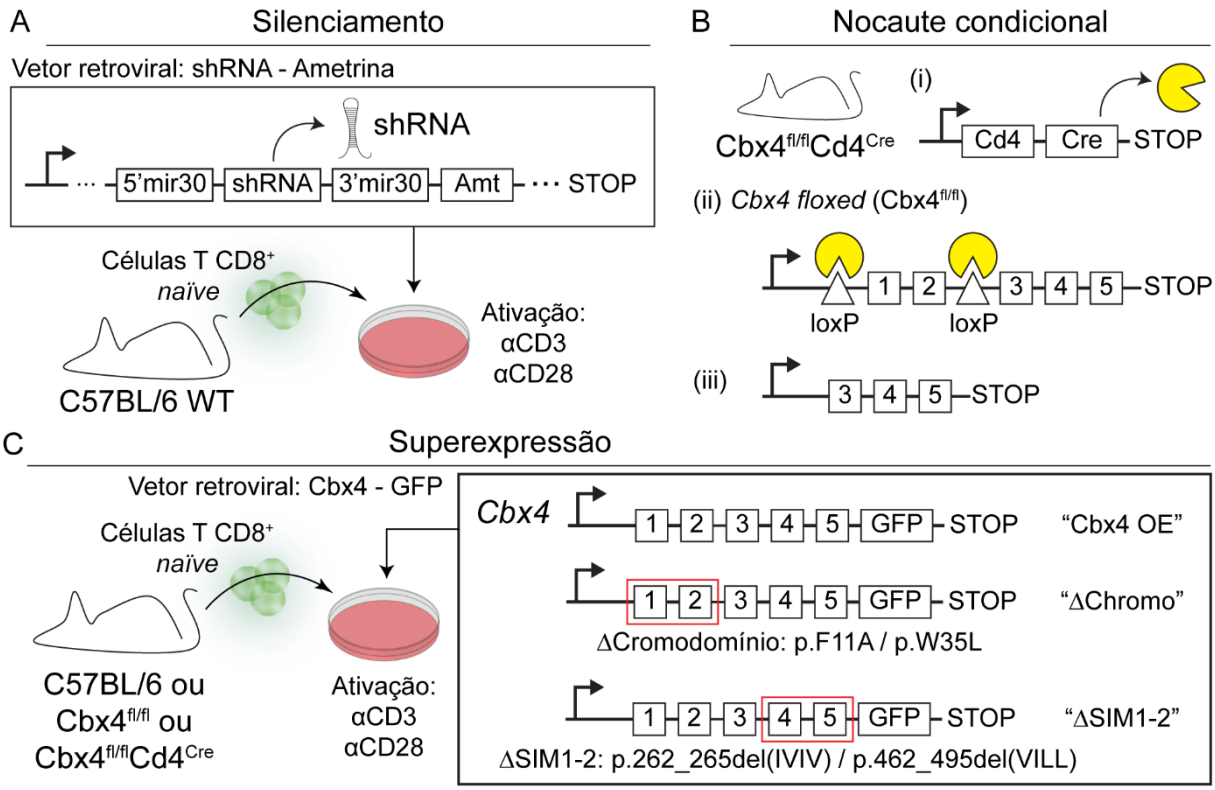


Figura 16. Esquemas de abordagens metodológicas para a manipulação da expressão do gene *Cbx4* em células murinas. Diversas abordagens para a manipulação da expressão do gene *Cbx4* em células T CD8⁺ murinas foram utilizadas no intuito de investigar o papel da proteína na diferenciação dessas células. Para promover a deficiência do gene *Cbx4* foram utilizadas: (**A**) uma abordagem de silenciamento, utilizando método de transdução de vetores retrovirais contendo a sequência codificante para o shRNA no contexto do microRNA mir30 e a sequência codificante para a proteína repórter Ametrina, ambos sob o mesmo promotor, ou; (**B**) uma abordagem de *nocaute* condicional utilizando o sistema loxP-cre, em camundongos da linhagem Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre}, que possuem a expressão da recombinase Cre condicionada a expressão do gene *Cd4* (i) e os dois primeiros éxons do gene *Cbx4* flanqueados por sítios loxP, que são reconhecidos pela recombinase (ii) e promovem a excisão desses éxons (iii) gerando um produto truncado e não funcional. (**C**) Foi utilizada também uma abordagem para a superexpressão do gene *Cbx4* na forma selvagem ("Cbx4 OE") ou de mutantes funcionais do gene, com a perda da função do cromodomínio ("ΔChromo") ou com a deleção dos motivos de interação com SUMO ("ΔSIM1-2"). Os éxons afetados pelas mutações realizadas nessa abordagem foram marcados por um quadrado vermelho.

Para avaliar os impactos causados pelas manipulações genéticas do gene Cbx4 na diferenciação de células T CD8⁺ foram utilizados diferentes modelos de diferenciação de células T CD8⁺ *in vitro* e *in vivo*. Para a diferenciação *in vitro*, células T CD8⁺ *naïve* isoladas de camundongos foram polarizados para o fenótipo tipo efetor ou tipo memória baseado em diferentes intensidades do primeiro sinal de ativação e

um regime de suplementação com citocinas recombinantes associadas a cada fenótipo, como descrito em detalhes na metodologia e na seção de resultados **5.4**.

Para a avaliar os impactos na diferenciação *in vivo* de linfócitos T $CD8^+$, foram utilizados os modelos de infecção aguda ou crônica pelo vírus LCMV. Para a infecção aguda foi utilizada a inoculação de LCMV, cepa Armstrong (LCMV-Arm) em uma dose de 2 x 10^5 UFP via i.p. ou LCMV, cepa clone13 (LCMV-cl13) em uma dose de 1,5 x 10^5 UFP via i.p.. No modelo de infecção aguda, as células T $CD8^+$ foram analisadas no 8º e 60º dia pós-infecção. Para a indução de infecção crônica foi utilizada o vírus LCMV-cl13, em uma dose de 4 x 10^6 UFP via intravenosa. Nos experimentos onde foi avaliada a indução de resposta secundária de linfócitos T $CD8^+$ ativados pós-infecção viral aguda por LCMV, foi utilizado o modelo de infecção com a bactéria *Listeria monocytogenes* expressando o epítopo imunodominante de gp33, glicoproteína específica do LCMV (*Listeria monocytogenes*-gp33).

5.4 Análise do impacto da deficiência em Cbx4 em células T $CD8^+$ cultivadas *in vitro* em condições polarizantes para o fenótipo tipo efetor ou tipo memória

Uma vez observado o impacto do modulador epigenético Cbx4 para a diferenciação de células T $CD8^+$ no curso de uma resposta viral aguda, prosseguimos na investigação do mecanismo molecular associado. Para cumprir esse objetivo, aplicamos as metodologias de biologia molecular e bioquímica: (i) a análise da expressão gênica por método de RT-qPCR; (ii) a análise de níveis proteicos por imunoprecipitação e *western blotting*; (iii) e a análise da deposição da marca epigenética repressora de PRC1 e PRC2 (H2AK119Ub e H3K27me3, respectivamente) através de ChIP-qPCR. Todas essas metodologias requerem uma quantidade de material celular alto para sua realização, o que torna desafiador a prática delas utilizando linfócitos T $CD8^+$ isoladas de animais em modelos de infecção. Para contornar essa limitação, foi empregado o uso de protocolos de polarização de células T $CD8^+$ em cultivo primário, que possibilitam a expansão e diferenciação dessas células *in vitro* (Figura 17). Além disso, através de uma abordagem utilizando culturas primárias de células T $CD8^+$ deficientes em Cbx4 ou células T $CD8^+$ controle, é possível observar também o efeito intrínseco à célula da ausência de Cbx4 para a diferenciação de linfócitos T $CD8^+$.

Para o cultivo primário de linfócitos T CD8⁺ e diferenciação em fenótipos tipo efetor e tipo memória, foi utilizado um protocolo estabelecido pelos grupos colaboradores ao projeto liderado pelos professores João Viola (INCA-RJ) e Miriam Werneck (IBCCF/UFRJ). As células cultivadas foram analisadas no 6º e 14º dia pós-ativação para os linfócitos polarizados para o fenótipo tipo efetor ou tipo memória, respectivamente (Figura 17). No curso do cultivo, a expansão das células foi monitorada através da quantificação por método de exclusão com corante Azul de Trypan 0,1% em câmara de Neubauer. No dia final de cultivo, as células foram utilizadas para um ou mais de um dos seguintes experimentos: (i) análise do fenótipo por citometria de fluxo; (ii) reestimulo com PMA e Ionomicina para posterior análise da produção de citocinas por marcação intracelular e citometria de fluxo; (iii) isolamento para extração de RNA e posterior análise de expressão gênica por RT-qPCR; (iv) isolamento para a produção de extratos proteicos e posterior análise de expressão proteica por imunoprecipitação, *western blotting* e abordagem proteômica, e; (v) isolamento para a extração de cromatina e posterior análise de ChIP-qPCR (Figura 17).

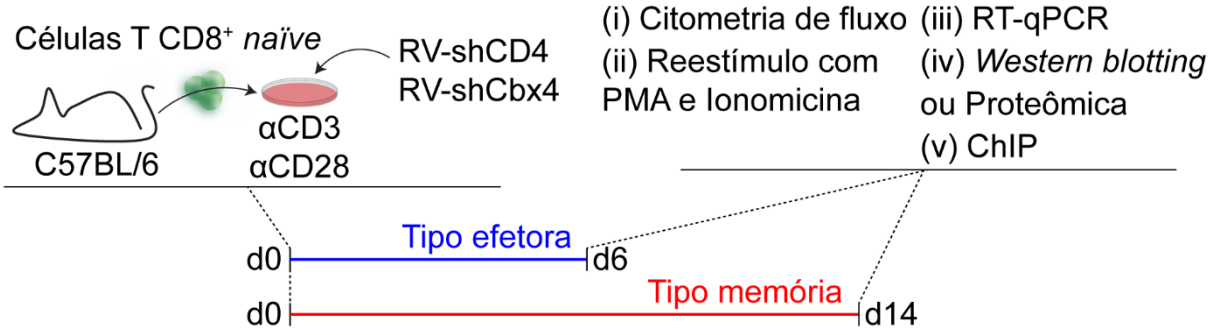


Figura 17. Desenho experimental para a análise de células T CD8⁺ murinas deficientes em Cbx4 polarizadas para o fenótipo tipo efetor ou tipo memória *in vitro*. Células T CD8⁺ *naïve* foram isoladas de camundongos C57BL/6, ativadas e transduzidas *in vitro* com vetores retrovirais expressando shRNA para a deficiência em *Cbx4* e cultivadas em dois protocolos distintos para a polarização das células para um fenótipo tipo efetor (6 dias de cultivo, em azul) ou tipo memória (14 dias de cultivo, memória). Ao fim do tempo de cultivo para cada protocolo, as células foram analisadas: (i) quanto ao seu fenótipo por citometria de fluxo; (ii) sua funcionalidade, através da quantificação de produção de citocinas por citometria de fluxo após reestimulo com PMA (10 nM) e Ionomicina (1 µM); (iii) sua expressão gênica através de RT-qPCR; (iv) sua expressão proteica através de imunoprecipitação, *western blotting* e abordagem proteômica, e; (v) quanto a deposição de marcas epigenéticas em caudas de histonas através de ChIP-qPCR.

Para validar a estratégia de silenciamento gênico de *Cbx4* por shRNA após expansão *in vitro*, as células T CD8⁺ murinas deficientes em Cbx4 (“shCbx4”) ou células controle (“shCD4”) foram cultivadas em condições polarizantes para o fenótipo tipo efetor e tipo memória e isoladas por FACS no último dia de cultivo (6º ou 14º dia, respectivamente) baseado na expressão da proteína fluorescente repórter do vetor

retroviral, a Ametrina (Figura 18). Essas células tiveram seu RNA total extraído e cDNA sintetizado para a quantificação de mRNA por método de RT-qPCR. Os resultados da quantificação mostraram uma redução expressiva e significativa dos níveis de mRNA de Cbx4, com uma redução média de aproximadamente 90% (89,5%) na condição polarizante para o fenótipo tipo efetor (Figura 18A) e mais de 70% (72,4%) na condição polarizante para o fenótipo tipo memória (Figura 18B). Dessa maneira, os resultados validaram a eficiência do silenciamento no modelo de diferenciação de células T CD8$^+$ cultivadas *in vitro* e polarizadas para ambos os fenótipos analisados.

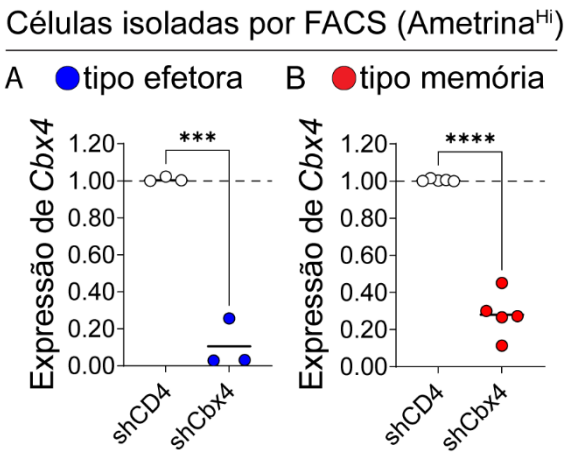


Figura 18. Validação da estratégia de silenciamento gênico de *Cbx4* em células T CD8$^+$ murinas polarizadas para o fenótipo tipo efetor ou tipo memória *in vitro*. Células T CD8$^+$ ativadas e transduzidas *in vitro* polarizadas para o fenótipo (**A**) tipo efetor ou (**B**) tipo memória foram isoladas por FACS e utilizadas para a quantificação do número de transcritos para o gene *Cbx4* por método de RT-qPCR. A quantificação do mRNA foi calculada pelo método de $2^{\Delta\Delta CT}$ e normalizada para os valores encontrados nas amostras de células controle ("shCD4"). Dados da compilação de pelo menos três experimentos independentes. Cada círculo representa um experimento, barra representa o valor de média do grupo. ***p < 0,001, ****p < 0,0001 calculado por teste t de Student bicaudal não pareado.

5.4.1 Análise da expansão de células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4 polarizadas *in vitro* para o fenótipo tipo efetor ou tipo memória

A expansão das células T CD8$^+$ cultivadas *in vitro* foi monitorada diariamente a partir do segundo dia de cultivo até o dia final (6º dia) para as células polarizadas para o fenótipo tipo efetor. Para as células polarizadas para o fenótipo de memória, por decorrência de limitações do protocolo, as células foram quantificadas diariamente a partir do segundo dia de cultivo apenas até o sexto dia e a quantificação foi retomada a partir do décimo dia de cultivo e mantida em dias intercalados até o dia final (14º dia).

Na análise da expansão acumulada não foram observadas diferenças significativas entre a expansão de células T CD8$^+$ controle e deficientes em Cbx4 tanto

no cultivo em condições polarizantes para o fenótipo tipo efetor quanto para o fenótipo tipo memória (Figura 19). No entanto, foi verificada uma pequena queda na expansão nas células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 polarizadas para o fenótipo tipo memória entre os dias 5 e 12 (Figura 19B). A quantificação por microscopia óptica também mostrou um maior número de células mortas, coradas por Azul de Trypan, na condição de deficiência em Cbx4 em comparação a condição controle (dados não mostrados). Essas observações somadas ao enriquecimento de vias associadas ao controle da viabilidade e divisão celular em células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 (Figura 14) indicaram a necessidade de uma maior investigação destes aspectos.

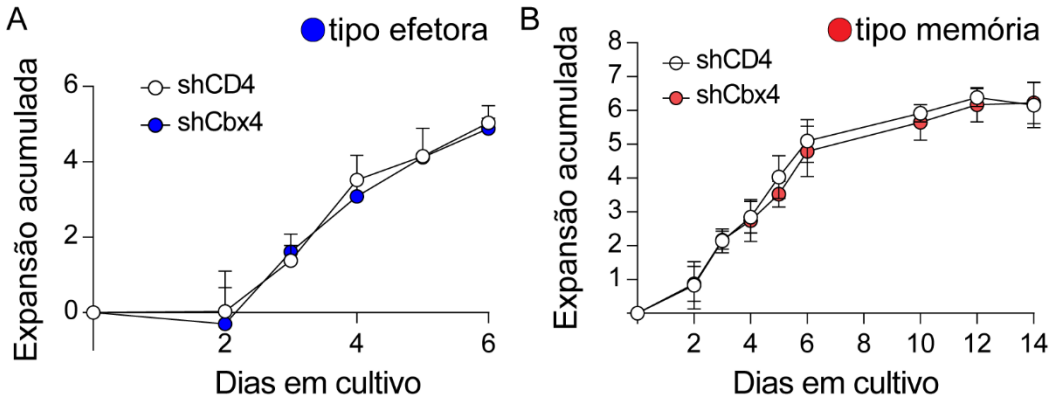


Figura 19. Análise da expansão acumulada de células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 polarizadas para o fenótipo tipo efetor ou tipo memória *in vitro*. Células T CD8⁺ ativadas e transduzidas *in vitro* com vetores retrovirais contendo shRNA para a deficiência em Cbx4 ("shCbx4") ou shRNA controle ("shCD4") foram polarizadas *in vitro* para o fenótipo tipo efetor ou tipo memória e quantificadas a cada recultivo por método de exclusão com corante Azul de Trypan 0,1% (v/v). A expansão acumulada das células viáveis polarizadas para o fenótipo (**A**) tipo efetor ou (**B**) tipo memória foi visualizada através do desenho de uma curva de valores obtidos na fórmula $X^d = X^{d-1} + log_2(\frac{N^d}{N^{d-1}})$; X^d = expansão encontrada em um dia; X^{d-1} = expansão encontrada no dia anterior; N^d = número total de células em cultivo quantificados em um dia; N^{d-1} = número total de células em cultivo quantificados no dia anterior. Dados são representativos de cinco experimentos independentes. Significância estatística foi calculada por teste ANOVA com dois fatores corrigido com teste Dunnett de múltiplas comparações.

5.4.2 Análise da morte celular e de estágios do ciclo celular de células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 polarizadas para o fenótipo tipo memória

Para investigar o potencial prejuízo na sobrevivência de células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 de fenótipo tipo memória foram analisados os parâmetros associados aos processos de morte celular no curso do cultivo das células *in vitro* (Figura 20). A frequência de células apoptóticas e necróticas foi determinada através da marcação fluorescente com Anexina V e 7-AAD. As células apoptóticas foram caracterizadas pelo fenótipo Anexina V⁺7-AAD⁻ enquanto as células necróticas foram caracterizadas como Anexina V⁺7-AAD⁺.

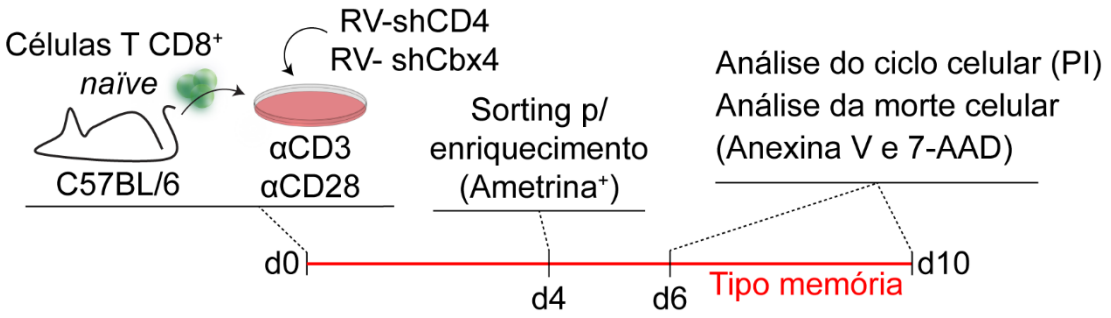


Figura 20. Desenho experimental para a análise de morte celular e de estágios do ciclo celular de células T CD8⁺ murinas deficientes em Cbx4 polarizadas para o fenótipo tipo memória *in vitro*. Células T CD8⁺ *naïve* foram isoladas de camundongos C57BL/6, ativadas e transduzidas *in vitro* com vetores retrovirais expressando shRNA para a deficiência em Cbx4 e cultivadas em condição polarizante para fenótipo tipo memória (14 dias de cultivo, memória). No quarto dia de cultura, apenas as células transduzidas (Ametrina⁺) foram isoladas por FACS e recultivadas, no intuito de assegurar que todas as células ao final da cultura são células que sofreram o silenciamento de Cbx4. Ao fim do tempo de cultivo as células foram avaliadas quanto a sua distribuição nos diferentes estágios do ciclo celular com marcação de PI e quanto aos níveis de morte celular por marcação de Anexina V e 7-AAD, ambos analisados em citometria de fluxo.

Foi observado que as células deficientes em Cbx4 (“shCbx4”) apresentaram uma significativa maior frequência das subpopulações de células apoptóticas e necróticas em comparação às células controle (“shCD4”), demonstrando um prejuízo na sobrevivência de células T CD8⁺ associado à perda da expressão de Cbx4 (Figura 21).

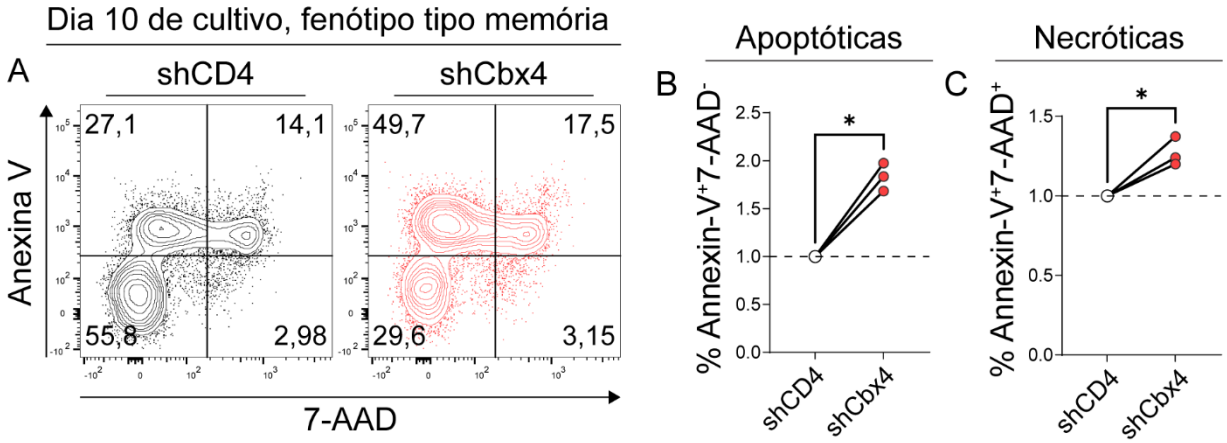


Figura 21. Análise da morte celular de células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 polarizadas para o fenótipo tipo memória *in vitro*. Células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 (“shCbx4”, em vermelho) ou células T CD8⁺ controle (“shCD4”, em preto) polarizadas para o fenótipo tipo memória *in vitro* foram analisadas por citometria de fluxo quanto a frequência de células em processo de morte celular com base na marcação com Anexina V e 7-AAD. (**A**) *Contour plot* representativo da *gate* utilizada para a análise da frequência das subpopulações de células apoptóticas (Anexina V⁺7-AAD⁻) e células necróticas (Anexina V⁺7-AAD⁺). (**B** e **C**) Frequência da população de células apoptóticas e necróticas foi normalizada em relação aos níveis encontrados nas células T CD8⁺ controle shCD4 dentro de cada experimento. Dados compilados de três experimentos independentes. Cada círculo representa um experimento. *p < 0,05, calculado por teste t de Student bicaudal não pareado.

Para investigar se havia também um prejuízo na capacidade proliferativa das células e compreender o seu estado de progressão no ciclo celular, foi avaliada a

distribuição das células T $CD8^+$ deficientes em Cbx4 cultivadas *in vitro* nos diferentes estágios do ciclo celular, incluindo o estágio sub-G0/G1 (Figura 22). Células isoladas nos dias 6 e 10 de cultivo em condição polarizante para o fenótipo tipo memória foram marcadas com PI e analisadas por citometria de fluxo. Foi observado que no sexto dia de cultivo, como já apontado na curva de expansão desenhada a partir dos valores de números totais de células T $CD8^+$ contados diariamente (Figura 19), não foram constatadas alterações significativas entre as células T $CD8^+$ deficientes em Cbx4 e as células na condição controle (shCD4) (Figura 22A, B, fileira superior). Em contrapartida, em resultados preliminares, a análise do dia 10 indica uma tendência consistente entre as replicatas de que as células T $CD8^+$ deficientes em Cbx4 apresentam uma maior frequência de células em estágio sub-G0/G1, o que indica células em processo de morte celular programada (apoptose) (Figura 22A, B, fileira inferior). É visto a consequente queda na frequência de células em estágio G0/G1, porém um contraintuitivo aumento na frequência de células em estágio S (em processo de duplicação do genoma) e em estágio G2/M (em estado de preparo para a divisão celular ou em processo de mitose). No entanto, esse aumento na frequência de células em estágios no ciclo celular que indicam um processo de proliferação está alinhado com a observação do aumento da expressão diferencial de diversos genes associados a processos biológicos relacionados com a divisão celular (como “segregação de cromossomos” e “montagem do complexo de centrômero”) e regulação da apoptose de leucócitos, como descrito acima na Figura 14.

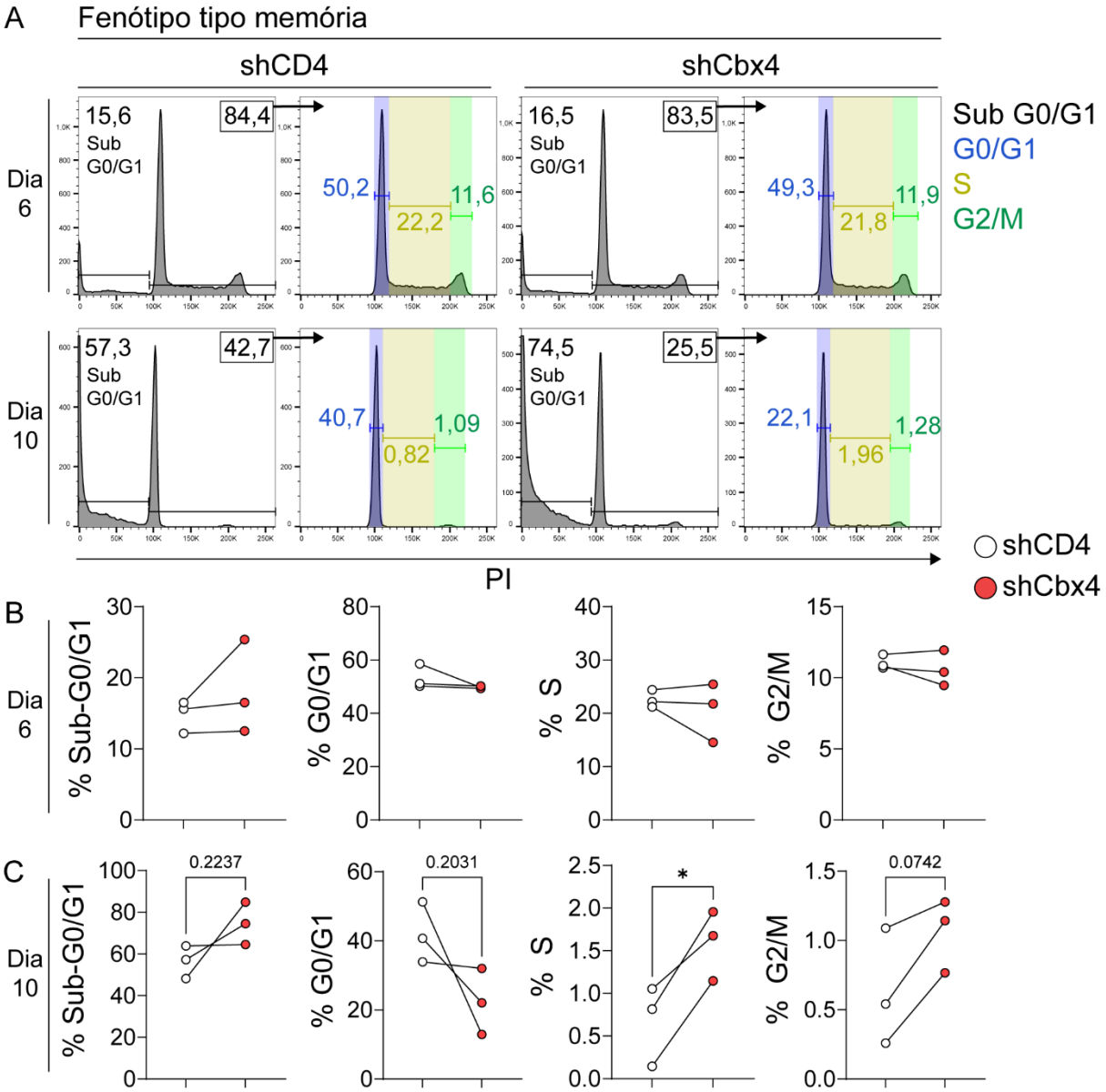


Figura 22. Análise do ciclo celular de células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 polarizadas para o fenótipo tipo memória *in vitro*. Células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 ("shCbx4", em vermelho) ou células T CD8⁺ controle ("shCD4", em branco) polarizadas para o fenótipo tipo memória *in vitro* foram analisadas por citometria de fluxo quanto à frequência de células em cada fase do ciclo celular (Sub-G0/G1, G1/G0, S ou G2/M) baseado na marcação com PI. (A) Histogramas representativo das *gates* utilizadas para a análise da frequência das subpopulações de cada fase do ciclo celular. Frequência das subpopulações em cada fase do ciclo celular no (B) 6º dia e (C) 10º dia de cultivo. Dados compilados de três experimentos independentes. Cada círculo representa um experimento. *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,0001 calculado por teste t de Student bicaudal pareado.

5.4.3 Análise fenotípica de células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 polarizadas *in vitro* para o fenótipo tipo efetor ou tipo memória

Correspondendo aos resultados anteriores encontrados na análise fenotípica de células T CD8⁺ P14 geradas em modelo de infecção viral aguda por LCMV, as células T CD8⁺ cultivadas *in vitro* e silenciadas para Cbx4 através de abordagem por silenciamento com shRNA mostraram aumento na frequência da população

expressando moléculas associadas ao fenótipo de memória. Foi observado o aumento da frequência de células expressando CD127 (Figura 23A-C) e CD62L (Figura 23D-F) em ambas as condições de polarização, tanto em células diferenciadas em um fenótipo tipo efetor (Figura 23A, B, D, E, em azul) quanto em células com fenótipo tipo memória (Figura 23A, C, D, F, em vermelho). Foram também mensurados os níveis de expressão das moléculas de superfície, calculados pelos valores de gMFI (Figura 23G-N). Em concordância com as medidas de frequência, foi observado que células T $CD8^+$ deficientes em Cbx4 expressam maiores níveis de moléculas associadas ao fenótipo de memória CD62L em ambas as condições de polarização em comparação as células controle (Figura 23H, L). No entanto, para o marcador CD127 foi visto um aumento significativo apenas na condição polarizante para o fenótipo de memória, apesar de células do tipo efetor apresentarem uma tendência de aumento (Figura 23I, M). Não foram verificadas alterações significativas no marcador associado a ativação CD44 e no marcador associado ao fenótipo efetor CD25 nas células polarizadas para o fenótipo tipo efetor (Figura 23J, N), porém células T $CD8^+$ deficientes em Cbx4 polarizadas para o fenótipo tipo memória apresentaram queda significativa no nível de CD44 (Figura 23 K).

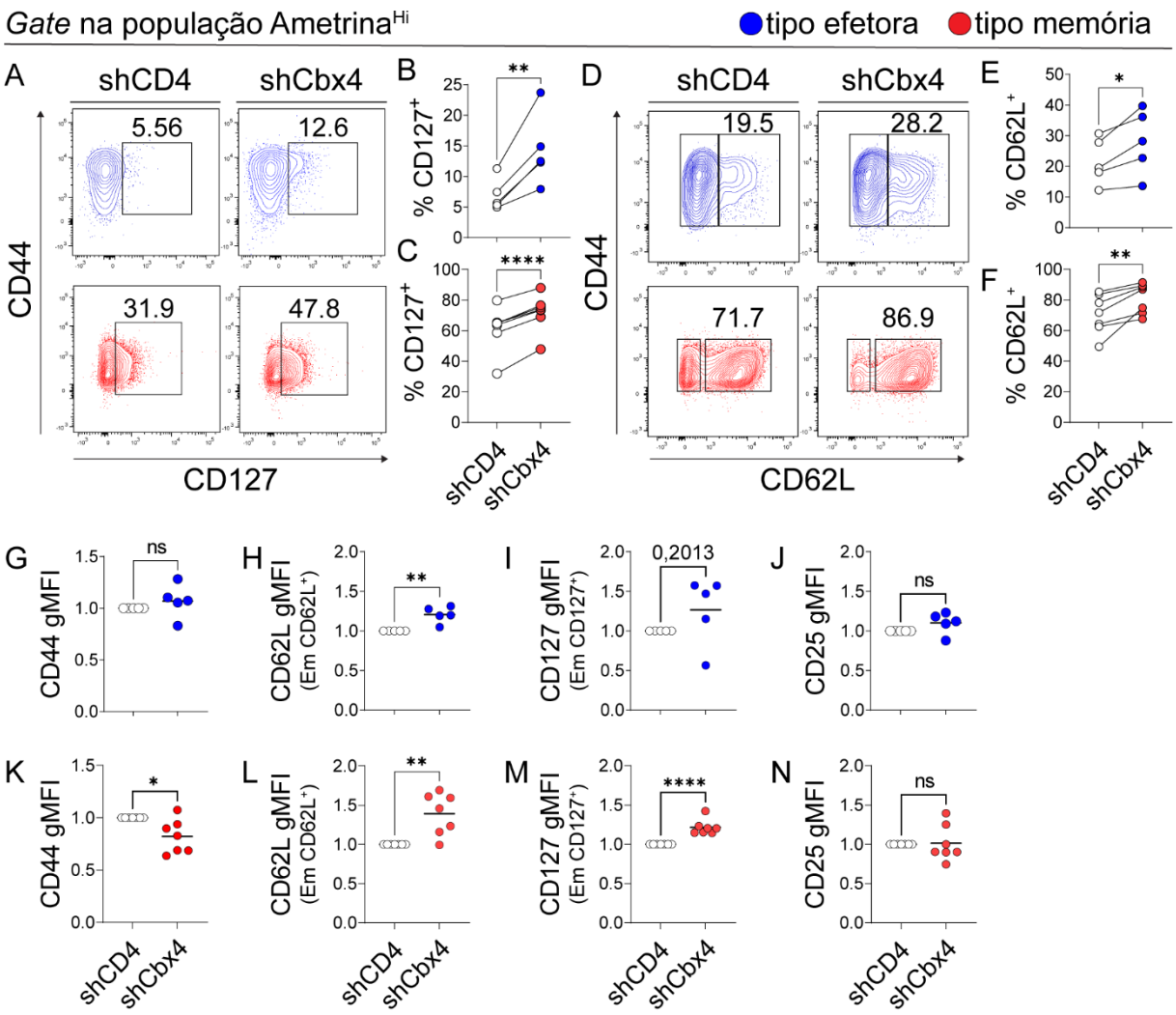


Figura 23. Expressão de moléculas de superfície em células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 cultivadas *in vitro*. Células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 ("shCbx4") ou células T CD8⁺ controle ("shCD4") polarizadas para o fenótipo tipo efetor (em azul) ou tipo memória (em vermelho) *in vitro* foram analisadas por citometria de fluxo quanto à frequência da população de células expressando moléculas associadas ao fenótipo de memória CD127 (**A-C**) e CD62L (**D-E**) e quanto aos níveis de expressão das moléculas: (**G**, **K**) CD44, associado a ativação; (**H**, **L**) CD62L e (**I**, **M**) CD127, associados ao fenótipo de memória e; (**J**, **N**) CD25, associado ao fenótipo efetor. A quantificação dos níveis de expressão foi normalizada em relação aos níveis encontrados nas células T CD8⁺ controle shCD4 dentro de cada experimento. (**A**, **D**) *Contour plot* representativo da *gate* utilizada para a análise da frequência das subpopulações CD127⁺ ou CD44⁺CD62L⁺. Dados da compilação de pelo menos cinco experimentos independentes. Cada círculo representa um experimento, barra representa o valor de média do grupo. ns = não significativo, *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,0001 calculado por teste t de Student bicaudal pareado.

5.5 Análise funcional de células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 polarizadas *in vitro* para o fenótipo tipo memória

Visto que alterações fenotípicas consistentes com as observações dos experimentos realizados *in vivo*, como o aumento na expressão das moléculas associadas ao fenótipo de memória CD62L e CD127, foram observadas quando células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 foram polarizadas para o fenótipo tipo memória

in vitro, optamos por avaliar as células polarizadas nesta condições quanto à sua capacidade funcional de produção de citocinas pró-inflamatórias IFN-γ e TNF, citocina IL-2 e proteína citotóxica Granzima B (Figura 24). Essa análise foi feita após reestímulo com PMA, na concentração de 10 nM, e Ionomocina, na concentração de 1 µM. Como caracterização de polifuncionalidade, foi analisada a frequência de células duplo-produtoras de IFN-γ e TNF (IFN-γ^+TNF$^+$) dentro da população de células transduzidas Ametrina^{Hi} (Figura 24A, B). Além disso, os níveis de expressão de cada uma das moléculas citadas acima também foram medidos, calculados pelos valores de gMFI (Figura 24C-F).

Os resultados mostraram queda na polifuncionalidade caracterizada pela frequência de células IFN-γ^+TNF$^+$ em células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4 polarizadas para o fenótipo tipo memória, em comparação as células T CD8$^+$ controle (Figura 24B). De forma concordante, os níveis de expressão de IFN-γ e TNF se mostraram também significativamente menores em comparação às células controle (Figura 24C, D). Além disso, foi observada menor expressão da citocina IL-2 (Figura 24E). Quando analisada a expressão da proteína citotóxica Granzima B, não foi observada uma diferença significativa ou tendência de alteração quando comparados os dois grupos (Figura 24F).

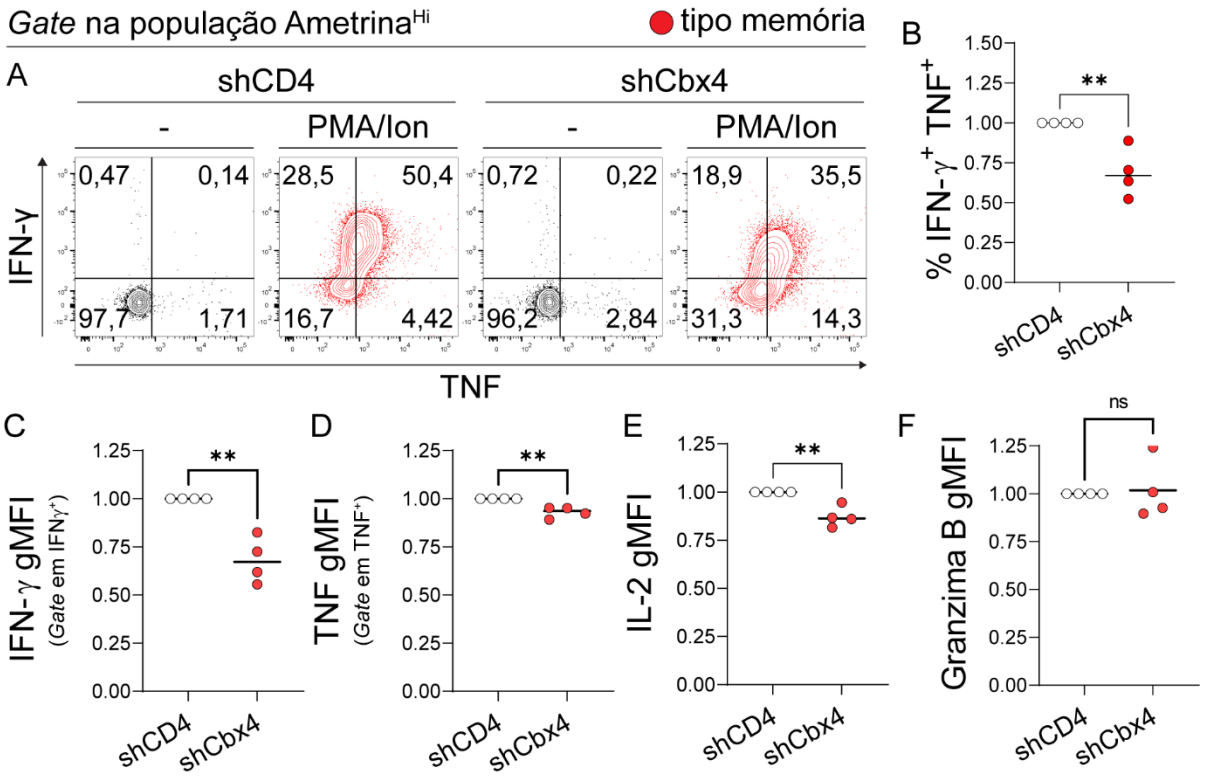


Figura 24. Análise da funcionalidade de células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 cultivadas *in vitro*. Células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 ("shCbx4") ou controle ("shCD4") foram reestimuladas com PMA (10 nM) e Ionomicina (1 µM) durante 6 horas, na presença de Brefeldina A pelas últimas 2 horas. Como controle, amostras não reestimuladas também foram incubadas por 6 horas, com adição de Brefeldina A pelas últimas duas horas. Ao fim da incubação as células foram analisadas por citometria de fluxo para a (A-E) produção de citocinas e (F) proteína citotóxica Granzima B. (**A**) *Contour plot* representativo da *gate* utilizada para a definição da população polifuncional duplo produtora de IFN-γ e TNF (IFN-γ⁺TNF⁺) em células reestimuladas (em vermelho) e não reestimuladas (em preto). (**B**) Quantificação da frequência de células T CD8⁺ transduzidas (Ametrina^{hi}) IFN-γ⁺TNF⁺. (**C-F**) Quantificação dos níveis de expressão de citocinas IFN-γ, TNF e IL-2, e da proteína citotóxica Granzima B, normalizados em relação aos níveis encontrados nas células T CD8⁺ controle shCD4 dentro de cada experimento. Dados da compilação de pelo menos cinco experimentos independentes. Cada círculo representa um experimento, barra representa o valor de média do grupo. ns = não significativo, **p < 0,01 calculado por teste t de Student bicaudal pareado.

Para aprofundar o estudo do papel de Cbx4 na função efetora de células T CD8⁺, a função citotóxica de células T CD8⁺ foi analisada em ensaios de citotoxicidade *in vitro*, utilizando um protocolo já estabelecido anteriormente por colaboradores do nosso grupo (XU et al., 2021; XU; KELLER; MARTINEZ, 2019). Células T CD8⁺ P14 deficientes em Cbx4 foram expandidas *in vitro* por 6 dias na presença de IL-2 recombinante humana na dose de 10 U/mL. Em seguida, as células foram isoladas por FACS (Ametrina^{Hi}) e co-cultivadas com células da linhagem tumoral EO771 capazes de expressar o peptídeo gp33-41, específico do LCMV, e a proteína repórter fluorescente GFP (EO771-gp33-GFP⁺) (Figura 25A). A citotoxicidade das células T CD8⁺ foi medida através da análise da frequência de células tumorais vivas, expressando GFP. Como controle, a função citotóxica antígeno-específica foi comparada com a função citotóxica não específica de células T CD8⁺ P14 através do co-cultivo com células EO771-GFP⁺, que não expressam o peptídeo gp33-41.

Foi observado que a deficiência em Cbx4 em células T CD8⁺ P14 significativamente diminui a capacidade citotóxica específica, em comparação a células T CD8⁺ P14 do grupo controle ("shCD4") (Figura 25B). Esse resultado corrobora o resultado anterior onde foi visto o prejuízo na diferenciação para o fenótipo efetor de células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 na produção de citocinas pró-inflamatórias, embora não tenha ocorrido diminuição na produção de Granzima B.

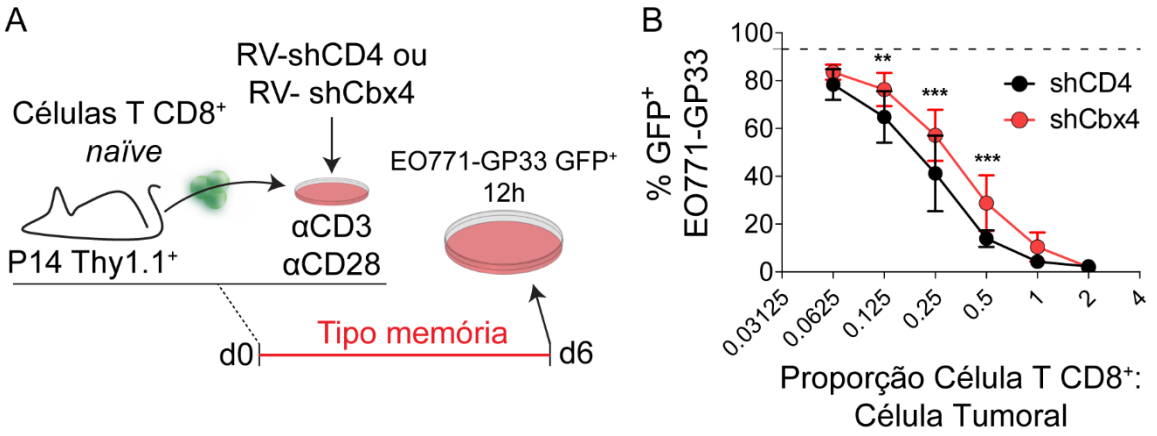


Figura 25. Análise funcional de células T CD8⁺ P14 deficientes em Cbx4 em ensaio de citotoxicidade *in vitro*. (**A**) Células T CD8⁺ P14 ativadas e transduzidas *in vitro* (como descrito anteriormente) foram cultivadas na presença de IL-2 humana recombinante na dose de 10 U/mL durante 6 dias. No 6º dia de cultivo, as células transduzidas (Ametrina^{Hi}) foram isoladas por FACS e co-cultivadas em diferentes proporções com células tumorais EO771-GP33 GFP⁺, que expressam o peptídeo gp33-41 do LCMV e a proteína repórter GFP, para a análise da capacidade de citotoxicidade *in vitro* de células T CD8. A frequência de células tumorais vivas foi analisada por citometria de fluxo baseado na expressão de GFP. (**B**) Frequência de células EO771-GP33 vivas após 12h de co-cultivo em diferentes proporções com células T CD8⁺ P14 deficientes em Cbx4. Linha pontilhada refere a frequência média de células EO771-GP33 cultivadas livre da presença de células T CD8⁺ (nível basal de morte celular). Dados da compilação de quatro experimentos independentes. Média ± desvio padrão das quadriplicatas. **p < 0.01, ***p < 0.001 calculado por teste ANOVA com dois fatores corrigido com teste Sidak de múltiplas comparações.

5.6 Análise da diferenciação de células T CD8⁺ policlonais de camundongos Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre} (Cbx4 T KO) em resposta primária a infecção aguda por LCMV

Os experimentos descritos neste tópico foram realizados em colaboração com o Prof. Gustavo Martinez da Universidade Rosalind Franklin University of Medicine and Science, em North Chicago, Illinois, Estados Unidos, com o então aluno de doutorado Tianhao Xu (Ph.D.) e os técnicos de pesquisa Alexander Schutte e Ashleigh Keller.

Visando continuar a investigação do papel da proteína Cbx4 na diferenciação de células T CD8⁺ (e o impacto da deficiência dessa proteína para o processo de diferenciação), foi utilizando uma abordagem de nocaute condicional de Cbx4 em células T, utilizados camundongos Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre} (Figura 26). De forma semelhante ao modelo anterior, onde foi estudada a diferenciação de células T CD8⁺ P14 transgênicas ativadas e transduzidas *in vitro* em modelo de infecção viral aguda por LCMV, neste modelo também foi analisado o fenótipo e a funcionalidade de células T CD8⁺ deficientes em Cbx4, mas desta vez a população endógena de células antígeno-específicas para LCMV foram analisadas através da utilização de marcação com tetrâmero. Além disso, neste modelo, as células T CD8⁺ foram analisadas tanto na fase aguda da resposta imune, no 8º dia pós-infecção, quanto na fase tardia, de

memória, da resposta, onde a resolução da infecção e a eliminação do antígeno já foi atingida, no 60º dia pós-infecção (Figura 26).

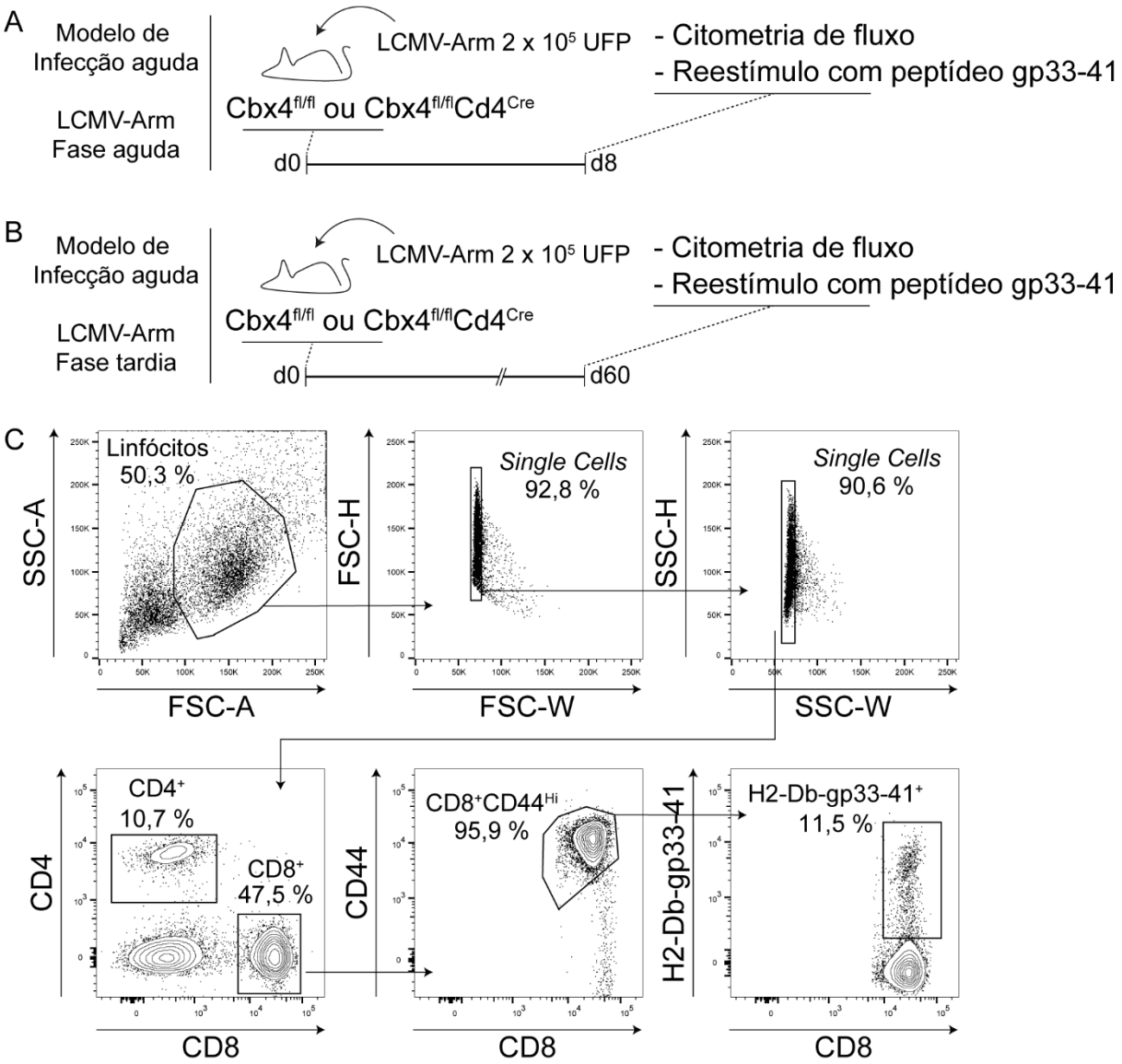


Figura 26. Desenho experimental para a análise da diferenciação de células T CD8⁺ de camundongos Cbx4$^{fl/fl}$ e Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre} (Cbx4 T KO) em resposta a infecção viral aguda por LCMV. Animais da linhagem Cbx4$^{fl/fl}$, usados como grupo controle, e da linhagem Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre}, deficientes em Cbx4 em modelo de nocaute condicional foram infectados com LCMV-Armstrong (LCMV-Arm) no inóculo de 2 x 10^5 UFP. Os esplenócitos dos animais infectados foram isolados e analisados por citometria de fluxo para investigação do fenótipo de células T CD8⁺ específicas para o LCMV, através de marcação por tetrâmero (H-2Db-gp33-41) ou reestimulados *ex vivo* com peptídeo gp33-41, antígeno específico do LCMV, para investigação da funcionalidade das células nos tempos de: (**A**) fase aguda da resposta, 8º dia pós-infecção ou; (**B**) fase tardia da resposta, 60º dia pós-infecção. (**C**) Esquema com *dot plots* e *contour plots* representativos ilustrando a estratégia de *gate* utilizada para a análise do fenótipo de células T CD8⁺ LCMV-específicas marcadas com tetrâmero H-2Db-gp33-41 ativadas no curso da resposta contra a infecção viral aguda.

5.6.1 Modelo de infecção viral aguda, 8º dia pós-infecção (fase aguda)

5.6.1.1 Análise fenotípica (LCMV-Arm, 8º dia pós-infecção)

Foram realizados dois experimentos independentes, os esplenócitos de camundongos $Cbx4^{fl/fl}Cd4^{Cre}$ (Cbx4 T KO) e camundongos do grupo controle $Cbx4^{fl/fl}$ foram isolados do baço dos animais no 8º dia pós-infecção, quantificados e preparados para análise fenotípica das células T $CD8^+$ por marcação com tetrâmero H-2Db-gp33-41 conjugado a molécula fluorescente (para determinação da população antígeno-específica) seguido de marcação com anticorpos fluorescentes. As células marcadas foram então analisadas por citometria de fluxo. A análise dos esplenócitos mostrou que não houve diferenças significativas na frequência ou no número total de células T $CD8^+$ quando comparados os grupos de animais controle ou Cbx4 T KO (Figura 27A, B). A mesma ausência de alteração nesses parâmetros também ocorreu quando analisada a subpopulação antígeno-específica, marcada pelo tetrâmero (Figura 27C, D).

Em contraste com os resultados anteriores, as células T $CD8^+$ antígeno específicas (H2-Db-gp33-41^+) de camundongos Cbx4 T KO não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nas frequências das populações de células efetoras de vida curta ($KLRG1^+CD127^-$), duplo positivas ($KLRG1^+CD127^+$) ou células precursoras de memória ($KLRG1^-CD127^+$) (Figura 27E, F). No entanto, foi observado queda significativa na população duplo negativa ($KLRG1^-CD127^-$) (Figura 27F). Esse padrão também se estendeu para as análises do número total de células de cada subpopulação (Figura 27G). Quando analisados os níveis de expressão das moléculas de superfície relacionadas ao fenótipo efetor e de memória de células T $CD8^+$, através da medida do MFI, não foi observada diferenças significativas na expressão das moléculas KLRG1, CD127 e CXCR3 (Figura 27H-J).

Apesar de não ter sido observada uma concordância entre os resultados observados nesse experimento com os resultados observados no modelo de transferência adotiva de células T $CD8^+$ P14 deficientes em Cbx4 apresentado anteriormente (Figura 11), alterações de circuitos transcricionais durante a ontogenia das células T, efeitos compensatórios mediados por outras proteínas Cbx, efeitos extrínsecos mediados por clones de células T $CD8^+$ não específicos para o LCMV, além de alterações no compartimento T $CD4^+$, podem explicar essas discrepâncias, como será discorrido no tópico de discussão dessa tese.

Os esplenócitos dos animais infectados também foram fixados, permeabilizados e marcados para a avaliar a expressão de fatores de transcrição

(Figura 27K-R). A análise por citometria de fluxo mostrou uma tendência de menores níveis de expressão do fator de transcrição associado ao fenótipo efetor T-bet nas células T $CD8^+$ LCMV-específicas de animais Cbx4 T KO, tanto na subpopulação $KLRG1^+$ quando na subpopulação $KLRG1^-$ (Figura 27K, O). Em relação aos níveis de expressão do fator de transcrição associado ao fenótipo de memória Eomes, não foram observadas diferenças significativas ou tendência de alteração (Figura 27L, P). A razão da expressão dos fatores de transcrição, frequentemente considerada como critério mais informativo da caracterização do fenótipo de células T $CD8^+$ do que a simples análise da expressão isolada de cada molécula (CHEN et al., 2019), também foi calculada. Foi observado que células T $CD8^+$ antígeno-específicas de animais Cbx4 T KO apresentavam uma razão T-bet/Eomes menor em comparação à razão encontrada nas células de animais controle (Figura 27M, Q), o que sugere um prejuízo na aquisição do programa transcricional associado ao fenótipo efetor. Essa razão foi significativamente menor na subpopulação $KLRG1^-$. Os níveis de expressão do fator de transcrição Tcf-1, associado ao fenótipo de memória e considerado chave para o comprometimento com este destino celular, foram medidos nas células T $CD8^+$ antígeno-específicas (Figura 27N, R). No entanto, nenhuma alteração significativa foi visualizada quando comparada as células de animais Cbx4 T KO e de animais do grupo controle.

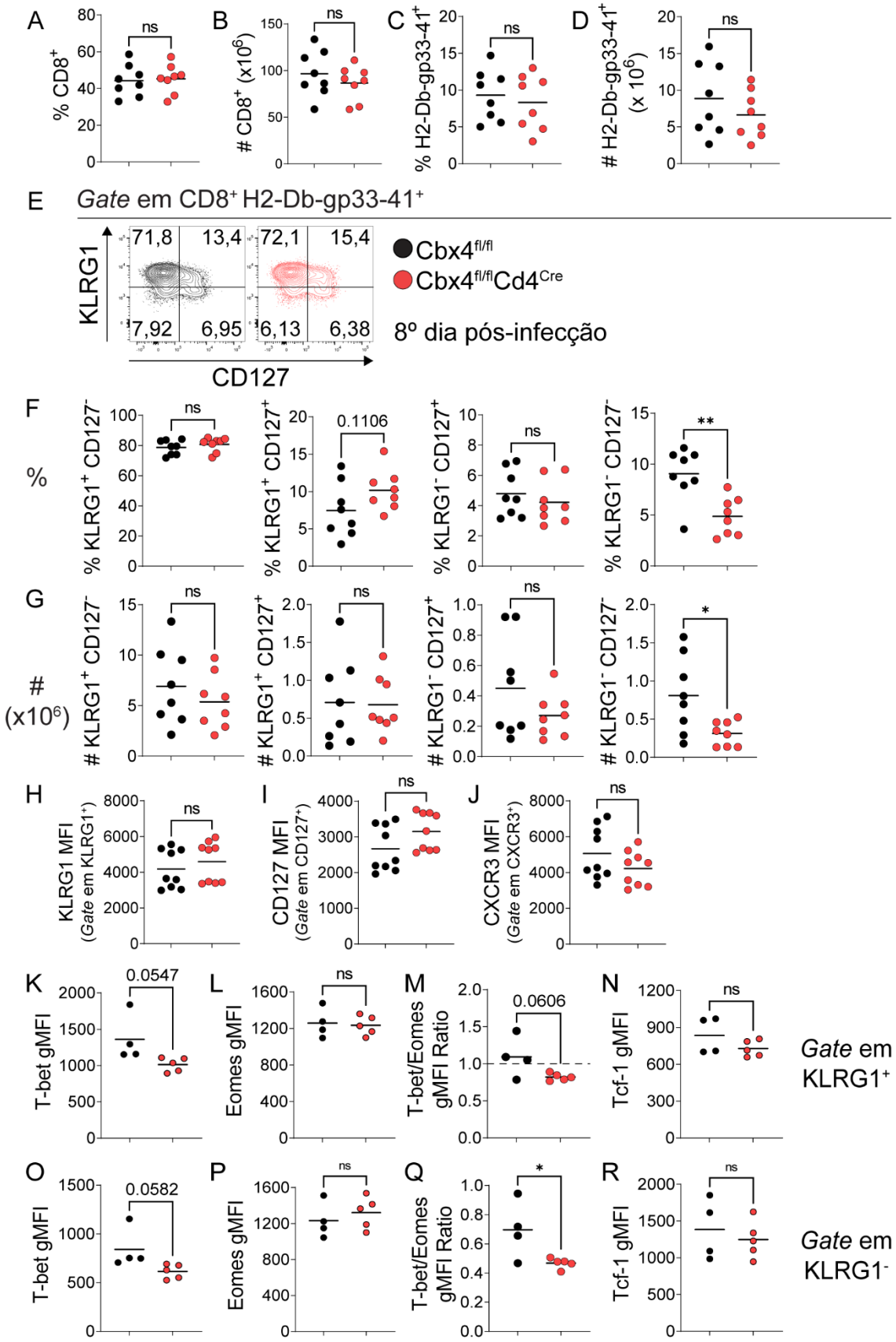


Figura 27. Análise fenotípica de células T CD8⁺ de animais Cbx4 T KO diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV em fase aguda da resposta (8º dia pós-infecção). Os esplenócitos de animais do grupo controle ("Cbx4$^{fl/fl}$", em preto) e animais Cbx4 T KO ("Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre}", em vermelho) foram analisados por citometria de fluxo no 8º dia pós-infecção. (**A**) Frequência e (**B**) número total de células T CD8⁺ e de (**C**, **D**) células T CD8⁺ LCMV-específicas marcadas com molécula de tetrâmero.

(**E**) *Contour plot* representativo da *gate* utilizada para a definição das subpopulações de células T $CD8^+$ efetoras na análise fenotípica. (**F**) Frequência e (**G**) número total, em milhões, das subpopulações de células T $CD8^+$ efetoras, baseadas na expressão das moléculas KLRG1 e CD127. (**H-J**) Níveis de expressão, quantificados por MFI, das moléculas (**H**) KLRG1, (**I**) CD127 e (**J**) CXCR3 em células T $CD8^+$ LCMV-específicas de animais do grupo controle e Cbx4 T KO. Níveis de expressão, quantificados por gMFI, dos fatores de transcrição (**K**, **O**) T-bet, (**L**, **P**) Eomes e (**N**, **R**) Tcf-1 ou (**M**, **Q**) a razão dos valores de nível de expressão em gMFI de T-bet e Eomes em células T $CD8^+$ LCMV-específicas nas subpopulações $KLRG1^+$ e $KLRG1^-$. Dados de um experimento independente ($n \geq 3$). Cada círculo representa um animal, barra representa o valor de média do grupo. ns = não significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ calculado por teste t de Student bicaudal não pareado.

5.6.1.2 Análise funcional (LCMV-Arm, 8º dia pós-infecção)

Para analisar a funcionalidade das células T $CD8^+$ de animais Cbx4 T KO ou de células de animais do grupo controle $Cbx4^{fl/fl}$, foi realizado o reestimulo *ex vivo* de esplenócitos totais com o peptídeo recombinante GP33 (gp33-41), na presença de Brefeldina A (Figura 28). As células, reestimuladas por quatro horas, foram então marcadas com tetrâmero e anticorpos fluorescentes específicos para citocinas pró-inflamatórias e Granzima B e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados preliminares indicaram uma tendência de queda na frequência de células antígeno-específicas duplo-produtoras de IFN-γ e TNF ($IFN\text{-}\gamma^+TNF^+$) e produtoras de TNF (TNF^+) (Figura 28A-D). A *gate* de células duplo produtoras foi definida de forma similar à mostrada na Figura 18, utilizando como referência células não reestimuladas com peptídeo recombinante, porém incubadas com Brefeldina A durante 4 horas. Além disso, células T $CD8^+$ antígeno-específicas de animais Cbx4 T KO apresentaram menor expressão de ambas as citocinas pró-inflamatórias (Figura 28E, F) e de Granzima B (Figura 28G), em comparação com o grupo controle. No coletivo, os resultados indicam uma diminuição da funcionalidade das células T $CD8^+$ deficientes em Cbx4 no curso de uma infecção viral aguda em tempo precoce.

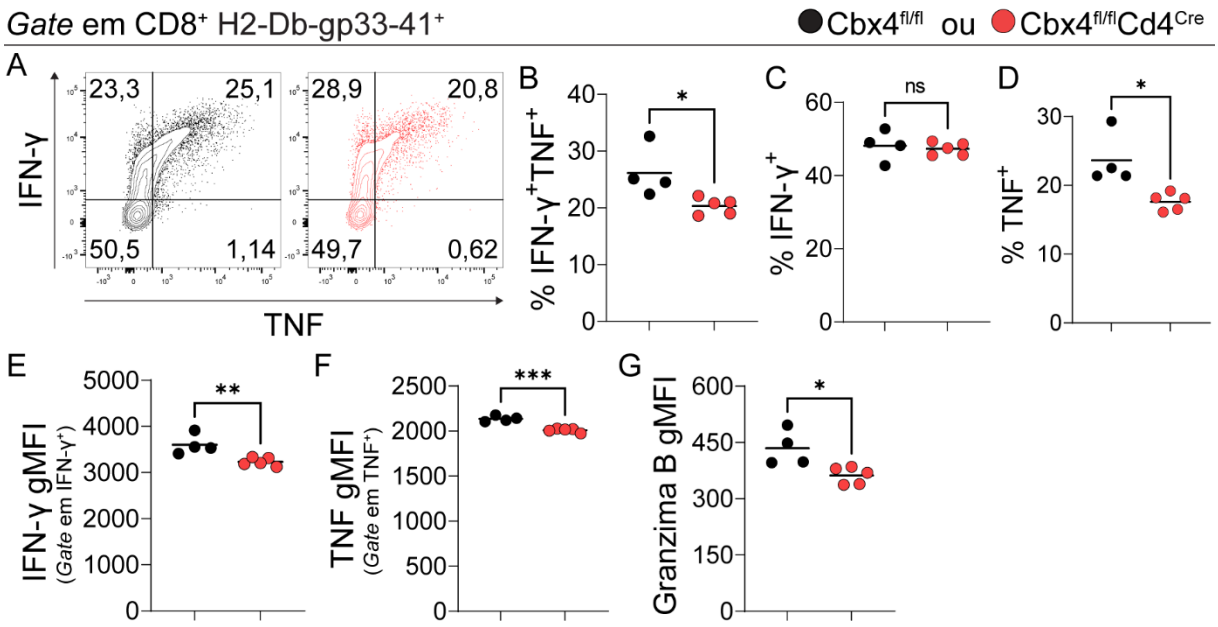


Figura 28. Análise funcional de células T CD8⁺ de animais Cbx4 T KO diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV em fase aguda da resposta (8º dia pós-infecção). Os esplenócitos de animais do grupo controle ("Cbx4$^{fl/fl}$", em preto) e animais Cbx4 T KO ("Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre}", em vermelho) foram isolados no 8º dia pós-infecção e reestimulados *ex vivo* com o peptídeo recombinante gp33-41 (0,2 µg/mL), na presença de Brefeldina A, por quatro horas. Em seguida, as células foram analisadas por citometria de fluxo. (**A**) *Contour plot* representativo da *gate* utilizada para a definição das subpopulações de células T CD8⁺ na análise funcional. (**B-D**) Frequência de células T CD8⁺ antígeno-específicas produtoras de IFN-γ e/ou TNF. (**E-G**) Níveis de expressão das citocinas pró-inflamatórias IFN-γ e TNF, e Granzima B em células T CD antígeno-específicas. Dados de um experimento independente (n ≥ 3). Cada círculo representa um animal, barra representa o valor de média do grupo. ns = não significativo, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 calculado por teste t de Student bicaudal não pareado.

5.6.2 Modelo de infecção viral aguda, 60º dia pós-infecção (tempo tardio)

5.6.2.1 Análise fenotípica (LCMV-Arm, 60º dia pós-infecção)

Em outros dois experimentos independentes, o baço de camundongos Cbx4 T KO e camundongos Cbx4$^{fl/fl}$ foi coletado no 60º dia pós-infecção por LCMV e os esplenócitos desses animais foram quantificados e preparados para análise do fenótipo por citometria de fluxo como mencionado no item anterior (Figura 29).

Foi detectado o aumento significativo na população de células T CD8⁺ totais de animais Cbx4 T KO em comparação aos animais do grupo controle (Cbx4$^{fl/fl}$), tanto em frequência quanto em número absoluto (Figura 29A, B). Já na população de células antígeno-específicas marcadas pelo tetrâmero fluorescente, foi observado aumento apenas no número total de células (Figura 29C, D). Essas observações sugerem que a deficiência em Cbx4 favoreça uma maior representação do compartimento de memória das células T CD8⁺ pós-infecção viral aguda. A análise do fenótipo das células antígeno-específicas mostrou resultados que dão suporte aos achados nos modelos de silenciamento com shRNA (Figura 29E-G, I). As células T CD8⁺ antígeno-

específicas de camundongos Cbx4 T KO apresentaram queda na frequência e número total de células terminalmente efetoras (KLRG1^{+}CD127^{-}) e aumento no número total de células de memória (KLRG1^{-}CD127^{+}) (Figura 29F, G). Além disso, foi observado o aumento tanto na frequência quanto número total na população de células duplo positivas (KLRG1^{+}CD127^{+}) e a diminuição na frequência da população de células duplo negativas (KLRG1^{-}CD127^{-}) (Figura 29F, G). Concordantemente, foi observado o aumento significativo na expressão da molécula associada ao fenótipo de memória CD127 (Figura 29I), apesar de não acompanhado da queda no nível de expressão de KLRG1 (Figura 29H). Somado a isso, houve também a diminuição do nível de expressão da molécula associada ao fenótipo de memória efetora CXCR3 (Figura 29J).

Em conjunto, estes resultados indicam que embora não tenha sido observado um aumento da população de memória na fase aguda da infecção dos animais Cbx4 T KO por LCMV (dia 8 pós-infecção), em contraste com o modelo de transferência adotiva e silenciamento, na fase de tardia (60 dias pós-infecção) foram observados diversos parâmetros que suportam a expansão do compartimento T CD8^{+} de memória, incluindo o aumento de células precursoras de memória (KLRG1^{-}CD127^{+}) e da população duplo positiva (KLRG1^{+}CD127^{+}).

Novamente em concordância com os resultados anteriores, foi observada a queda significativa do nível de expressão do fator de transcrição T-bet na subpopulação KLRG1^{+} e a tendência de queda na subpopulação KLRG1^{-} em células T CD8^{+} LCMV-específicas de animais Cbx4 T KO em comparação as células dos animais do grupo controle (Figura 29K, O). Além disso, nas células T CD8^{+} LCMV-específicas de animais Cbx4 T KO os níveis do fator de transcrição associado com o fenótipo de memória Eomes foram encontrados significativamente aumentados em ambas as subpopulações (Figura 29L, P). Em reflexo a essas alterações, foi observada menor razão T-bet/Eomes em ambas as subpopulações KLRG1^{+} e KLRG1^{-} (Figura 29M, Q). Em discordância com esses resultados, o nível de expressão do fator de transcrição associado ao fenótipo de memória Tcf-1 foi menor na subpopulação KLRG1^{-} de células T CD8^{+} de animais Cbx4 T KO em comparação ao grupo controle (Figura 29N, R). Visto que a expressão de *Tcf7* (gene que codifica Tcf-1) é reprimida por PRC2 (GRAY et al., 2017; KAKARADOV et al., 2017) e que foi observada a deposição de H2AK119ub (marca de PRC1) no sítio de iniciação de transcrição desse

gene (descrito no tópico **5.10.2**), é plausível supor que a deleção de *Cbx4* durante as etapas de desenvolvimento de células T nos animais Cbx4 T KO possa determinar a expressão compensatória de outras proteínas Cbx que, por sua vez, contribuem de forma aberrante para a repressão de *Tcf7*.

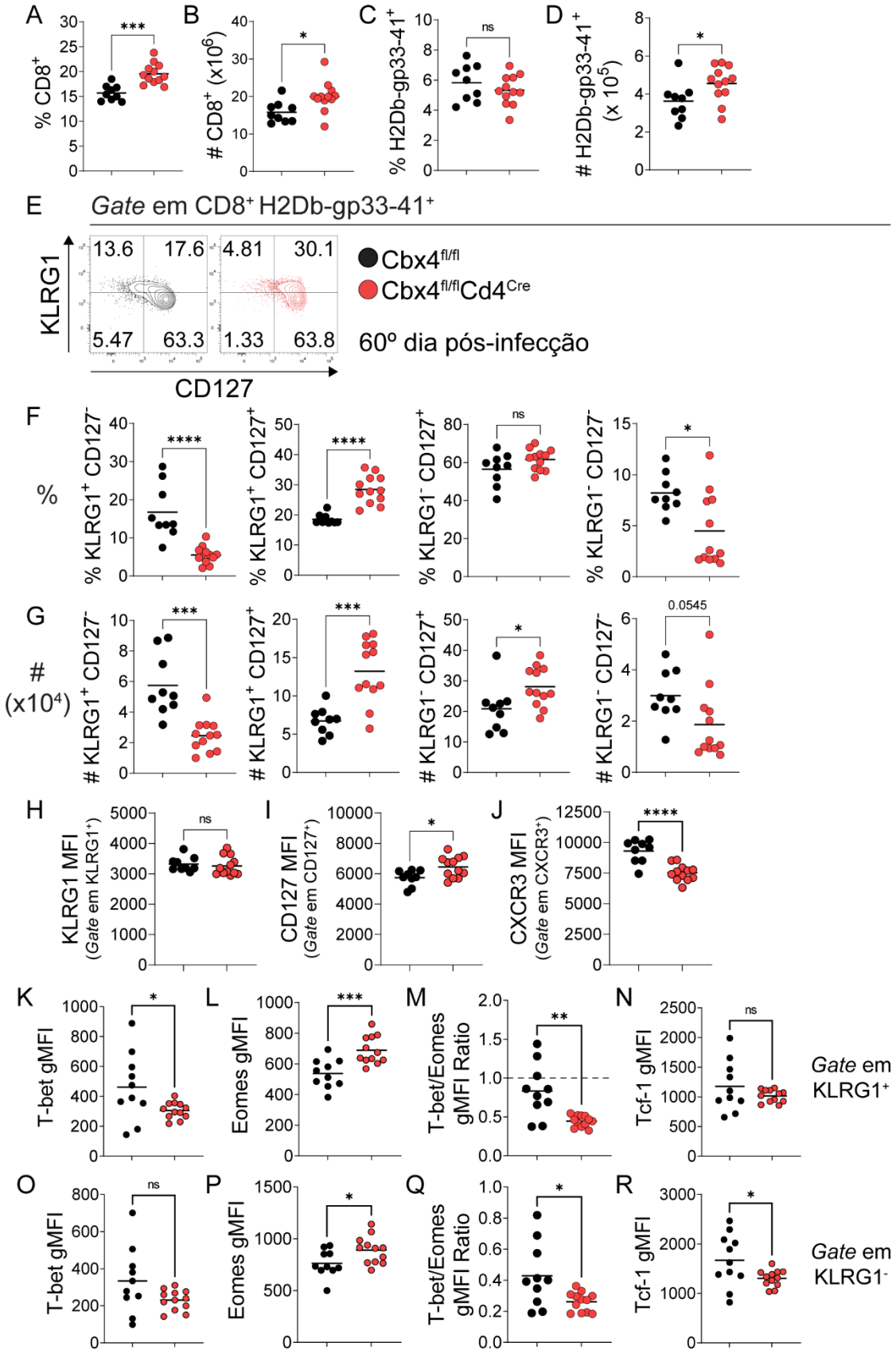


Figura 29. Análise fenotípica de células T CD8⁺ de animais Cbx4 T KO diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV em fase tardia da resposta (60º dia pós-infecção). Os esplenócitos de animais do grupo controle ("Cbx4$^{fl/fl}$", em preto) e animais Cbx4 T KO ("Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre}", em vermelho) foram analisados por citometria de fluxo no 60º dia pós-infecção. (**A**) Frequência e (**B**) número total de células T CD8⁺ e de (**C**, **D**) células T CD8⁺ LCMV-específicas marcadas com molécula

de tetrâmero. (**E**) *Contour plot* representativo da *gate* utilizada para a definição das subpopulações de células T CD8⁺ efetoras na análise fenotípica. (**F**) Frequência e (**G**) número total, em milhões, das subpopulações de células T CD8⁺ efetoras, baseadas na expressão das moléculas KLRG1 e CD127. (**H-J**) Níveis de expressão, quantificados por MFI, das moléculas (**H**) KLRG1, (**I**) CD127 e (**J**) CXCR3 em células T CD8⁺ LCMV-específicas de animais do grupo controle e Cbx4 T KO. Níveis de expressão, quantificados por gMFI, dos fatores de transcrição (**K**, **O**) T-bet, (**L**, **P**) Eomes e (**N**, **R**) Tcf-1 ou (**M**, **Q**) a razão dos valores de nível de expressão em gMFI de T-bet e Eomes em células T CD8⁺ LCMV-específicas nas subpopulações KLRG1⁺ e KLRG1⁻. Dados da compilação de dois experimentos independentes (n ≥ 5 em cada experimento). Cada círculo representa um animal em um dos experimentos, barra representa o valor de média do grupo. ns = não significativo, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 calculado por teste t de Student bicaudal não pareado.

5.6.2.2 Análise funcional (LCMV-Arm, 60º dia pós-infecção)

A análise funcional de células T CD8⁺ LCMV-específicas de animais Cbx4 T KO no tempo tardio (60º dia pós-infecção) foi feito como descrito anteriormente (5.6.1.2). Em dois experimentos independentes compilados (Figura 30), não foram encontradas diferenças na frequência de células produtoras de citocinas pro-inflamatórias IFN-γ e/ou TNF (Figura 30. A-D). Também não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de produção de cada citocina ou na produção de Granzima B (Figura 30E-G).

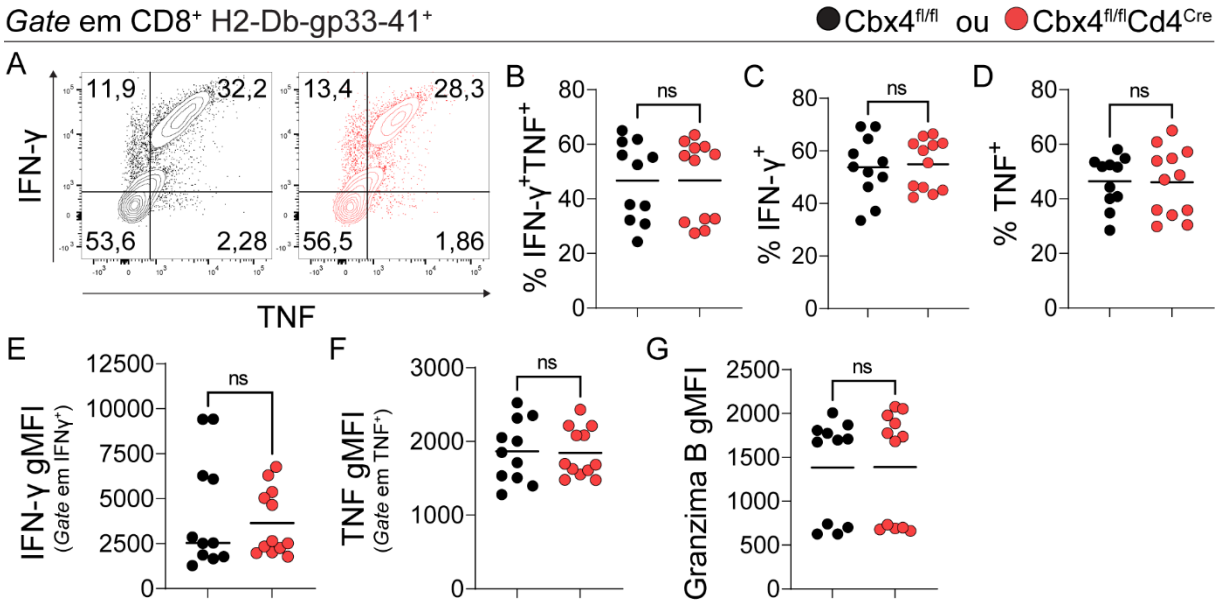


Figura 30. Análise funcional de células T CD8⁺ de animais Cbx4 T KO diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV em fase tardia da resposta (60º dia pós-infecção). Os esplenócitos de animais do grupo controle ("Cbx4$^{fl/fl}$", em preto) e animais Cbx4 T KO ("Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre}", em vermelho) foram isolados no 60º dia pós-infecção e reestimulados *ex vivo* com o peptídeo recombinante gp33-41 (0,2 µg/mL), na presença de Brefeldina A, por quatro horas. Em seguida, as células foram analisadas por citometria de fluxo. (A) *Contour plot* representativo da *gate* utilizada para a definição das subpopulações de células T CD8⁺ na análise funcional. (B-D) Frequência de células T CD8⁺ antígeno-específicas produtoras de IFN-γ e/ou TNF. (E-G) Níveis de expressão das citocinas pró-inflamatórias IFN-γ e TNF, e Granzima B em células T CD8⁺ antígeno-específicas. Dados da compilação de dois experimentos independentes (n ≥ 5 em cada experimento). Cada círculo representa um animal em um dos experimentos, barra representa o valor de média do grupo. ns = não significativo, calculado por teste t de Student bicaudal não pareado.

5.7 Análise da diferenciação de células T CD8$^+$ policlonais de camundongos Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre} (Cbx4 T KO) em resposta secundária a *Listeria monocytogenes*-GP33

Seguindo os indicativos de que a deficiência em Cbx4 leva a um desvio na diferenciação de células T CD8$^+$ para um favorecimento do fenótipo e perfil transcricional associado a células de memória, foi investigado o impacto da ausência de Cbx4 para a resposta secundária de células T CD8$^+$ geradas em uma resposta viral aguda (Figura 31). Grupos de animais Cbx4 T KO e do grupo controle Cbx4$^{fl/fl}$ foram infectados por LCMV-Arm, como apresentado no item acima, porém no 60º dia pós-infecção os animais foram desafiados com uma linhagem transgênica da bactéria *Listeria monocytogenes* expressando o epítopo imunodominante da glicoproteína específica do LCMV gp33 (*Listeria monocytogenes*-GP33) e, 4 dias após o desafio, os animais foram eutanasiados para a análise final. Dessa maneira, o desafio com *L. monocytogenes*-GP33 leva à reativação da população antígeno-específica gerada na resposta aguda viral primária, originando uma resposta secundária.

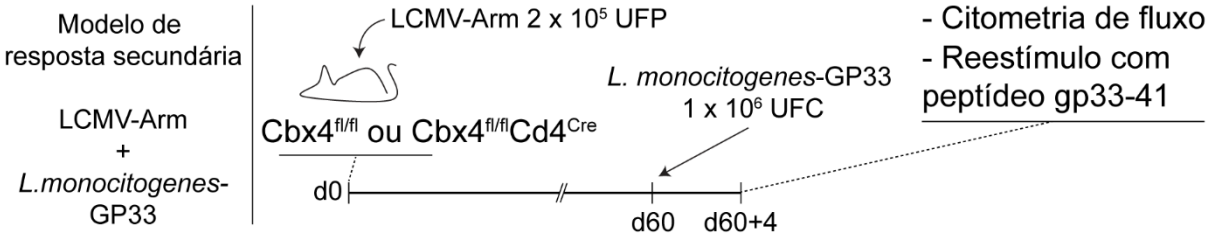


Figura 31. Desenho experimental para a análise da diferenciação de células T CD8$^+$ policlonais de camundongos Cbx4$^{fl/fl}$ e Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre} (Cbx4 T KO) em resposta secundária a *Listeria monocytogenes*-GP33. Animais da linhagem Cbx4$^{fl/fl}$, usados como grupo controle, e da linhagem Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre}, deficientes em Cbx4 em modelo de *nocaute* condicional foram infectados com LCMV-Armstrong (LCMV-Arm) no inóculo de 2 x 10^5 UFP. No 60º pós-infecção por LCMV, os animais foram re-desafiados para a indução de uma resposta secundária pela infecção com a cepa bacteriana *Listeria monocytogenes*-GP33 (1 x 10^6 UFC), que expressa o epítopo da glicoproteína gp33 do LCMV. No 4º dia pós-infecção por *L. monocitogenes*-GP33, os esplenócitos dos animais infectados foram isolados e analisados por citometria de fluxo para investigação do fenótipo ou reestimulados *ex vivo* com peptídeo gp33-41, antígeno específico do LCMV, para investigação da funcionalidade das células.

5.7.1 Análise fenotípica (*L. monocytogenes*-GP33, 4º dia pós-infecção)

A análise do compartimento de células T CD8$^+$ nos animais revelou nenhuma alteração no número total de células T CD8$^+$ ou de células antígeno-específicas (Figura 32A-D). A análise do fenótipo de células antígeno específicas mostrou que as células em resposta secundária dos animais Cbx4 T KO reproduziram parcialmente o fenótipo observado nas células T CD8$^+$ em resposta viral aguda primária, no tempo

tardio (60º dia pós-infecção) (Figura 32E-G). Foi observada a tendência na diminuição em frequência e número total da população de células efetoras de vida curta ($KLRG1^{+}CD127^{-}$) e uma fraca tendência de aumento na frequência de células precursoras de memória ($KLRG1^{-}CD127^{+}$). Foi observado também um aumento significativo na frequência e número total da população de células duplo positivas ($KLRG1^{+}CD127^{+}$) e diminuição da população de células duplo negativas ($KLRG1^{-}CD127^{-}$).

Esse aumento na população de células T $CD8^{+}$ $KLRG1^{+}CD127^{+}$ se relaciona positivamente com a informação citada acima, demonstrada em outros trabalhos, de que consecutivas respostas agudas originam, principalmente, células T $CD8^{+}$ de memória efetora, que podem ser duplo positivas para KLRG1 e CD127. Considerando a hipótese de que a deficiência de Cbx4 favorece a geração de um compartimento de memória e regula positivamente proteínas associadas a longevidade e sobrevivência (como CD127, Slamf6 e CD62L), este resultado indica que células T $CD8^{+}$ de animais Cbx4 T KO apresentam uma maior frequência da população de células T $CD8^{+}$ de memória efetora de longa vida.

A avaliação dos níveis de expressão das moléculas associadas ao fenótipo efetor e de memória mostrou resultado semelhante ao encontrado nos experimentos anteriores, com queda significativa da expressão de KLRG1 e aumento significativo da expressão de CD127 nas células T $CD8^{+}$ de animais Cbx4 T KO em comparação ao controle, enquanto não houve alteração para o receptor CXCR3 (Figura 32H-J).

A análise dos níveis de expressão de fatores de transcrição seguiu o mesmo padrão dos resultados encontrados nos experimentos investigando a resposta primária de células T $CD8^{+}$ em modelo de infecção viral aguda. Mais uma vez, foram detectados menores níveis de expressão do fator de transcrição T-bet em células T $CD8^{+}$ antígeno-específicas de animais Cbx4 T KO, tanto na subpopulação $KLRG1^{+}$ quanto na subpopulação $KLRG1^{-}$ (Figura 32K, O). Apesar de não serem vista diferenças nos níveis de expressão de Eomes (Figura 32L, P), a razão T-bet/Eomes foi menor nas células T $CD8^{+}$ antígeno-específicas de animais Cbx4 T KO (Figura 32M, Q). Quanto a expressão do fator de transcrição Tcf-1, não foi observada diferença entre os níveis encontrados nas células de animais do grupo controle ou de animais Cbx4 T KO (Figura 32N, R).

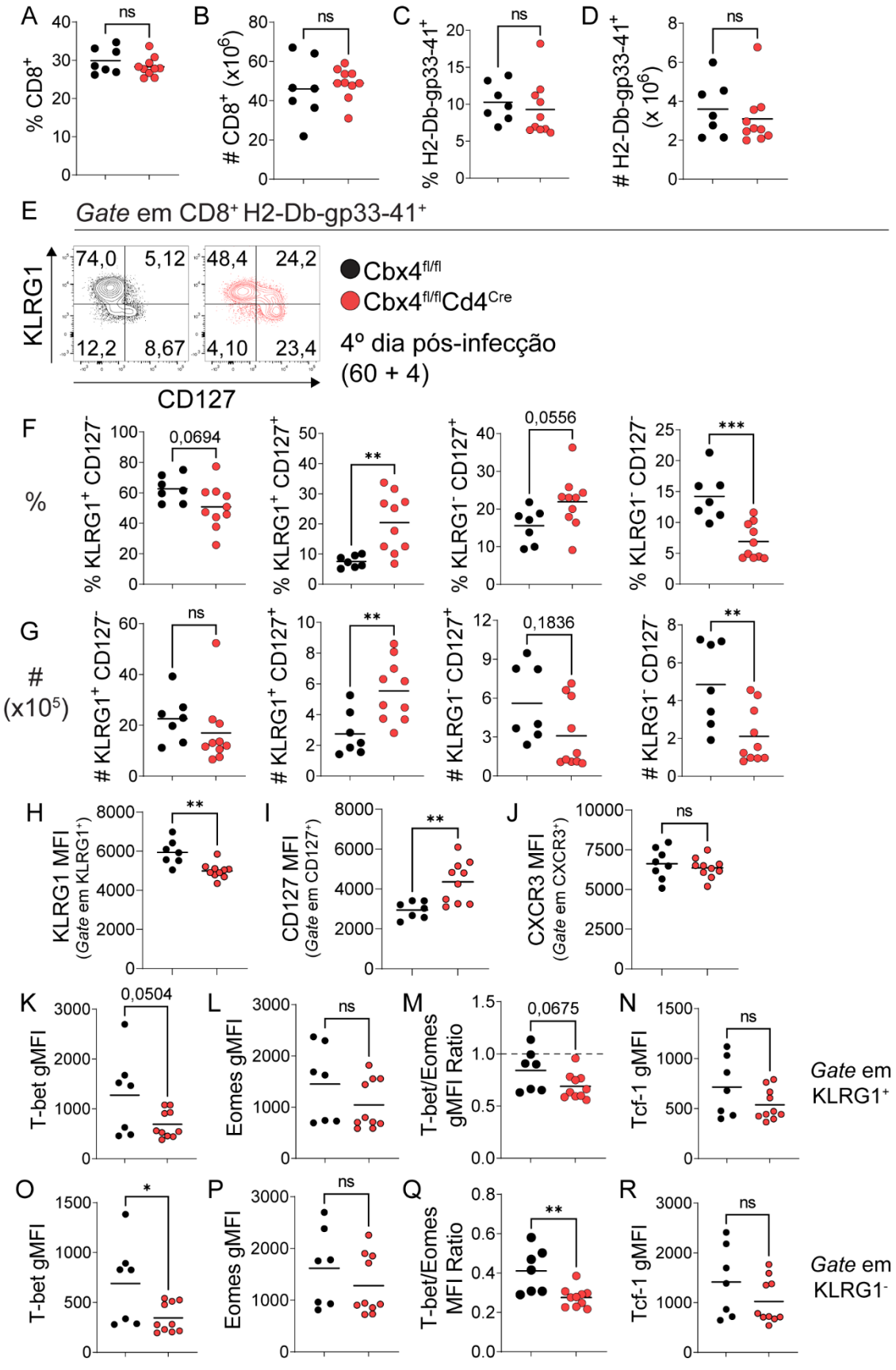

A
% CD8+
ns
B
CD8+ (x10^6)
ns
C
% H2-Db-gp33-41+
ns
D
H2-Db-gp33-41+ (x 10^6)
ns
E
Gate em CD8+ H2-Db-gp33-41+
KLRG1
CD127
74,0
5,12
12,2
8,67
48,4
24,2
4,10
23,4
Cbx4fl/fl
Cbx4fl/flCd4Cre
4º dia pós-infecção
(60 + 4)
F
%
% KLRG1+ CD127-
0,0694
% KLRG1+ CD127+
**
% KLRG1- CD127+
0,0556
% KLRG1- CD127-
***
G
(x10^5)
KLRG1+ CD127-
ns
KLRG1+ CD127+
**
KLRG1- CD127+
0,1836
KLRG1- CD127-
**
H
KLRG1 MFI (Gate em KLRG1+)
**
I
CD127 MFI (Gate em CD127+)
**
J
CXCR3 MFI (Gate em CXCR3+)
ns
K
T-bet gMFI
0,0504
L
Eomes gMFI
ns
M
T-bet/Eomes gMFI Ratio
0,0675
N
Tcf-1 gMFI
ns
Gate em KLRG1+
O
T-bet gMFI
*
P
Eomes gMFI
ns
Q
T-bet/Eomes MFI Ratio
**
R
Tcf-1 gMFI
ns
Gate em KLRG1-

Figura 32. Análise fenotípica de células T CD8$^+$ de animais Cbx4 T KO diferenciadas em resposta secundária a *Listeria monocytogenes*-GP33. Os esplenócitos de animais do grupo controle ("Cbx4$^{fl/fl}$", em preto) e animais Cbx4 T KO ("Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre}", em vermelho) foram analisados por citometria de fluxo no 4º dia pós-infecção por *L. monocytogenes*-GP33 (1 x 10^6 UFC). (**A**) Frequência e (**B**) número total de células T CD8$^+$ e de (**C**, **D**) células T CD8$^+$ LCMV-específicas marcadas com molécula de tetrâmero. (**E**) *Contour plot* representativo da *gate* utilizada para a definição das subpopulações de células T CD8$^+$ efetoras na análise fenotípica. (**F**) Frequência e (**G**) número total, em milhões, das subpopulações de células T CD8$^+$ efetoras, baseadas na expressão das moléculas KLRG1 e CD127. (**H-J**) Níveis de expressão, quantificados por MFI, das moléculas (**H**) KLRG1, (**I**) CD127 e (**J**) CXCR3 em células T CD8$^+$ LCMV-específicas de animais do grupo controle e Cbx4 T KO. Níveis de expressão, quantificados por gMFI, dos fatores de transcrição (**K**, **O**) T-bet, (**L**, **P**) Eomes e (**N**, **R**) Tcf-1 ou (**M**, **Q**) a razão dos valores de nível de expressão em gMFI de T-bet e Eomes em células T CD8$^+$ LCMV-específicas nas subpopulações KLRG1$^+$ e KLRG1$^-$. Dados da compilação de dois experimentos independentes (n ≥ 3 em cada experimento). Cada círculo representa um animal em um dos experimentos, barra representa o valor de média do grupo. ns = não significativo, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 calculado por teste t de Student bicaudal não pareado.

5.7.2 Análise funcional (*L. monocytogenes*-GP33, 4º dia pós-infecção)

A análise funcional das células T CD8$^+$ antígeno-específicas foi realizada através do reestímulo *ex vivo* de esplenócitos com peptídeo recombinante gp33-41, na presença de Brefeldina A, como realizado nas análises funcionais anteriores. Em dois experimentos independentes, os resultados de citometria de fluxo revelaram nenhuma alteração significativa na frequência das populações de células produtoras de IFN-γ e/ou TNF (Figura 33A-D). Da mesma maneira, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de produção de cada citocina ou na produção de Granzima B (Figura 33E-H). Estes dados, em conjunto com as análises do 60º dia pós-infecção sugerem que, embora a deficiência em Cbx4 comprometa a funcionalidade de células T CD8$^+$ de animais Cbx4 T KO na fase aguda de infecção viral, a função efetora destas células não apresenta comprometimento na fase de memória e durante a resposta secundária.

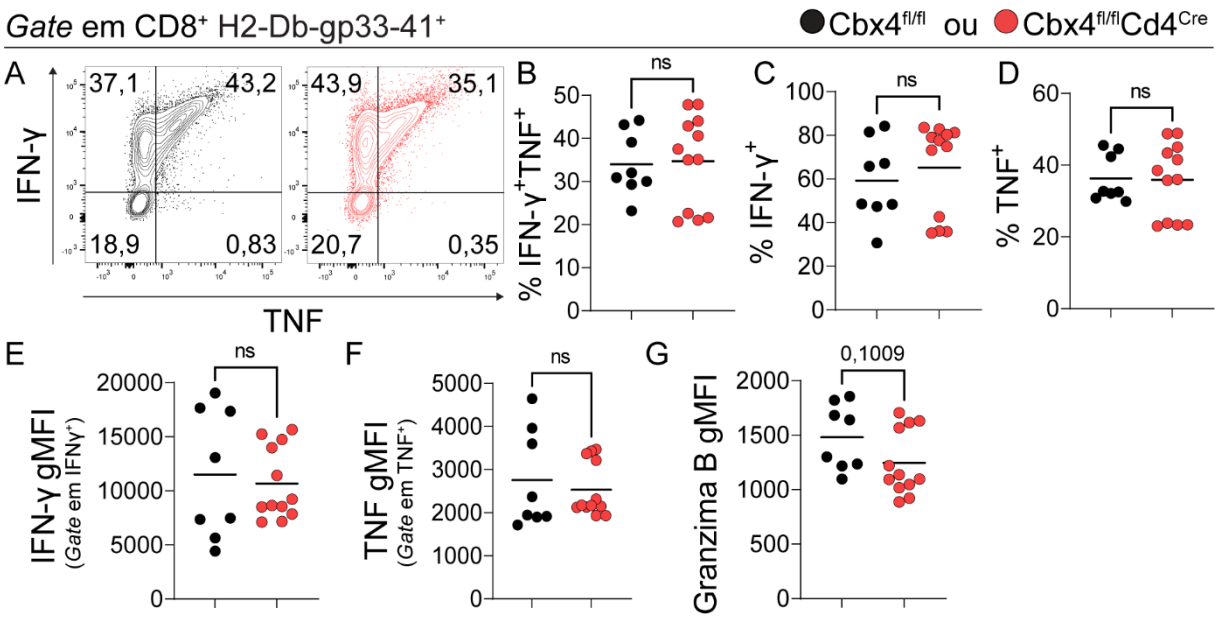


Figura 33. Análise funcional de células T CD8⁺ de animais Cbx4 T KO diferenciadas em resposta secundária a *Listeria monocytogenes*-GP33. Os esplenócitos de animais do grupo controle ("Cbx4$^{fl/fl}$", em preto) e animais Cbx4 T KO ("Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre}", em vermelho) foram isolados no 4º dia pós-infecção por *L. monocytogenes*-GP33 e reestimulados *ex vivo* com o peptídeo recombinante gp33-41 (0,2 µg/mL), na presença de Brefeldina A, por quatro horas. Em seguida, as células foram analisadas por citometria de fluxo. (**A**) *Contour plot* representativo da *gate* utilizada para a definição das subpopulações de células T CD8⁺ na análise funcional. (**B-D**) Frequência de células T CD8⁺ antígeno-específicas produtoras de IFN-γ e/ou TNF. (**E-G**) Níveis de expressão das citocinas pró-inflamatórias IFN-γ e TNF, e Granzima B em células T CD antígeno-específicas. Dados da compilação de dois experimentos independentes (n ≥ 3 em cada experimento). Cada círculo representa um animal em um dos experimentos, barra representa o valor de média do grupo. ns = não significativo, calculado por teste t de Student bicaudal não pareado.

5.8 Análise da diferenciação e função de células T CD8⁺ superexpressando Cbx4 cultivadas *in vitro* em condições polarizantes para o fenótipo tipo memória

O estudo do papel do modulador epigenético Cbx4 na diferenciação de células T CD8⁺ através de abordagens de silenciamento gênico (modelo de silenciamento por shRNA) e deleção genômica (modelo utilizando camundongos da linhagem Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre}) mostrou que a deficiência da proteína leva ao prejuízo na geração de células de fenótipo efetor e o concomitante aumento da expressão de genes e proteínas associados ao fenótipo de memória.

Para testar diretamente a hipótese de que Cbx4 é requerido para a determinação do perfil efetor, foram realizados experimentos de superexpressão através da transdução de vetores retrovirais contendo a sequência codificante para o gene Cbx4 murino em células T CD8⁺ de animais controle (Cbx4$^{fl/fl}$) ou de animais Cbx4 T KO, repondo a expressão desta proteína (Figura 16C). Além disso, é conhecido que a proteína Cbx4 possui múltiplos domínios funcionais: (i) o cromodomínio, capaz de reconhecer e se ligar às marcas H3K27me3, depositadas

por PRC2, e recrutar PRC1 para esses sítios genômicos e; (ii) dois motivos de interação com SUMO (SIM, do inglês "*SUMO interacting motifs*"), que permitem que Cbx4 possa atuar como E3 SUMO ligase, catalisando a transferência de SUMO para outras proteínas, ou interagindo com proteínas SUMOiladas. Dessa maneira, Cbx4 pode atuar em um mecanismo onde participa como subunidade "leitora" do PRC1 com papel de recrutamento do complexo ou pode atuar por mecanismos independentes da função repressora de PRC1, através da participação em vias de sinalização mediadas por SUMOilação. Portanto, foram também incorporadas ao desenho experimental as condições de superexpressão de isoformas mutantes de Cbx4 funcionalmente inativadas para cada um desses domínios (ΔChromo e ΔSIM1-2) (Figura 16C). O ensaio de superexpressão foi realizado através do cultivo *in vitro* de células T CD8^{+} P14 oriundas de animais Cbx4$^{fl/fl}$ ou Cbx4 T KO em protocolo de polarização para o fenótipo de memória visando evidenciar o possível efeito de promoção do fenótipo efetor. As células cultivadas foram quantificadas diariamente, como mencionado anteriormente, processadas por FACS no 4º dia de cultivo *in vitro* para o isolamento e recultivo de células T CD8^{+} transduzidas (GFP^{+}) e, no 14º dia de cultivo, foram analisadas quanto ao seu fenótipo e funcionalidade por citometria de fluxo ou reservadas para posterior ensaios de RT-qPCR (Figura 34).

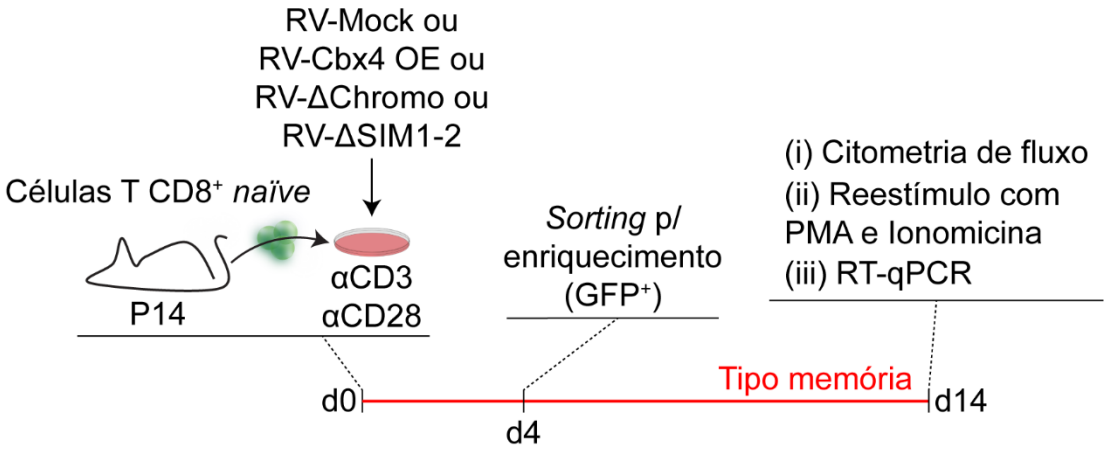


Figura 34. Desenho experimental para a análise de células T CD8^{+} murinas superexpressando diferentes construções de Cbx4 polarizadas *in vitro* para o fenótipo tipo memória. Células T CD8^{+} P14 *naïve* foram isoladas de camundongos P14, ativadas e transduzidas *in vitro* com vetor retroviral vazio ("Mock") ou vetores retrovirais expressando diferentes construções de *Cbx4*, incluindo Cbx4 selvagem (Cbx4 OE) ou duas formas mutantes de Cbx4 ("ΔChromo", "ΔSIM1-2"). As células foram polarizadas para um fenótipo tipo memória (14 dias de cultivo, ver figura 11). A cultura foi enriquecida para a presença de apenas células transduzidas através do isolamento de células GFP^{+} por FACS seguido do recultivo das mesmas. Ao fim do tempo de cultivo, as células foram analisadas: (i) quanto ao seu fenótipo por citometria de fluxo; (ii) sua funcionalidade, através da quantificação de produção de citocinas por citometria de fluxo após reestimulo com PMA (10 nM) e Ionomicina (1 μM) ou; (iii) sua expressão gênica através de RT-qPCR.

5.8.1 Análise da expansão de células T CD8⁺ superexpressando Cbx4 cultivadas *in vitro* em condições polarizantes para o fenótipo tipo memória

A quantificação diária em câmara de Neubauer das células cultivadas revelou que não houve diferenças na expansão das células T CD8⁺ em qualquer comparação entre as diferentes condições até o sexto dia de cultivo (Figura 35). No entanto, do sexto dia até o último, as células T CD8⁺ superexpressando o mutante funcional de Cbx4 ΔChromo, em ambos os genótipos analisados, apresentou uma severa e significativa queda no seu número total (Figura 35A, B). A queda nos números totais de células foi ainda mais acentuada na condição ΔChromo no genótipo P14 Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre} (Figura 35B). Em contrapartida, a superexpressão do mutante funcional de Cbx4 ΔSIM1-2 determinou uma maior expansão das células a partir do 6º dia de cultivo em comparação às outras condições (Figura 35A, B). No entanto, essa maior expansão foi significativa apenas no genótipo P14 Cbx4$^{fl/fl}$ (Figura 35. A). A superexpressão de Cbx4 não provocou diferença significativa na expansão das células cultivadas em comparação com as células controle.

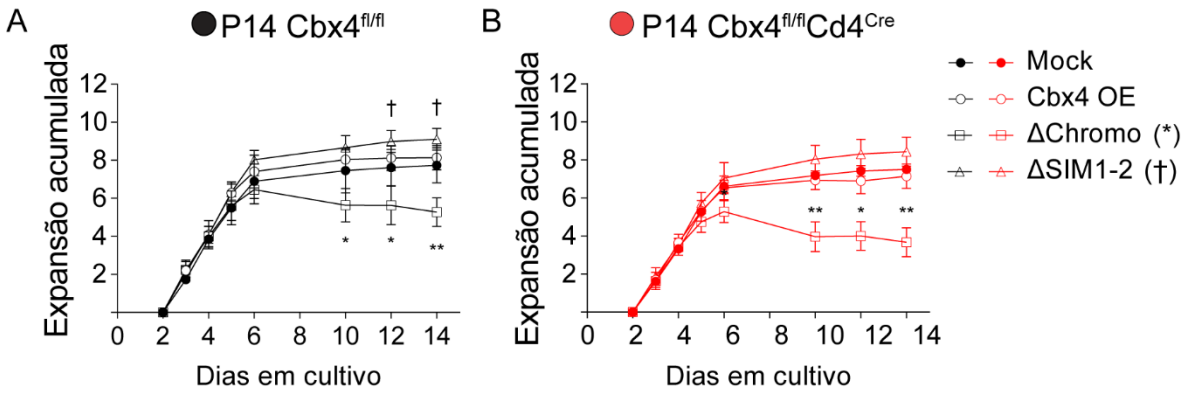


Figura 35. Análise da expansão acumulada de células T CD8⁺ superexpressando diferentes construções de Cbx4 cultivadas *in vitro* em condições polarizantes para o fenótipo tipo memória. Células T CD8⁺ de animas P14 Cbx4$^{fl/fl}$ (em preto) ou P14 Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre} (em vermelho) foram ativadas e transduzidas *in vitro* com vetor para a superexpressão de Cbx4 ("Cbx4 OE"), formas mutantes de Cbx4 ("ΔChromo", "ΔSIM1-2") ou vetor vazio ("Mock") foram polarizadas *in vitro* para o fenótipo tipo memória e quantificadas a cada recultivo por método de exclusão com corante Azul de Trypan 0,1% (v/v). A expansão acumulada das células de genótipo (**A**) P14 Cbx4$^{fl/fl}$ ou (**B**) P14 Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre} foi visualizada através do desenho de uma curva de valores obtidos na fórmula $X^d = X^{d-1} + log_2(\frac{N^d}{N^{d-1}})$; X^d = expansão encontrada em um dia; X^{d-1} = expansão encontrada no dia anterior; N^d = número total de células em cultivo quantificados em um dia; N^{d-1} = número total de células em cultivo quantificados no dia anterior.*, diferença estatisticamente significativa entre condição Mock e Δchromo. †, diferença estatisticamente significativa entre condição Mock e ΔSIM1-2. † ou * $p < 0,05$, **$p < 0,01$, calculada por teste ANOVA com dois fatores corrigido com teste Dunnett de múltiplas comparações.

5.8.2 Análise fenotípica de células T CD8$^+$ superexpressando Cbx4 cultivadas *in vitro* em condições polarizantes para o fenótipo tipo memória

Seguindo a linha do que já havia sido observado nos experimentos anteriores, quando comparadas com células T CD8$^+$ P14 de animais do grupo controle, células T CD8$^+$ P14 de animais Cbx4 T KO apresentaram maior frequência da população caracterizada pela expressão de ambas as moléculas associadas ao fenótipo de memória CD127 e CD62L, como visto na condição controle do experimento de transdução (Mock) (Figura 36A, B). A superexpressão de Cbx4 (Cbx4 OE) provocou uma significativa diminuição na frequência da população de memória, tanto nas células de animais Cbx4$^{fl/fl}$ quanto na condição em que há a deleção genômica de Cbx4, indicando o papel da proteína de indução do fenótipo efetor (Figura 36A, B). Quando superexpressa a forma mutante de Cbx4 com a perda de função do cromodomínio (ΔChromo), foi notado a eliminação parcial do efeito de indução do fenótipo efetor observado quando Cbx4 é superexpressa em sua forma selvagem, novamente, em ambos os genótipos cultivados (Figura 36A, B). Por fim, a superexpressão da forma mutante de Cbx4 com perda de função de ambos os SIM (ΔSIM1-2) provocou não somente a completa perda do efeito visto na superexpressão de Cbx4 na forma selvagem, como provocou o aumento da frequência da população de memória, de forma significativa nas células T CD8$^+$ selvagens (Figura 36A, B). Apesar de não provocar um aumento significativo, a superexpressão de Cbx4 ΔSIM1-2 em células T CD8$^+$ de animais Cbx4 T KO levou a um aumento da frequência da população de células de memória a níveis equivalentes à condição controle (Mock). Apesar de não igualmente significativo em todas as comparações, esse padrão de variação entre as diferentes modalidades de superexpressão de Cbx4 e a condição controle foi observado também quando analisada a expressão isolada de cada molécula associada ao fenótipo de memória CD62L e CD127, tanto a nível protéico (Figura 36C, D), quanto ao nível transcricional (Figura 36G, H).

Foi também analisada a expressão de moléculas de superfície associados ao fenótipo efetor, CD25, ou ao fenótipo de memória efetora, CXCR3 (Figura 36E, F). A análise dos níveis de expressão mostrou exatamente o padrão oposto ao observado nos níveis de expressão de proteínas associadas ao fenótipo de memória, com aumento da expressão de CD25 e CXCR3 quando é superexpressa a forma selvagem de Cbx4, seguido da perda parcial do efeito na superexpressão de Cbx4 ΔChromo e

por fim reversão total do efeito de Cbx4 combinado a diminuição da expressão quando superexpressa a forma Cbx4 ΔSIM1-2. A quantificação dos níveis de expressão gênica por RT-qPCR do gene codificante para CD25, *Il2ra*, mostrou o mesmo padrão observado na análise de expressão proteica por citometria de fluxo (embora não com a mesma significância estatística), da mesma maneira que para as moléculas associadas ao fenótipo de memória (Figura 36I).

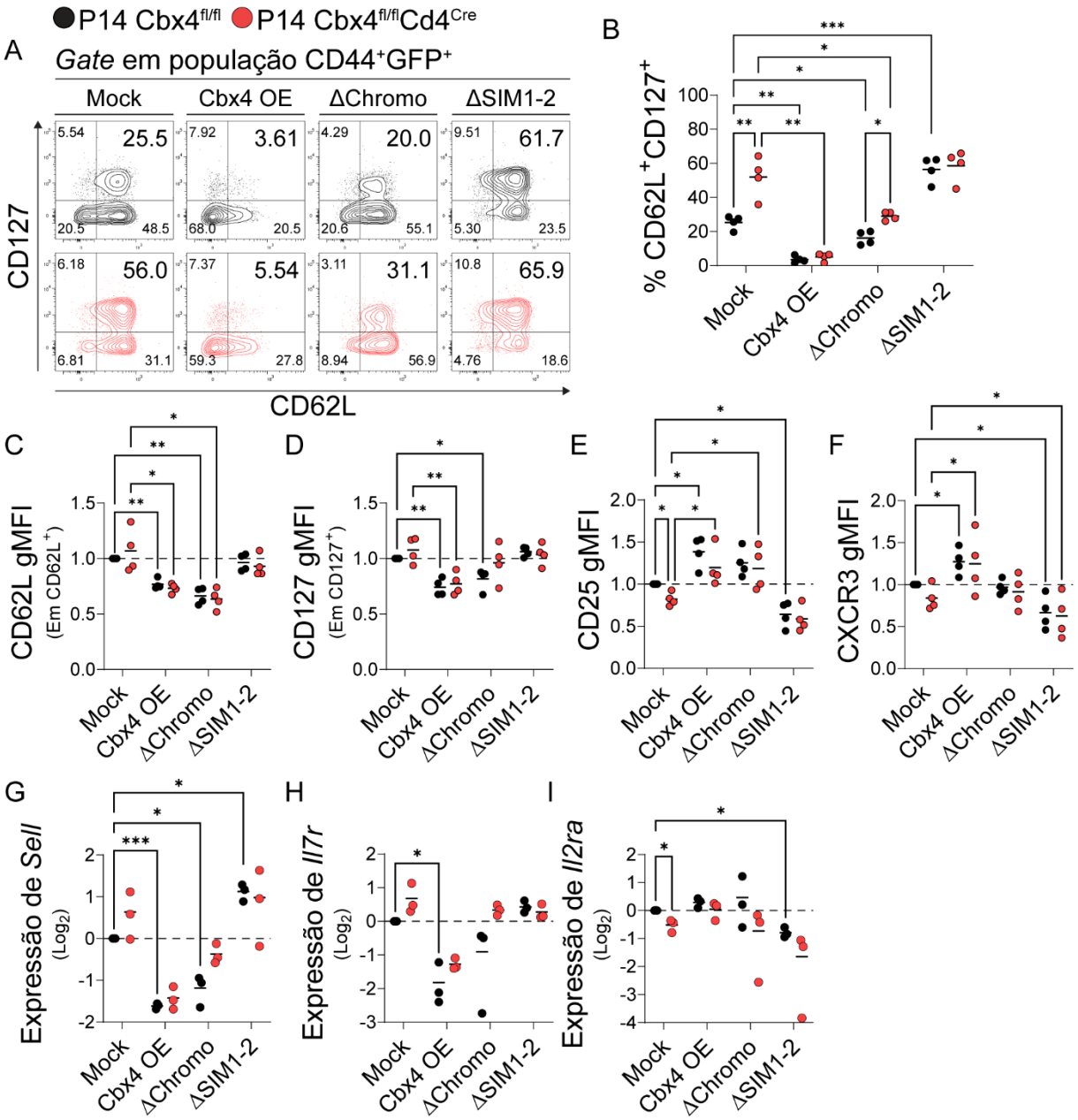


Figura 36. Análise fenotípica de células T CD8⁺ superexpressando diferentes construções de Cbx4 cultivadas *in vitro* em condições polarizantes para o fenótipo tipo memória. Células T CD8⁺ *naïve* de animais P14 Cbx4 T KO ("P14 Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre}", em vermelho) ou de animais do grupo controle ("P14 Cbx4$^{fl/fl}$", em preto) foram isoladas, ativadas e transduzidas *in vitro* e polarizadas para o fenótipo tipo memória. Ao fim do cultivo (14º dia), as células foram analisadas quanto ao seu fenótipo por citometria de fluxo. (**A**) *Contour plot* representativo da *gate* utilizada para a definição da população de fenótipo de memória. (**B**) Frequência da população CD62L⁺CD127⁺ em células CD44⁺GFP⁺ nas

diferentes condições analisadas. (**C-F**) Quantificação dos níveis de expressão calculados por gMFI das moléculas de superfície associadas ao fenótipo de memória e fenótipo efetor em células T $CD8^+$ transduzidas (GFP^+). A quantificação dos níveis de expressão foi normalizada em relação aos níveis encontrados na condição de transdução com "Mock", genótipo P14 $Cbx4^{fl/fl}$ dentro de cada experimento. (**G-I**) Quantificação dos níveis de expressão gênica por RT-qPCR de genes codificantes para as moléculas associadas ao fenótipo de memória (*Sell*, *Il7r*) ou fenótipo efetor (*Il2ra*). A quantificação do mRNA foi calculada pelo método de $2^{\Delta\Delta CT}$ e normalizada para os valores encontrados na condição controle ("P14 $Cbx4^{fl/fl}$, Mock"). Dados da compilação de pelo menos três experimentos independentes. Cada círculo representa um experimento, barra representa o valor de média do grupo. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 calculado por teste ANOVA com dois fatores sem correção de múltiplas comparações (teste de Fisher de menor diferença significativa).

5.8.3 Análise funcional de células T $CD8^+$ superexpressando Cbx4 cultivadas *in vitro* em condições polarizantes para o fenótipo tipo memória

As células T $CD8^+$ superexpressando Cbx4, ou mutantes funcionais de Cbx4, e polarizadas *in vitro* para o fenótipo de memória foram analisadas quanto a sua capacidade funcional através do reestímulo com PMA e Ionomicina no último de dia de cultivo (dia 14), como descrito anteriormente. Quando comparadas as diferentes condições, foi possível notar que a superexpressão de Cbx4 ("Cbx4 OE") provocou uma tendência de aumento na frequência das populações positivas para a produção de IFN-γ quando comparada com a condição controle ("Mock"), além de um aumento significativo para a citocina TNF nas comparações em células de animais Cbx4 T KO (Figura 37A-C). Foi possível observar também um aumento significativo na frequência de células produtoras de IL-2 quando comparadas a condição Mock e Cbx4 OE e na comparação de células T $CD8^+$ Mock de animais Cbx4 T KO com células T $CD8^+$ superexpressando Cbx4 ΔChromo (Figura 37C). Células T $CD8^+$ de animais Cbx4 T KO superexpressando Cbx4 ΔChromo também apresentaram menor frequência de células TNF^+ em comparação à condição de superexpressão de Cbx4 Δchromo em células T $CD8^+$ de animais $Cbx4^{fl/fl}$, o que pode sugerir que o favorecimento de mecanismos de Cbx4 independentes do cromodomínio pode levar a diminuição na produção de TNF (Figura 37. B). Quando superexpresso o mutante Cbx4 ΔSIM1-2, foi possível apenas observar uma tendência de aumento na frequência de células produtoras de IFN-γ, sem alterações perceptíveis na produção de outras citocinas (Figura 37A-C).

Quanto ao nível de expressão de cada citocina, é possível notar um padrão semelhante ao encontrado nos gráficos relacionados a frequência de populações, dando suporte às tendências de alteração mencionadas no parágrafo anterior (Figura 37D-F). Também foi mensurado o nível de expressão da proteína citotóxica Granzima

B (Figura 37G). Células T $CD8^+$ de animais Cbx4 T KO apresentaram uma produção ligeiramente maior de Granzima B em comparação com células T $CD8^+$ de animais $Cbx4^{fl/fl}$. De forma contrastante, quando comparadas células T $CD8^+$ Mock e Cbx4 OE, foi observado o padrão oposto ao visto para a produção de citocinas, com tendência de diminuição na produção de Granzima B. Células T $CD8^+$ de animais $Cbx4^{fl/fl}$ superexpressando Cbx4 ΔSIM1-2 também apresentaram a tendência de diminuição da produção de Granzima B, enquanto a superexpressão de Cbx4 ΔChromo em células T $CD8^+$ de animais Cbx4 T KO foi visto a tendência de aumento. Essas observações sugerem que a deficiência em Cbx4 promove a produção de Granzima B, enquanto a sua superexpressão (ou reposição) provoca a inibição da expressão dessa proteína.

A seguir, analisamos a capacidade de produção de múltiplas citocinas (polifuncionalidade) nas células T $CD8^+$ superexpressando diferentes construções de Cbx4 (Figura 37H). Foi observado que a superexpressão de Cbx4 ou de Cbx4 ΔSIM1-2 em células T $CD8^+$ de animais $Cbx4^{fl/fl}$ ou deficientes em Cbx4 ($Cbx4^{fl/fl}Cd4^{Cre}$) provocou a tendência de aumento na frequência de células polifuncionais (produtoras de 3 citocinas: IFN-γ, TNF e IL-2), quando comparadas com as condições controle (Mock) (Figura 37I). Em destaque, esse aumento foi significativo quando superexpresso a forma Cbx4 selvagem em células T $CD8^+$ de animais Cbx4 T KO (reposição da expressão de Cbx4). É possível observar também que há a tendência de perda na polifuncionalidade de células T $CD8^+$ deficientes em Cbx4 quando superexpressa a forma mutante de Cbx4 ΔChromo, em comparação a condição Cbx4 OE, indicando que o ganho na polifuncionalidade seria dependente do cromodomínio (Figura 37I).

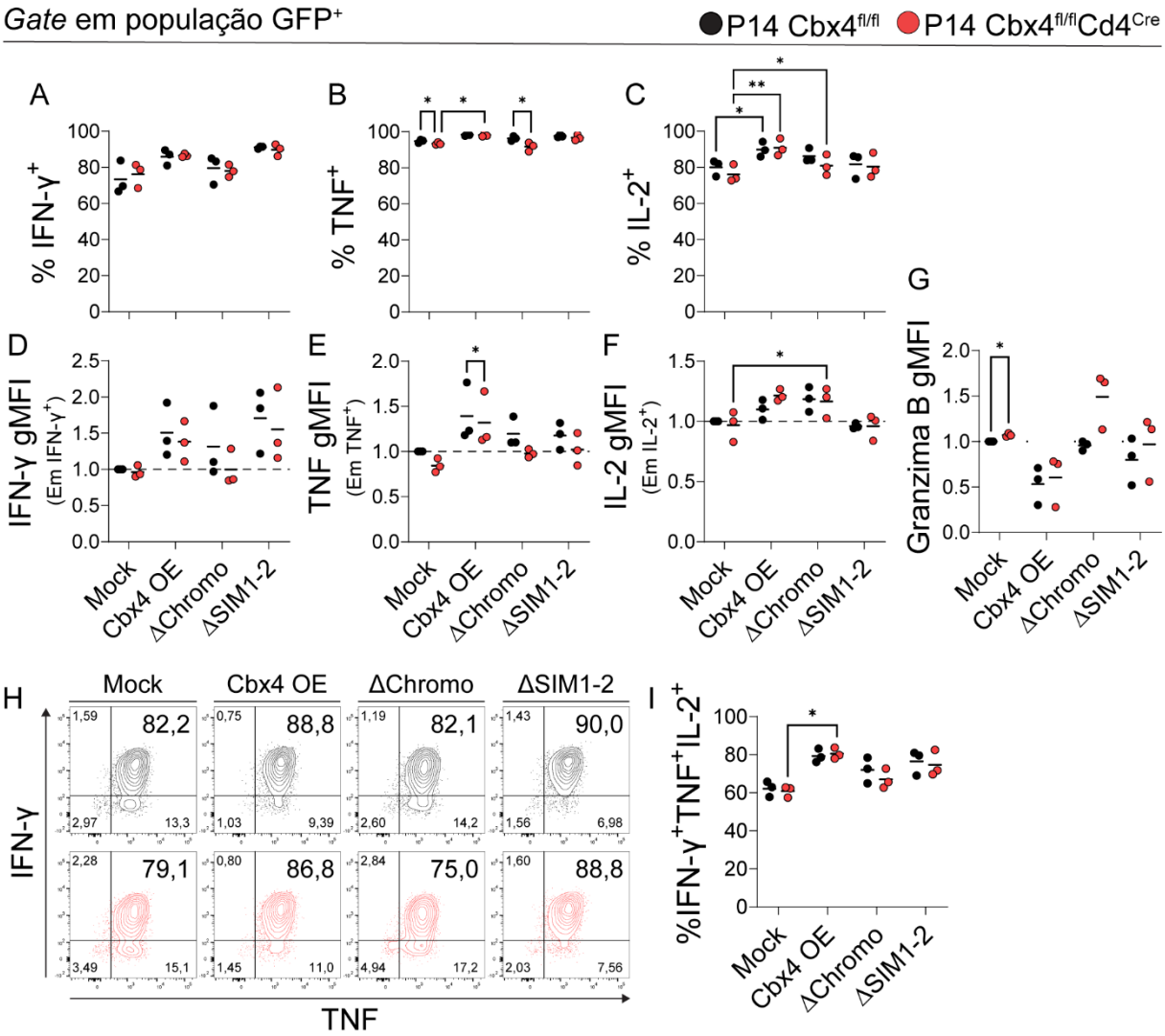


Figura 37. Análise da funcionalidade de células T CD8⁺ superexpressando Cbx4 cultivadas *in vitro* em condições polarizantes para o fenótipo tipo memória. Células T CD8⁺ *naïve* de animais P14 Cbx4 T KO ("P14 Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre}", em vermelho) ou de animais do grupo controle ("P14 Cbx4$^{fl/fl}$", em preto) foram isoladas, ativadas e transduzidas *in vitro* e polarizadas para o fenótipo tipo memória. Ao fim do cultivo (14º dia), as células foram analisadas quanto a sua funcionalidade após reestímulo com PMA (10 nM) e Ionomicina (1 µM) durante 4 horas na presença de Brefeldina A. (A-C) Frequência das populações de células T CD8⁺ transduzidas (GFP⁺) produtoras de IFN-γ, TNF ou IL-2. (D-G) Níveis de expressão de citocinas IFN-γ, TNF ou IL-2, ou da proteína citotóxica Granzima B calculados por gMFI em células T CD8⁺ transduzidas GFP⁺. A quantificação dos níveis de expressão foi normalizada em relação aos níveis encontrados na condição de transdução com "Mock", genótipo P14 Cbx4$^{fl/fl}$ dentro de cada experimento. (H) *Contour plot* representativo da *gate* utilizada para a definição da população duplo produtora de IFN-γ e TNF (IFN-γ⁺TNF⁺). (I) Frequência da população triplo produtora IFN-γ⁺TNF⁺IL-2⁺, definida como células IFN-γ⁺TNF⁺ marcadas positivamente para IL-2. Dados da compilação de três experimentos independentes. Cada círculo representa um experimento, barra representa o valor de média do grupo. *p < 0,05, **p < 0,01 calculado por teste ANOVA com dois fatores sem correção de múltiplas comparações (teste de Fisher de menor diferença significativa).

5.9 Análise da diferenciação de células T CD8⁺ superexpressando Cbx4 em modelo de infecção viral aguda por LCMV

Para avaliar o efeito da superexpressão de Cbx4 na diferenciação de células T CD8⁺ no curso de uma resposta imune em um modelo *in vivo*, utilizamos o mesmo

desenho experimental aplicado no experimento descrito no tópico **5.1** (Figura 9A). Dessa maneira, células T CD8$^+$ *naïve* foram isoladas, ativadas *in vitro*, transduzidas com vetores retrovirais carregando a sequência codificante de Cbx4, ou de seus mutantes funcionais, e em seguida transferidas adotivamente para animais que foram infectados por LCMV em modelo de infecção viral aguda (Figura 38). As células transferidas adotivamente foram analisadas por citometria de fluxo quanto ao seu fenótipo e funcionalidade no 8º dia pós-infecção, seguindo estratégia de *gate* similar à análise feita no modelo de transferência adotiva de células T CD8$^+$ P14 com deficiência em Cbx4 (ver Figura 9B).

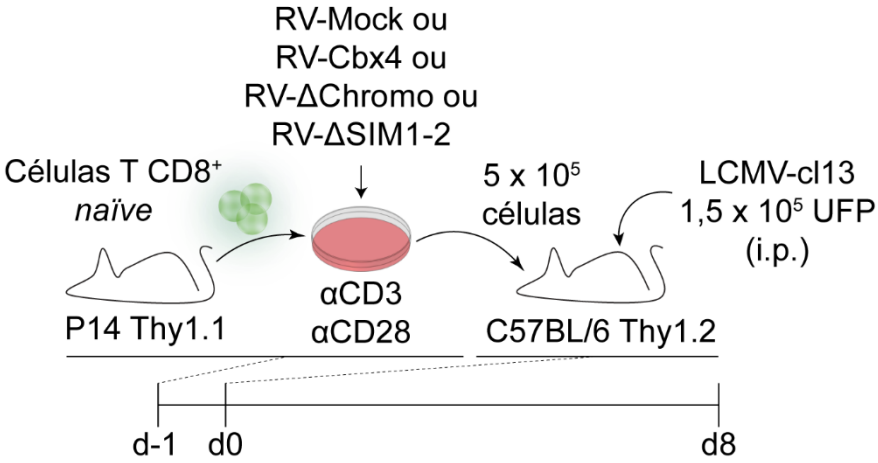


Figura 38. Desenho experimental para a análise de células T CD8$^+$ P14 superexpressando diferentes construções de Cbx4 diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV. Células T CD8$^+$ *naïve* de camundongos de linhagem P14 Thy1.1 foram isoladas, ativadas e transduzidas *in vitro* com vetor retroviral *in vitro* vazio ("Mock"), contendo a sequência codificante para o gene Cbx4 ("Cbx4 OE") ou sequências para mutantes funcionais da proteína Cbx4 (ΔChromo ou ΔSIM1-2). No mesmo dia da ativação e transdução, as células foram transferidas para camundongos congênicos C57BL/6 Thy1.2 (5 x 10^5 células). No dia seguinte esses animais foram infectados por via intraperitoneal com 1,5 x 10^5 UFP de LCMV-cl13 (em protocolo de indução de infecção aguda). No 8º dia pós-infecção, os esplenócitos dos animais infectados foram isolados e as células transduzidas e transferidas adotivamente (Thy1.1$^+$GFP$^+$) presentes nessa suspensão foram analisadas por citometria de fluxo quanto ao seu fenótipo e funcionalidade.

5.9.1 Análise fenotípica (LCMV-Arm, 8º dia pós-infecção)

Ao contrário do esperado, a análise fenotípica das células mostrou que a superexpressão de Cbx4 em células T CD8$^+$ diferenciadas no curso de uma infecção viral aguda não provocou o aumento da população de células com fenótipo efetor em comparação ao controle (Figura 39A-C). De fato, o que foi observado em nessa comparação foi que a superexpressão de Cbx4 levou a uma diminuição significativa da frequência de células efetoras de vida curta (KLRG1$^+$CD127$^-$) e duplo positiva para as moléculas KLRG1 e CD127 (KLRG1$^+$CD127$^+$), e uma tendência de queda na frequência na população de células precursoras de memória (KLRG1$^-$CD127$^+$) (Figura

39B). O número total de células dessas populações acompanhou o efeito visto na frequência, porém de forma não significativa (Figura 39C). Em contrapartida, células T $CD8^+$ superexpressando Cbx4 apresentaram o aumento significativo da frequência da população duplo negativa ($KLRG1^-CD127^-$), com a tendência do mesmo padrão no número total de células, quando comparadas com a condição Mock (Figura 39B, C). Corroborando esses resultados, a análise dos níveis de expressão de moléculas de superfície em células T $CD8^+$ Cbx4 OE indicou menores níveis de expressão de KLRG1 e CD127 em comparação a células T $CD8^+$ Mock (Figura 39D, E). Já em relação a expressão do receptor CXCR3, o efeito oposto foi observado (Figura 39F).

Em concordância ao visto nos experimentos de superexpressão em células T $CD8^+$ cultivadas *in vitro*, as células T $CD8^+$ transduzidas para a superexpressão de Cbx4 mutante ΔChromo apresentaram números totais de célula significativamente menores em comparação ao grupo controle, chegando a duas ordens de grandeza de diferença, em todas as subpopulações analisadas com exceção da $KLRG1^-CD127^+$ (Figura 39A-C). Quando analisado o fenótipo, comparado a condição Mock, essas células apresentaram frequência significativamente menor de células efetoras de vida curta e duplo positivas para KLRG1 e CD127, e tendência de redução nas células precursoras de memória, com consequente aumento significativo da população duplo-negativa (Figura 39B). A análise dos níveis de expressão de KLRG1 e CD127 seguiu o mesmo padrão, sendo observada menor expressão de ambas as moléculas nas células superexpressando Cbx4 ΔChromo (Figura 39D, E). Já para o receptor CXCR3, foi visto um aumento na superexpressão de Cbx4 OE e Cbx4 ΔChromo (Figura 39F).

Quando analisado o impacto da superexpressão de Cbx4 mutante para a perda da funcionalidade dos SIM (ΔSIM1-2), foi observado um resultado consistente ao dos experimentos *in vitro*. Como nos experimentos de superexpressão *in vitro*, a superexpressão do mutante ΔSIM1-2 recapitulou o fenótipo de células T $CD8^+$ deficientes em Cbx4, levando ao prejuízo na geração de células efetoras e um desvio para o favorecimento da geração de células com fenótipo de memória (Figura 39A-C). Demonstrando isso, foi observada a queda na frequência da subpopulação $KLRG1^+CD127^-$ e aumento nas subpopulações expressando CD127, incluindo as células precursoras de memória e duplo positivas ($KLRG1^+CD127^+$) (Figura 39B). Apesar desse efeito, o número total de cada subpopulação não alterou em comparação a condição Mock (Figura 39C). Em concordância, foram observados

menores níveis de expressão de KLRG1 e maiores níveis de CD127 (Figura 39D, E). A análise da expressão de CXCR3, por sua vez, indicou maior expressão do receptor na condição de superexpressão de Cbx4 ΔSIM1-2 em comparação as células controle (Figura 39F).

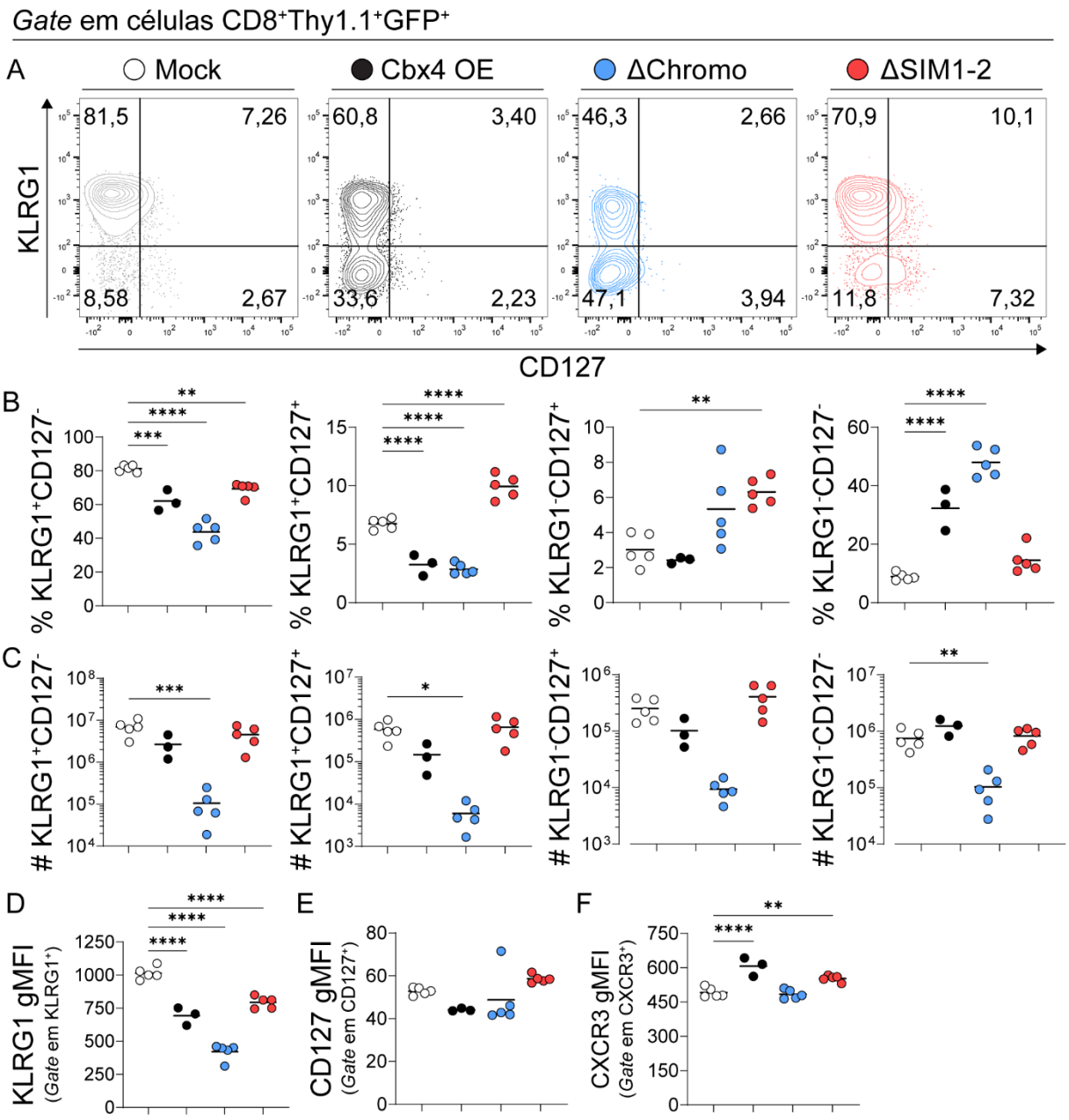


Figura 39. Análise fenotípica de células T CD8⁺ P14 superexpressando diferentes construções de *Cbx4* diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV em fase aguda da resposta (8º dia pós-infecção). (**A**) *Contour plot* representativo da *gate* utilizada para a definição das subpopulações de células T CD8⁺ na análise fenotípica de células T CD8⁺ P14 transduzidas com vetor retroviral vazio ("Mock", em cinza) ou superexpressando *Cbx4* ("Cbx4 OE", em preto) ou mutantes funcionais de Cbx4 ("ΔChromo", em azul ou "ΔSIM1-2", em vermelho). (**B**) Frequência e (**C**) números totais das subpopulações de células T CD8⁺ P14 Thy1.1⁺GFP⁺. (**D-F**) Quantificação dos níveis de expressão calculados por gMFI das moléculas de superfície associados ao fenótipo de memória, ativação e fenótipo efetor em células T CD8⁺ transferidas e transduzidas (Thy1.1⁺GFP⁺). Dados de um experimento independentes (n ≥ 3). Cada círculo representa um animal em um dos experimentos, barra

representa o valor de média do grupo. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0,001, ****p < 0.0001 calculado por teste ANOVA com um fator corrigido com teste de Tukey para múltiplas comparações.

5.9.2 Análise funcional (LCMV-Arm, 8º dia pós-infecção)

Por fim, também foi investigada a funcionalidade de células T $CD8^+$ P14 superexpressando Cbx4 através do reestimulo de esplenócitos *ex vivo* com o peptídeo recombinante gp33-41 (“GP33”) (Figura 40). Nesse ensaio foi optado não realizar a análise por citometria de fluxo das células T $CD8^+$ superexpressando Cbx4 ΔChromo devido a limitação imposta pela baixa recuperação de células transferidas adotivamente, o que poderia interferir na leitura dos resultados.

Corroborando o observado nos experimentos anteriores, de superexpressão de Cbx4 em células T $CD8^+$ diferenciadas *in vitro*, foi observada a tendência de aumento na frequência de células polifuncionais duplo produtoras de IFN-γ e TNF ($IFN\text{-}\gamma^+TNF^+$) na condição de superexpressão de Cbx4 selvagem (“Cbx4 OE”) e Cbx4 ΔSIM1-2 (Figura 40A, B). Acompanhando esse resultado, a frequência das populações de células produtoras de IFN-γ ou TNF e os níveis de expressão de cada citocina medido em gMFI também apresentaram tendência de aumento para ambas as condições de superexpressão, em comparação ao controle Mock (Figura 40C-F). Similar ao visto no modelo de diferenciação *in vitro*, a superexpressão de Cbx4 ou Cbx4 ΔSIM1-2 também acarretou a tendência de diminuição da produção de Granzima B em comparação a condição controle, sendo o efeito maior na primeira condição citada (Figura 40G).

Esses resultados corroboram os observados no modelo de diferenciação *in vitro* descrito no tópico anterior e reforçam a hipótese de que o controle da produção de citocinas e da proteína citotóxica Granzima B é encarregada por circuitos regulatórios que podem ser, pelo menos, parcialmente distintos.

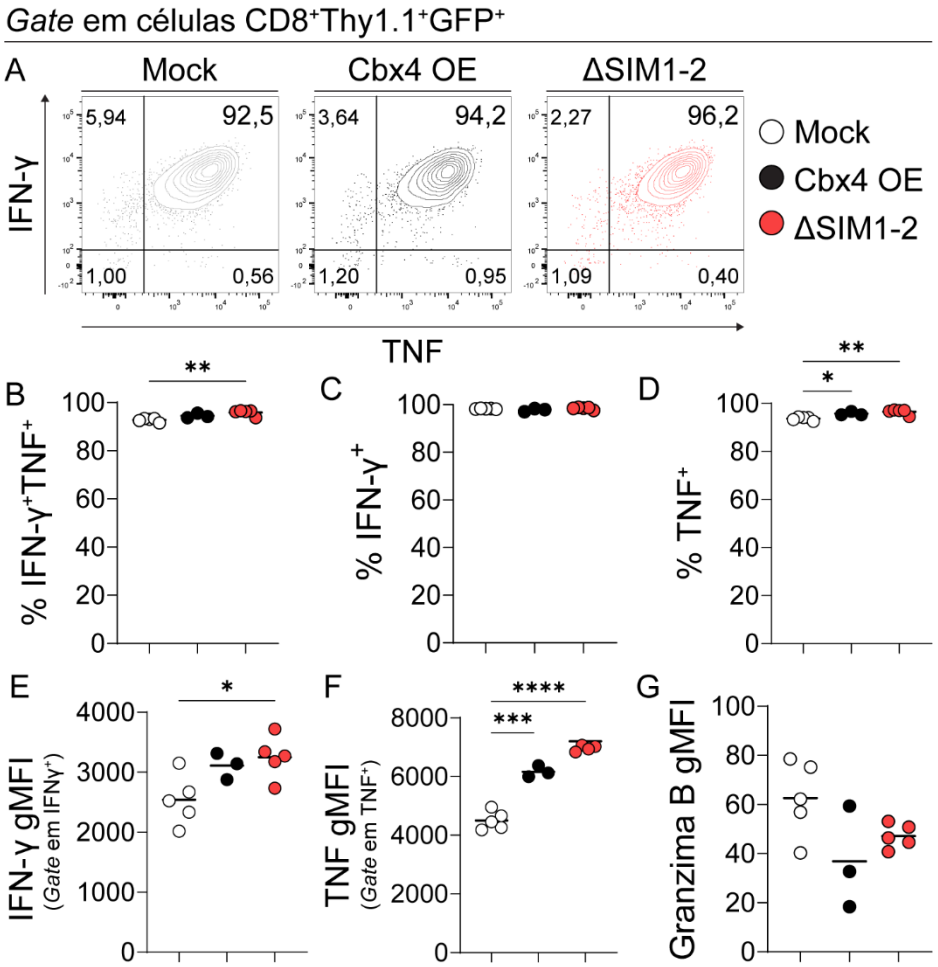


Figura 40. Análise funcional de células T CD8⁺ P14 superexpressando *Cbx4* diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV em fase aguda da resposta (8º dia pós-infecção). Os esplenócitos de animais do grupo controle, que receberam adotivamente células transduzidas com plasmídeo vazio ("Mock"), e de animais que receberam células transduzidas com vetores para a superexpressão de Cbx4 ("Cbx4 OE") ou o mutante funcional ΔSIM1-2 foram isolados no 8º dia pós-infecção por LCMV e reestimulados *ex vivo* com o peptídeo recombinante gp33-41 (0,2 µg/mL), na presença de Brefeldina A, por quatro horas. Em seguida, as células foram analisadas por citometria de fluxo. (**A**) *Contour plot* representativo da *gate* utilizada para a definição das subpopulações de células T CD8⁺ efetoras na análise funcional. (**B-D**) Frequência das subpopulações de células T CD8⁺ transferidas e transduzidas (Thy1.1⁺GFP⁺) produtoras de citocinas pró-inflamatórias. (**E-J**) Níveis de expressão, quantificados por MFI, das citocinas (**E**) IFN-γ, (**I**) TNF e (**J**) da proteína citotóxica Granzima B em células T CD8⁺ transferidas adotivamente e transduzidas (Thy1.1⁺GFP⁺). Dados de um experimento independentes (n ≥ 3). Cada círculo representa um animal em um dos experimentos, barra representa o valor de média do grupo. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0,001, ****p < 0.0001 calculado por teste ANOVA com um fator corrigido com teste de Tukey para múltiplas comparações.

5.10 Investigação dos mecanismos moleculares através dos quais PRC1 e Cbx4 regulam a diferenciação de células T CD8⁺

Uma vez reunida as evidências, em diferentes modelos de diferenciação, de que Cbx4 regula o destino celular dessas células T CD8⁺, o próximo passo para a investigação foi o estudo do mecanismo molecular pelo qual Cbx4 exerce sua função. Como mencionado anteriormente, Cbx4 pode apresentar diferentes funções: (i) cooperando com o PRC1, como uma subunidade que reconhece marcas repressoras

de H3K27me3 através de seu cromodomínio e promove o recrutamento do complexo para sítios genômicos que receberam essa marca de histona ou; (ii) exercendo uma função de E3 SUMO ligase, SUMOilando outras proteínas, ou interagindo com proteínas SUMOiladas. No objetivo de avaliar quais mecanismos são responsáveis pela regulação da diferenciação de células T CD8$^+$ e estariam por trás das alterações encontradas nos resultados descritos no trabalho, foram analisadas diferentes maneiras pelas quais Cbx4 e o PRC1 poderiam estar trabalhando nessa regulação, incluindo: (i) o papel de Cbx4 como regulador transcricional de fatores de transcrição que orquestram a diferenciação de células T CD8; (ii) o papel de PRC1 na regulação epigenética do fator de transcrição chave do fenótipo de memória Tcf-1; (iii) a função de Cbx4 como proteína E3 SUMO ligase em células T CD8$^+$ diferenciadas *in vitro*.

5.10.1 Papel de Cbx4 na regulação transcricional de fatores de transcrição chave para a aquisição do fenótipo de memória em células T CD8$^+$

O fator de transcrição Tcf-1, codificado pelo gene *Tcf7*, é um dos principais agentes regulatórios no processo de diferenciação de células T CD8$^+$. Em diferentes trabalhos foi demonstrado sua função crítica para o comprometimento com o fenótipo de memória em resposta imune aguda. Além disso, o Tcf-1 também foi demonstrado como crucial para a geração e manutenção de células T CD8$^+$ exaustas precursoras em modelos de resposta crônica. Essa é uma população que mantém características de células progenitoras multipotentes (“*stemness*”), capazes de se manter por longos períodos no curso da resposta e gerando novas células T CD8$^+$ efetoras e exaustas, repovoando a população de células T CD8$^+$ capazes de atuar na resposta ao antígeno.

A análise da expressão de Tcf-1 por citometria de fluxo em células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4 (Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre}) ativadas e diferenciadas em resposta primária a infecção viral aguda por LCMV, ou em resposta secundária em desafio com *L. monocytogenes*-GP33, não revelou diferenças significativas na expressão do fator de transcrição em comparação ao grupo controle (Cbx4$^{fl/fl}$). No entanto, essa ausência de alteração poderia ocorrer devido a compensação da função de Cbx4 por outra isoforma de proteína Chromobox (Cbx). Sendo assim, foi efetuada a análise da expressão gênica de *Tcf7* no modelo de deficiência em Cbx4 em células diferenciadas *in vitro* polarizadas para o fenótipo tipo efetor ou fenótipo tipo memória (Figura 41).

De forma contrária ao esperado, considerando os resultados anteriores, foi observado que células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4 (“shCbx4”) polarizadas para o fenótipo efetor apresentaram uma tendência de diminuição na expressão de *Tcf7* quando comparadas com células controle (“shCD4”) (Figura 41A). No entanto, quando polarizadas para o fenótipo de memória, foi visto que células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4 apresentavam em média o dobro dos níveis de expressão gênica de *Tcf7* em comparação as células controle (Figura 41B).

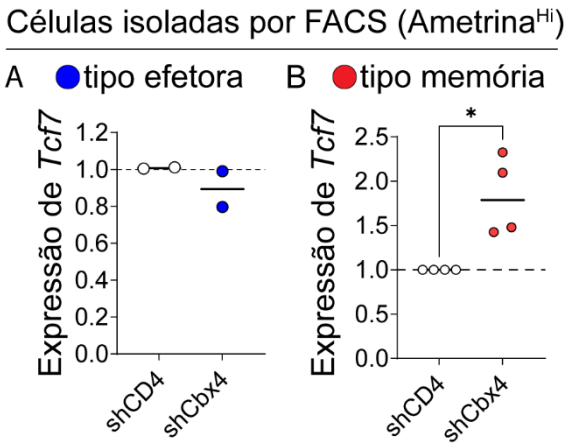


Figura 41. Quantificação da expressão gênica de *Tcf7* em células T CD8$^+$ murinas polarizadas para o fenótipo tipo efetor ou tipo memória *in vitro*. Células T CD8$^+$ ativadas e transduzidas *in vitro* polarizadas para o fenótipo (**A**) tipo efetor ou (**B**) tipo memória foram isoladas por FACS baseado na expressão de Ametrina (Ametrina$^+$) e utilizadas para a quantificação comparativa de transcritos para o gene *Tcf7* por método de RT-qPCR. A quantificação do mRNA foi calculada pelo método de $2^{\Delta\Delta CT}$ e normalizada para os valores encontrados nas amostras de células controle (“shCD4”). Dados da compilação de (**A**) dois ou (**B**) três experimentos independentes. Cada círculo representa um experimento, barra representa o valor de média do grupo. *p < 0,05 calculado por teste t de Student bicaudal não pareado.

Os níveis de expressão de *Tcf7* e de outros fatores de transcrição associados ao fenótipo efetor ou de memória em células T CD8$^+$, *Tbx21* (T-bet) e *Eomes*, também foram quantificados em células T CD8$^+$ superexpressando *Cbx4* (e mutantes funcionais do gene), tanto em células de animais Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre} (Cbx4 T KO) quanto animais do grupo controle Cbx4$^{fl/fl}$ (Figura 42). Os resultados desse experimento mostraram que em comparação a condição Mock a superexpressão de Cbx4 (“Cbx4-OE”), de forma condizente aos resultados anteriores, levou a uma tendência de aumento da expressão de *Tbx21* e diminuição na expressão de *Eomes*, em ambas as células T CD8$^+$ de animais Cbx4 T KO ou do grupo controle (Figura 42A, B). Por sua vez, a superexpressão do mutante funcional de Cbx4, ΔChromo, levou ao resultado contrário da superexpressão de Cbx4 selvagem, enquanto a superexpressão de ΔSIM1-2 promoveu um padrão similar ao encontrado na condição Cbx4-OE (Figura

42A, B). Esses resultados indicam que a regulação positiva de *Tbx21* por parte de Cbx4 seria dependente do cromodomínio da proteína e não de seus SIMs. A quantificação dos níveis de expressão de *Tcf7* nas células superexpressando Cbx4 não revelou alterações significativas ou tendências claras quando comparadas as diferentes condições nas diferentes células transduzidas *in vitro* (Figura 42C).

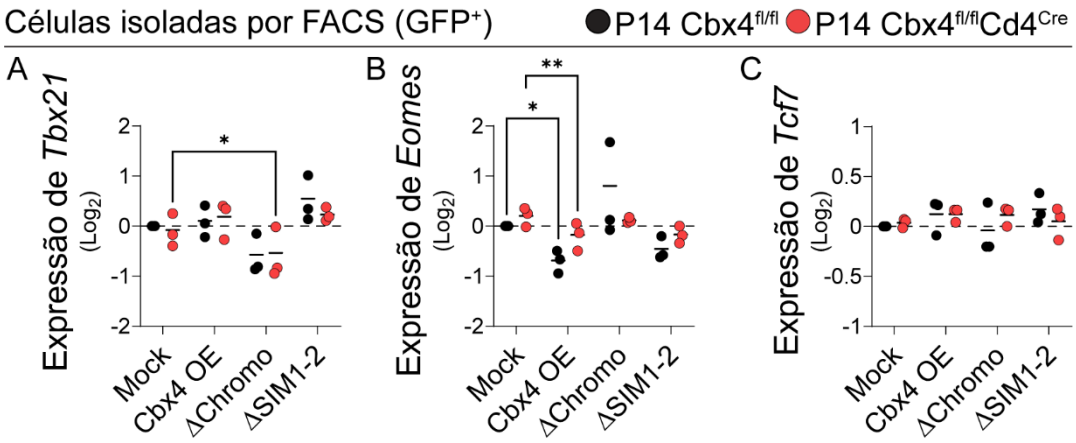


Figura 42. Quantificação da expressão gênica de fatores de transcrição relacionados ao fenótipo efetor e de memória em células T CD8⁺ murinas superexpressando Cbx4 polarizadas para o fenótipo tipo memória *in vitro*. Células T CD8⁺ de animais P14 Cbx4$^{fl/fl}$ (em preto) e animais P14 Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre} (em vermelho) foram ativadas e transduzidas *in vitro* e polarizadas para o fenótipo tipo memória. No último dia de cultivo, as células foram isoladas por FACS e utilizadas para a quantificação do número de transcritos para os genes (**A**) *Tbx21*, (**B**) *Eomes* e (**C**) *Tcf7* por método de RT-qPCR. A quantificação do mRNA foi calculada pelo método de $2^{\Delta\Delta CT}$ e normalizada para os valores encontrados nas amostras de células controle ("Mock"). Dados da compilação de três experimentos independentes. Cada círculo representa um experimento, barra representa o valor de média do grupo. *p < 0,05, **p < 0,01, calculado por teste ANOVA com dois fatores sem teste de correção para múltiplas comparações (teste de Fisher de menor diferença significativa).

Recentemente foi descrito que o fator de transcrição c-Myb, ou Myb, é um importante regulador positivo de Tcf-1, sendo, portanto, um fator chave no comprometimento com o fenótipo de memória. Além disso, é demonstrado que Myb está associado a capacidade progenitora em células progenitoras hematopoiéticas e em células T CD8⁺ progenitoras exaustas. Em nosso conjunto de dados de RNA-Seq (item **5.2**) foi visto que *Myb* é um gene diferencialmente expresso (Figura 15), regulado positivamente em células T CD8⁺ deficientes pra Cbx4 em comparação às células do grupo controle. Assim, a expressão de Myb também foi quantificada em células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 ou superexpressando Cbx4 cultivadas *in vitro* (Figura 43).

Tanto quando polarizadas para o fenótipo tipo efetor quanto para o fenótipo tipo memória, células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 ("shCbx4") cultivadas *in vitro* exibiram maiores níveis de expressão de Myb em comparação as células T CD8⁺ controle ("shCD4") (Figura 43A, B). Essa diferença foi significativa na condição polarizante para

o fenótipo tipo memória. Esse efeito foi confirmado também no modelo de nocaute de Cbx4, comparando as condições controle (“Mock”) de células T CD8^{+} P14 Cbx4$^{fl/fl}$ e P14 Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre} (Cbx4 T KO), onde foi vista maior tendência de expressão de *Myb* em células deficientes pra Cbx4 (Figura 43C).

A expressão de *Myb* foi também analisada em células T CD8^{+} superexpressando Cbx4 ou a forma mutante ΔSIM1-2 (Figura 43D, E). Não foi realizado o experimento para a condição ΔChromo pois não foi possível isolar células transduzidas GFP^{+} suficientes no último dia de cultivo. Os resultados nesse experimento corroboraram os anteriores encontrados na análise de célula deficientes em Cbx4, com a superexpressão de Cbx4 levando a queda dos níveis de expressão de *Myb*. Essa queda foi vista tanto em células T CD8^{+} de animais Cbx4 T KO quanto animais do grupo controle. Em paralelo, em ambos os genótipos, a superexpressão de ΔSIM1-2 provocou uma pequena queda na expressão de Myb em comparação a condição Mock. Dessa maneira, o dado sugere que Cbx4 possui um papel na regulação negativa de *Myb* e essa regulação é pelo menos parcialmente (se não totalmente) dependente do domínio SIM.

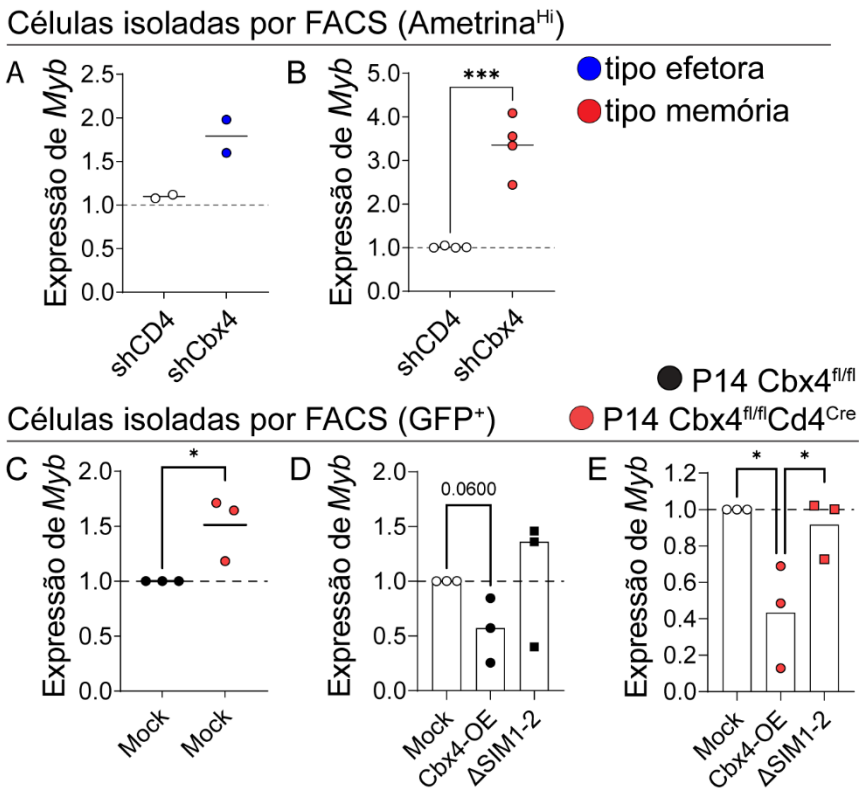


Figura 43. Quantificação da expressão gênica de *Myb* em células T CD8^{+} murinas deficientes em Cbx4 ou superexpressando Cbx4 cultivadas *in vitro*. (**A**, **B**) Células T CD8^{+} de animais WT foram ativadas e transduzidas *in vitro* para a deficiência em Cbx4 e polarizadas para o fenótipo efetor

ou de memória. Em paralelo, células T CD8$^+$ de animais (**C-E**) P14 Cbx4$^{fl/fl}$ (em preto) ou P14 Cbx4$^{fl/fl}$Cd4Cre (em vermelho) foram transduzidas para a superexpressão de Cbx4 e polarizadas para o fenótipo tipo memória. No último dia de cultivo, as células foram isoladas por FACS baseadas na expressão da proteína repórter (Ametrina ou GFP) e utilizadas para a quantificação do número de transcritos para o gene *Myb* por método de RT-qPCR. A quantificação do mRNA foi calculada pelo método de $2^{\Delta\Delta CT}$ e normalizada para os valores encontrados nas amostras de células controle ("shCD4" ou "Mock"). Dados da compilação de pelo menos dois experimentos independentes. Cada símbolo representa um experimento, barra representa o valor de média do grupo. *p < 0,05, ***p < 0,001 calculado por (**A**, **B**) teste t de Student bicaudal não pareado ou (**C-E**) teste ANOVA com dois fatores sem teste para correção de múltiplas comparações (teste de Fisher de menor diferença significativa).

5.10.2 Papel do PRC1 na regulação epigenética de Tcf-1, fator de transcrição chave para a aquisição do fenótipo de memória em células T CD8$^+$

Um dos principais mecanismos de regulação da transcrição gênica associado ao complexo PRC1 é a deposição da marca repressora de histona H2AK119ub. A deposição de H2AK119ub é catalisada pela subunidade Ring1 ou Ring2 do complexo, no entanto, a subunidade Cbx (Cbx2, Cbx4, Cbx7 ou Cbx8) desempenha a importante função de recrutar a atividade repressora do PRC1 a sítios genômicos marcados por H3K27me3. Dois trabalhos demonstraram a participação do complexo PRC2 (mais especificamente Ezh2, subunidade catalítica de PRC2) na determinação da diferenciação de células T CD8$^+$. Foi descrito que PRC2 contribui de forma crítica para o comprometimento com o destino celular efetor através da repressão de genes associados ao fenótipo de memória, incluindo os genes *Tcf7* e *Il7r*. Além disso, várias subunidades de PRC2, incluindo Ezh2, são reguladas positivamente logo após a ativação de células T CD8$^+$ que se comprometem com o destino efetor, indicando que esse papel repressor é fundamental nas primeiras etapas de diferenciação das células T CD8$^+$. Todavia, apesar do papel de PRC2 nesse processo ser bem demonstrado, pouco se sabe sobre o papel da regulação epigenética de PRC1 na diferenciação de células T CD8$^+$.

Para investigar a hipótese de que PRC1 atua na repressão de genes associados ao fenótipo de memória em células T CD8$^+$ efetoras, tal qual PRC2, foram realizados experimentos de imunoprecipitação da cromatina (ChIP), imunoprecipitando a cromatina associada à marca repressora de PRC1 H2AK119ub (Figura 44). O DNA genômico é então amplificado por qPCR para a quantificação das regiões associadas à marca em diferentes condições. Foi realizada a técnica de ChIP-qPCR em células T CD8$^+$ cultivadas *in vitro* polarizadas para o fenótipo tipo efetor ou tipo memória, como explicado no item **5.4**. Como controles para o ensaio foram utilizados anticorpos para a imunoprecipitação de histona H3, que serve como

condição para normalização do material amplificado por qPCR, e coquetel de anticorpos IgG de coelho, que serve como controle de sinal associado a imunoprecipitação não específica.

Os resultados preliminares de ChIP-qPCR demonstram que existe a tendência de um enriquecimento relativo (normalizado pelo sinal encontrado na IP de H3) da marca repressora de H2AK119ub no sítio de iniciação de transcrição (TSS) do gene *Tcf7* em células T CD8$^+$ polarizadas para o fenótipo tipo efetor em comparação as células T CD8$^+$ polarizadas para o fenótipo tipo memória (Figura 44). Além disso, como controle de que o enriquecimento da marca repressora está associado a perda da acessibilidade da cromatina, a deposição de H2AK119Ub também foi quantificada no *locus* do promotor do gene *Ifng*, sítio onde já foi previamente demonstrada cromatina acessível. A comparação do enriquecimento da deposição da marca H2AK119ub entre os loci de TSS de *Tcf7* e promotor de *Ifng* confirma a maior deposição da marca repressora no primeiro sítio e reforça a hipótese de que esse sítio se encontra de fato reprimido por esta marca do PRC1.

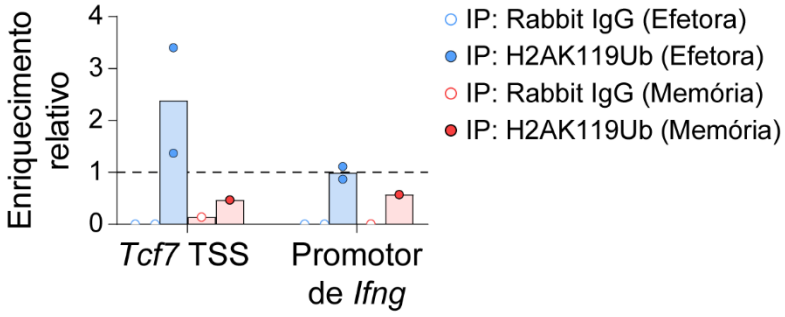


Figura 44. Imunoprecipitação da cromatina seguido de qPCR (ChIP-qPCR) de DNA genômico associado a marca repressora de PRC1 H2AK119ub. Células T CD8$^+$ isoladas de animais C57BL/6 e cultivadas *in vitro* em condições polarizantes para o fenótipo tipo efetor (em azul) ou tipo memória (em vermelho) foram isoladas no seu último dia de cultivo e processadas para ensaio de ChIP, utilizando anticorpos anti-H2AK119ub (símbolo preenchido), anti-IgG (símbolo vazado) e anti-H3 (não mostrado). O DNA genômico imunoprecipitado foi amplificado por qPCR e o número de cópias de DNA em cada condição de imunoprecipitação foi calculado a partir de uma curva padrão utilizando o DNA total não imunoprecipitado (Input). A quantificação de DNA imunoprecipitado foi normalizada pelos valores encontrados na amplificação do material imunoprecipitado associado a histona H3. Dados da compilação de dois (fenótipo tipo efetor) ou apenas um (fenótipo tipo memória) experimento independente. Cada símbolo representa um experimento, barra representa o valor de média do grupo.

5.10.2.1 Investigação do perfil de proteínas SUMOiladas e da função E3 SUMO ligase de Cbx4 em células T CD8$^+$ cultivadas *in vitro*

A proteína Cbx4 pode atuar em vias de sinalização mediadas por SUMO, uma modificação pós-traducional de uma pequena proteína similar a ubiquitina. Como mencionado anteriormente, essa atuação é dependente dos motivos de interação ao

SUMO (SIM) presentes na proteína que podem conceder à Cbx4 uma função E3 SUMO ligase, onde essa pode catalisar o processo de conjugação de SUMO para uma proteína alvo, ou ainda a capacidade de interagir com proteínas SUMOiladas, modulando assim a função de outras proteínas que são alvo de sinalização por SUMO ou ainda da sua própria função.

Como mencionado anteriormente na introdução, algumas proteínas importantes para o processo de diferenciação de células T $CD8^+$ já foram descritas como alvo de SUMOilação pela função E3 SUMO ligase de Cbx4 em outros tipos celulares, como os reguladores transcricionais Hif-1α e Dnmt3a. Além disso, existem poucos trabalhos explorando o papel das vias de sinalização mediadas por SUMO na biologia de células T $CD8^+$. Portanto, nesse projeto de tese se iniciou uma investigação a respeito do perfil de proteínas SUMOiladas em células T $CD8^+$ e como Cbx4 poderia estar envolvido com a regulação da SUMOilação de proteínas envolvidas com a regulação da biologia e diferenciação de células T $CD8^+$. Para isso, como mencionado anteriormente (ver tópico **5.4** e Figura 17), extratos de proteínas totais foram preparados de células T $CD8^+$ cultivadas *in vitro* e polarizadas para os fenótipos tipo efetor ou tipo memória, bem como células T $CD8^+$ deficientes em Cbx4 em modelo de silenciamento (ou células T $CD8^+$ controle) polarizadas *in vitro* para o fenótipo tipo efetor ou tipo memória. Foram preparados extratos com dois tampões de lise para extração de proteínas diferentes, nomeados nesse trabalho como Tampão I e Tampão II para a facilitação da leitura. O Tampão I é baseado no tampão de lise de proteínas comumente utilizado em ensaios de radioimunoprecipitação (tampão RIPA). O Tampão II é constituído de um tampão RIPA modificado, com o acréscimo de N-etimaleimida (NEM), um composto orgânico inibidor de reações de de-SUMOilação, adicionado para aumentar a eficiência de recuperação de proteínas SUMOiladas nos extratos. O racional para a utilização de dois tampões diferentes foi de maximizar o repertório de possíveis proteínas totais SUMOiladas a serem detectadas nas análises qualitativas por *western blotting* e co-imunoprecipitação (co-IP).

Em apenas um experimento, em uma estratégia exploratória, foram comparados lado a lado o perfil de proteínas SUMOiladas presentes em células T $CD8^+$ cultivadas in vitro e polarizadas para o fenótipo tipo efetor (Figura 45). Nessa análise qualitativa, foram carregadas 30 µg de proteína em cada fileira do gel de poliacrilamida para a marcação com anticorpo anti-SUMO1. Como controle de

carregamento, uma massa de 5 µg de proteína foi utilizada para a marcação com anticorpo contra proteína citoplasmática β-actina. Foi observado que a extração de proteínas com tampões de lise diferentes levou a visualização de perfis de bandas distintos no *blotting*, indicando que algumas proteínas eram recuperadas exclusivamente por um dos tampões de lise (Figura 45). De modo geral, como esperado, o Tampão II (contendo NEM) recuperou mais proteínas de médio e alto peso molecular (próximo a 75 kDa ou acima de 75 kDa, respectivamente). Além disso, uma banda correspondente a uma proteína de peso molecular pouco acima de 25 kDa foi observada apenas na extração com Tampão II.

Quando comparadas as condições de células T $CD8^+$ cultivadas *in vitro* polarizadas para o fenótipo tipo efetor com as células polarizadas para o fenótipo tipo memória, é possível ver que ambas as condições de polarização apresentam um perfil de bandas muito similar. No entanto, existe um indicativo de que células polarizadas para o fenótipo tipo memória apresentam uma menor massa de proteínas SUMOiladas, principalmente na faixa de proteínas de alto peso molecular. Na comparação das células T $CD8^+$ cultivadas *in vitro* deficientes em Cbx4 ("shCbx4") com as células controle do experimento ("shCD4"), ambas polarizadas para o fenótipo tipo memória, é possível ver que a deficiência em Cbx4 também aparenta ocasionar em menores níveis de proteínas SUMOiladas, apesar de não ser possível detectar uma perda total de alguma banda no perfil visualizado no *blotting*. Há, porém, uma banda mais forte, logo acima de 25 kDa, que tem sua intensidade notavelmente reduzida em células T $CD8^+$ deficientes em Cbx4.

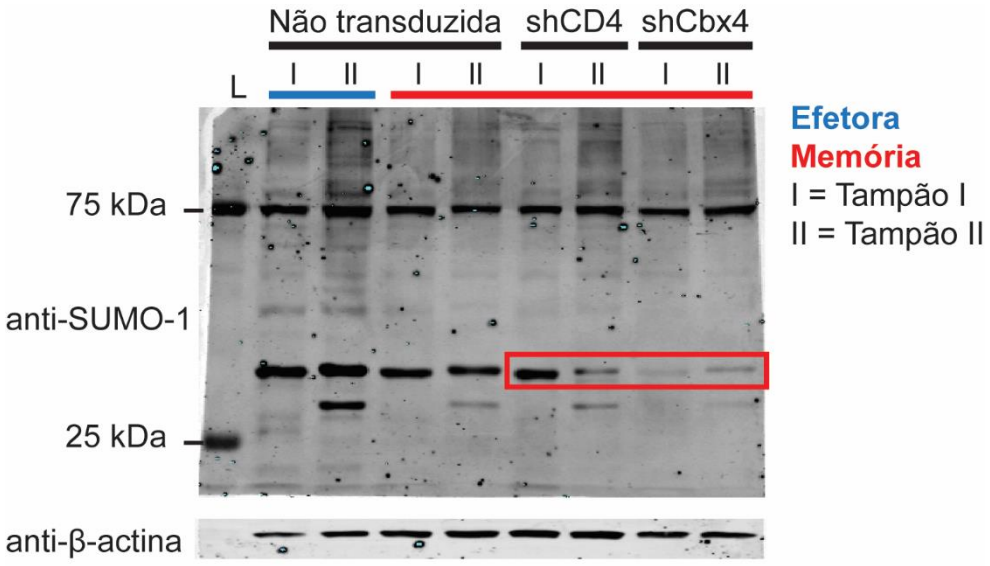


Figura 45. Análise do repertório de proteínas SUMOiladas em células T CD8⁺ cultivadas *in vitro*. Extratos de proteína total obtidos de células T CD8⁺ cultivadas *in vitro* polarizadas para o fenótipo tipo efetor ou de memória em foram analisados qualitativamente por *western blotting* para a avaliar o perfil de proteínas SUMOiladas, através da marcação de membrana de nitrocelulose com anticorpos específicos para SUMO-1. Para a análise do repertório de proteínas SUMOiladas, uma massa 30 µg de proteínas foi separada em gel de poliacrilamida de 9% (v/v) e transferida em seguida para membrana de nitrocelulose. Em paralelo, como controle de carregamento, uma massa de 5 µg proteínas foi carregada em um gel de poliacrilamida de 15%, transferida para membrana de nitrocelulose e marcada com anticorpo específico para β-actina.

A investigação exploratória do repertório de proteínas SUMOiladas em células T CD8⁺ através da análise qualitativa por *western blotting* não revelou grandes alterações globais, seja na comparação entre células de fenótipo tipo efetor com células de fenótipo tipo memória, ou na comparação entre células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 de fenótipo tipo memória com células T CD8⁺ controle. No entanto, apenas algumas alterações pontuais foram detectadas na análise, como a banda referente à proteína de aproximadamente 30 kDa destacada no quadrado vermelho na Figura 45.

Para tentar identificar proteínas alvo da função E3 SUMO ligase de Cbx4, ou que pelo menos dependam da expressão de Cbx4 para serem SUMOiladas, optamos por uma nova estratégia, agora utilizando uma abordagem de análise proteômica. Extratos proteicos gerados de forma similar à citada acima para as análises de *western blotting* foram agora utilizados para ensaios de imunoprecipitação, separando proteínas SUMOiladas com anticorpos anti-SUMO1, que foram então analisadas em seguida por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC:MS) para sua identificação. A abordagem proteômica por LC:MS foi realizada em colaboração com o Prof. Renato Sampaio, da Faculdade de Farmácia da UFRJ. Nessa análise, buscou-se a identificação de proteínas SUMOiladas diferencialmente acumuladas comparando células T CD8⁺ cultivadas *in vitro* não transduzidas, células T CD8⁺ transduzidas do grupo controle (“shCD4”) e células T CD8⁺ transduzidas deficientes em Cbx4 (“shCbx4”) (Figura 46). Para essa análise, porém, foram utilizados extratos proteicos de células T CD8⁺ cultivadas *in vitro* polarizadas para o fenótipo efetor. A razão por trás dessa mudança foi a de que foram detectadas mais proteínas SUMOiladas no extrato total de células diferenciadas para o fenótipo tipo efetor, em comparação às células tipo memória. Nessa comparação foi possível observar que do universo de 56 proteínas SUMOiladas diferencialmente expressas entre as três diferentes condições, 35 dessas proteínas eram diferencialmente expressas em células transduzidas, em comparação a células não transduzidas (Figura 46). Os resultados encontrados no projeto indicam que Cbx4 possui papel importante na

definição do fenótipo efetor. Além disso, possíveis candidatos a alvo da função E3 SUMO ligase de Cbx4, como o fator de transcrição Hif-1α, seriam mais expressos e apresentariam uma atuação mais requisitada no fenótipo efetor.

Quando comparadas as proteínas SUMOiladas diferencialmente expressas entre as condições transduzidas shCD4 e shCbx4 é possível identificar alguns alvos que poderiam estar envolvido com a regulação de processos importantes para a célula T CD8$^+$. Células T CD8$^+$ do grupo controle shCD4 (e não células deficientes em Cbx4) apresentaram a proteína Tnr1b SUMOilada, proteína essa que em conjunto com o receptor de TNF, Tnfr1, medeia o recrutamento de outras proteínas efetoras anti-apoptóticas c-Iap1 e c-Iap2. Esse resultado sugere que a proteína Tnr1b é um alvo da função E3 SUMO ligase de Cbx4 que reforça sinais anti-apoptóticos e, desta maneira, uma proteína que poderia estar envolvida com o aumento da apoptose observada em células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4.

Também foi encontrada exclusivamente em células T CD8$^+$ shCD4 a proteína SUMOilada Ddx3x. A proteína Ddx3x é uma helicase de RNA altamente multifuncional que além de estar relacionada à múltiplos processos da transcrição gênica e processamento de RNA, incluindo a montagem de ribonucleoproteínas, *splicing* de mRNA e exportação de mRNA, também já foi descrita associada ao controle da atividade de múltiplos fatores de transcrição e a transcrição de vários reguladores do ciclo celular. Entre esses vários exemplos, se destacam sua a cooperação com os fatores de transcrição NF-κB e Irf-7 e, e a regulação positiva dos genes das proteínas *Tp53* (p53), *Cdh1* (E-caderina) e *Cdkn1a* (Cdn1a). Além disso, a proteína Ddx3x também pode interagir com diversas vias relacionadas a resposta imune, atuando como sensor de RNA viral, promovendo a produção de IFN-I e regulando a montagem do inflamassoma de NLRP3.

Outras proteínas SUMOiladas encontradas exclusivamente em células T CD8$^+$ shCD4 que poderiam estar envolvidos com a regulação de importantes processos biológicos em células T CD8$^+$ efetoras incluem: (i) a Ldha, lactato desidrogenase A, proteína efetora da via de glicólise, que por sua vez possui papel central no metabolismo energético de células T CD8$^+$ efetoras e; (ii) as proteínas TPR e ALRF2, envolvidas com o transporte e *splicing* de mRNA.

Por limitações da técnica e de tempo, apenas um experimento de abordagem proteômica por LC:MS foi realizado. A validação de que essas proteínas são de fato alvos da função E3 SUMO ligase de Cbx4, bem como ensaios analisando de maneira específica e direcionada a atuação dessas proteínas na determinação da diferenciação de células T CD8⁺ ou em outros aspectos da biologia destas células são essenciais para a comprovação do seu papel nesses processos.

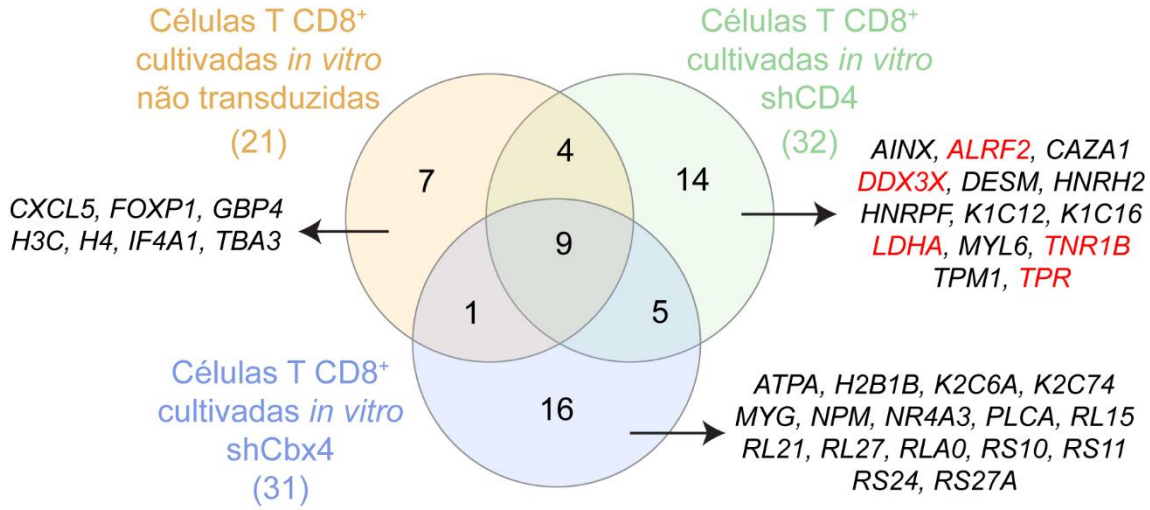


Figura 46. Identificação das proteínas SUMOiladas em células T CD8⁺ cultivadas *in vitro* e polarizadas para o fenótipo tipo efetor por co-IP seguido de LC:MS. Células T CD8⁺ cultivadas in vitro e polarizadas para o fenótipo efetor, não transduzidas ou transduzidas com vetores retrovirais contendo a sequência para shRNA para a deficiência em *Cbx4* foram processadas no último dia de cultivo para a obtenção do extrato proteico total. O extrato proteico foi utilizado para a co-imunoprecipitação (co-IP) de proteínas SUMOiladas utilizando anticorpo anti-SUMO1 e as proteínas recuperadas na co-IP foram identificadas por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas. Os resultados de proteínas SUMOiladas diferencialmente encontradas em cada condição foi representado em diagrama de Venn. Estão descritas na imagem as proteínas SUMOiladas encontradas exclusivamente em cada condição e em vermelho estão destacadas as proteínas mencionadas no texto.

5.11 Análise do papel de Cbx4 na regulação da acessibilidade da cromatina de células T CD8⁺ diferenciadas em resposta a infecção viral aguda por LCMV

Enquanto subunidade do complexo PRC1, a proteína Cbx4 tem o potencial de impactar diretamente a organização da estrutura de cromatina, impactando também o programa transcricional da célula. Uma vez que o PRC1 atua principalmente como um complexo epigenético que regula negativamente a transcrição gênica, através de mecanismos que incluem a deposição de marcas repressoras que sinalizam a compactação da cromatina, o prejuízo na sua função levaria ao impedimento da condensação de nucleossomos, aumentando a acessibilidade da cromatina. Portanto, foi investigado se a deficiência em Cbx4 impactaria a acessibilidade da cromatina e

se esse impacto correlacionaria com as alterações observadas na análise do perfil transcricional de células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4.

Para investigar a acessibilidade da cromatina em células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4, foi utilizado o mesmo desenho experimental já mencionado no experimento **5.1**, o modelo de transferência adotiva de células T CD8$^+$ P14 transduzidas in *vitro* deficientes em Cbx4 (silenciamento com shRNA) (Figura 9). De forma similar ao que foi feito para a análise do perfil transcricional (Figura 13), células T CD8$^+$ P14 transduzidas e transferidas adotivamente (Ametrina^{Hi}Thy1.1$^+$) de populações KLRG1^{Hi} e KLRG1^{Lo} foram isoladas por FACS e processadas para o ATAC-Seq (Figura 47A). Por limitações de recursos, apenas as células T CD8$^+$ Ametrina$^+$Thy1.1$^+$KLRG1^{Hi} deficientes em Cbx4 (“shCbx4”) ou controle (“shCD4”) foram processadas para o ATAC-Seq. A análise preliminar dos dados de ATAC-Seq permitiu a detecção de regiões diferencialmente acessíveis caracterizadas por um maior número de leituras em uma dada região, ilustrada na forma de picos na representação gráfica de faixa genômica (Figura 47B-H). Esses picos de acessibilidade diferencial estão marcados na figura com quadrados verdes acima das faixas genômicas (Figura 41B-H).

Ao avaliar os picos de acessibilidade diferencial em genes associados ao fenótipo efetor ou de memória foi possível observar alterações consistentes com as visualizadas nos resultados do RNA-Seq. Maiores níveis de acessibilidade da cromatina foram detectados na região promotora de genes associados ao fenótipo de memória como o *Tcf7* (Figura 41B, destacados por um retângulo vermelho) em células T CD8$^+$ P14 deficientes em Cbx4 (“shCbx4”) em comparação as células T CD8$^+$ controle (“shCD4”). Também foi observada maior acessibilidade em regiões de íntron no corpo do gene *Tcf7*, indicando um maior acesso a possíveis sítios regulatórios do gene. De forma concordante aos dados já vistos para a análise do perfil transcricional, em células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4 foi observada menor acessibilidade da cromatina em sítios genômicos que compõem a região promotora, o corpo ou regiões próximas ao gene de genes associados ao fenótipo efetor (Figura 41C-F). Estes incluem os genes que codificam moléculas de superfície *Klrg1* e *Cx3cr1* e os fatores de transcrição *Tbx21* e *Id2*. Em concordância com a hipótese de menor acessibilidade em regiões de genes associados ao fenótipo efetor, foi detectada também a menor acessibilidade em genes associados à função efetora de células T CD8$^+$ (Figura 38G e H), incluindo as proteínas citotóxicas *Gzmb* e *Prf1*.

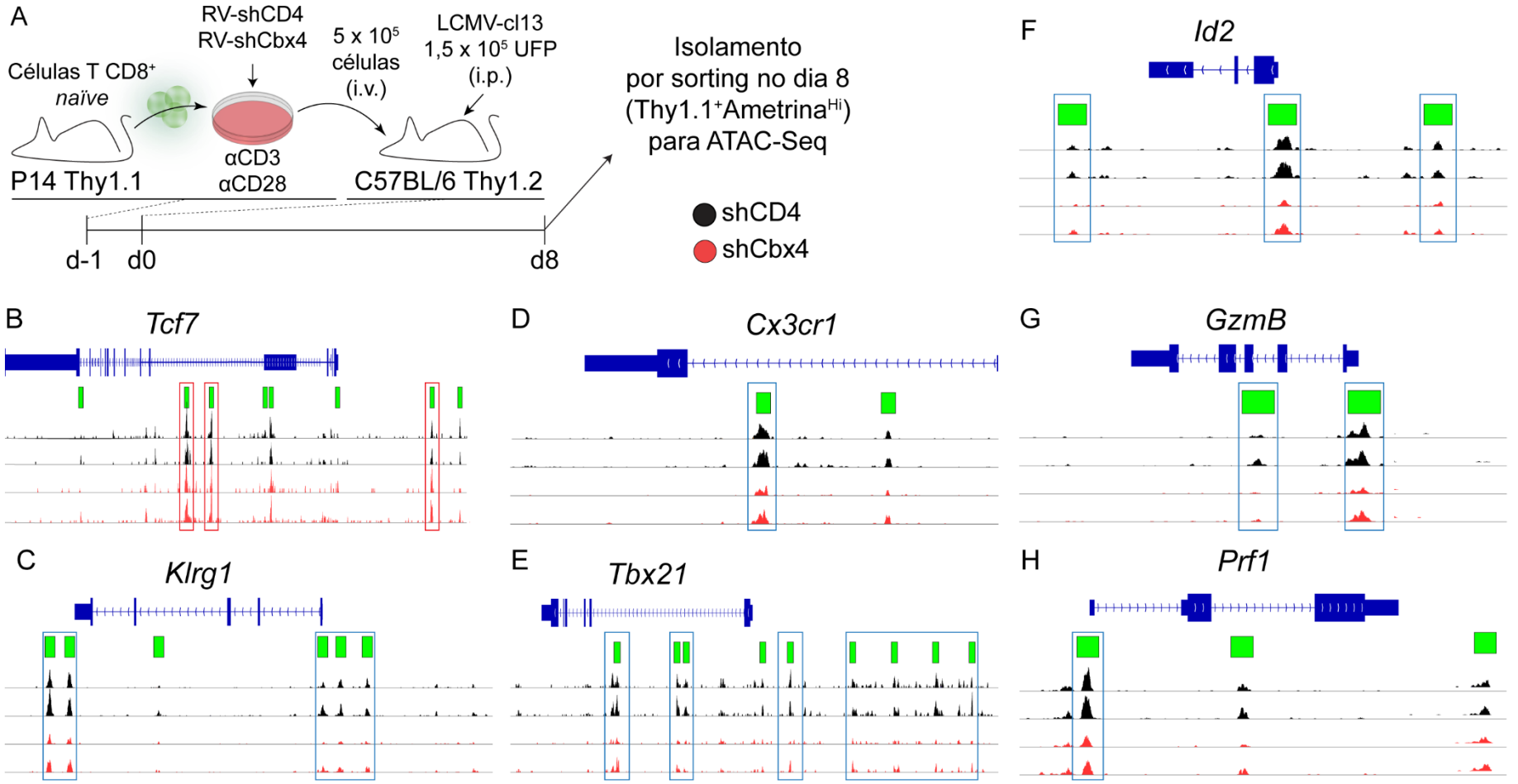


Figura 47. Análise da acessibilidade da cromatina por ATAC-Seq de células T CD8⁺ P14 deficientes em Cbx4. (**A**) Células T CD8⁺ *naïve* de camundongos de linhagem P14 Thy1.1 foram isoladas, ativadas e transduzidas com vetor retroviral *in vitro* e, no mesmo dia, transferidas para camundongos congênicos C57BL/6 Thy1.2 (5 x 10^5 células) por via intravenosa. No dia seguinte esses animais foram infectados por via intraperitoneal com 1,5 x 10^5 UFP de LCMV-cl13 para indução de infecção viral aguda. No 8º dia pós-infecção, os esplenócitos dos animais infectados foram isolados e as células T CD8⁺ transduzidas e transferidas adotivamente (Thy1.1⁺Ametrina^{Hi}) presentes nessa suspensão foram isoladas por FACS e processadas para a preparação de biblioteca de cromatina fragmentada e posteriormente analisadas por ATAC-Seq. (**B-H**) Visualização das faixas genômicas carregadas no programa Integrative Genomics Viewer (Broad Institute) contendo os dados de cassetes de exóns e íntrons de diferentes genes (em azul), as regiões diferencialmente acessíveis (em verde) e as faixas contendo as contagens normalizadas de leituras do ATAC-Seq de cada replicada analisada ilustradas em picos.

Os dados levantados na análise preliminar de acessibilidade da cromatina por ATAC-Seq corroboraram os dados obtidos por RNA-Seq, mostrando uma maior acessibilidade de genes associados ao fenótipo de memória e menor acessibilidade de genes associados ao fenótipo efetor em células T $CD8^+$ deficientes em Cbx4. Esse mesmo padrão foi observado, para a maioria desses genes, para expressão gênica por RNA-seq e expressão proteica por citometria de fluxo. A menor acessibilidade da cromatina em genes associados ao fenótipo ou função efetora na condição de deficiência em Cbx4 sugere um possível papel de regulador indireto desses genes, uma vez que Cbx4, atuando na modulação da cromatina como subunidade de PRC1, exerceria uma função repressora. É possível hipotetizar que Cbx4 estaria envolvido em mecanismos de regulação negativa de repressores epigenéticos de genes associados ao fenótipo e função efetora. Dessa maneira, a ausência de Cbx4 provocaria a desrepressão desses repressores, levando a diminuição da acessibilidade desses genes em células T $CD8^+$ deficientes em Cbx4. Novos experimentos de ATAC-Seq utilizando células T $CD8^+$ P14 $Ametrina^+Thy1.1^+KLRG1^{Lo}$ deficientes em Cbx4 estão sendo planejados para aquisição de mais dados e um panorama mais completo das alterações na cromatina de subpopulações de células T $CD8^+$ em diferenciação na fase aguda. Além disso, mais estudos focados na identificação dos alvos de Cbx4, tanto de sua função E3 SUMO ligase quanto de sua função de recrutamento de PRC1, são essenciais para compreender e elucidar o circuito regulatório exercido por essa proteína em células T $CD8^+$.

5.12 Análise da diferenciação de células T $CD8^+$ policlonais de camundongos $Cbx4^{fl/fl}Cd4^{Cre}$ (Cbx4 T KO) em resposta primária a infecção crônica por LCMV

Além da diferenciação de células T $CD8^+$ em células de fenótipo efetor ou células de fenótipo de memória, que ocorre no curso de uma resposta imune adaptativa frente a um quadro de infecção aguda, células T $CD8^+$ podem ainda entrar em um processo de diferenciação que resulta no estado de exaustão. Células T $CD8^+$ exaustas apresentam como características marcantes: (i) a perda da sua funcionalidade efetora, tanto em relação a produção de citocinas relacionadas a função efetora (p.ex.: IFN-γ, TNF e IL-2) quanto na produção de proteínas citotóxicas (p.ex.: granzimas e perforinas); (ii) a perda da capacidade proliferativa e de sobrevivência; (iii) o ganho da expressão de múltiplos receptores inibitórios (p.ex.: PD-1, Lag-3 e Tim-3), em altos níveis.

A investigação do papel de Cbx4 na diferenciação de células T CD8$^+$ no contexto de resposta aguda revelou que essa proteína poderia atuar no processo de diferenciação e controle de outros aspectos da célula, como a progressão do ciclo celular, através da regulação dos fatores de transcrição Tcf-1, Myb, T-bet e Eomes. Tendo em vista um possível eixo regulatório Cbx4-Tcf-1-Myb, e a importância desses fatores de transcrição para a diferenciação de células T CD8$^+$ exaustas e regulação da resposta efetora em condições de persistência antigênica, nosso grupo também interrogou o papel do modulador epigenético Cbx4 no contexto de uma resposta imune crônica, utilizando o modelo já bem descrito de infecção viral crônica por LCMV, cepa clone13 (LCMV-cl13) (Figura 48).

De forma similar aos experimentos realizados no modelo de infecção viral aguda, aqui também foram utilizados animais de linhagem de nocaute condicional para o gene Cbx4, Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre} e como grupo controle animais do genótipo Cbx4$^{fl/fl}$. Os animais foram infectados por LCMV-cl13, no inóculo de 4 x 10^6 UFP (i.v.) e no 45º dia pós-infecção os esplenócitos dos animais foram analisados para avaliar o fenótipo de células T CD8$^+$ exaustas antígeno-específicas medindo expressão de receptores inibitórios, atributo relevante para medir o grau de comprometimento das células T CD8$^+$ com um estado diferenciado de exaustão. Além disso foi analisada a expressão de fatores de transcrição T-bet, Eomes e Tcf-1, que também são relevantes para a análise do fenótipo de células T CD8$^+$ exaustas, e a funcionalidade das células pela expressão de citocinas pró-inflamatórias e proteína citotóxica Granzima B.

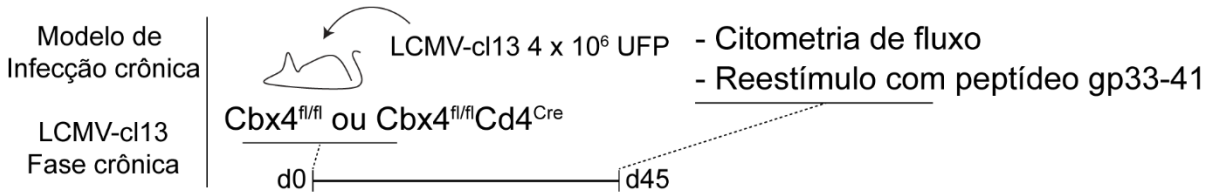


Figura 48. Desenho experimental para a análise da diferenciação de células T CD8$^+$ de camundongos Cbx4$^{fl/fl}$ e Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre} (Cbx4 T KO) em resposta a infecção viral crônica por LCMV. Animais da linhagem Cbx4$^{fl/fl}$, usados como grupo controle, e da linhagem Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre}, deficientes em Cbx4 em modelo de *nocaute* condicional foram infectados com LCMV-clone13 (LCMV-cl13) no inóculo de 4 x 10^6 UFP i.v.. Os esplenócitos dos animais infectados foram isolados e analisados por citometria de fluxo para investigação do fenótipo ou reestimulados *ex vivo* com peptídeo gp33-41, antígeno específico do LCMV, para investigação da funcionalidade das células no tempo de fase crônica da resposta, no 45º dia pós-infecção.

5.12.1 Análise fenotípica (LCMV-cl13, 45º dia pós-infecção)

Foi analisado o fenótipo das células T CD8$^+$ exaustas antígeno-específicas na população de esplenócitos recuperados de animais Cbx4 T KO (Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre}) e

animais do grupo controle ($Cbx4^{fl/fl}$) após 45 dias de infecção por LCMV-cl13 (Figura 49 e 50). Foi observado uma tendência de diminuição na frequência e número total da população de células T $CD8^+$ totais nos animais Cbx4 T KO, porém quando analisada a população de células LCMV-específicas (marcadas com tetrâmero) a tendência foi oposta, de aumento tanto na frequência quanto em número total (Figura 49A-D).

Em relação a expressão de receptores inibitórios, foram analisadas as frequências das subpopulações de células T $CD8^+$ antígeno-específicas positivas para um determinado receptor inibitório (Figura 49E-G). Foi notado uma significativa maior frequência de células T $CD8^+$ antígeno-específicas $PD1^+$ nos animais Cbx4 T KO, em comparação ao controle. No entanto, foi observada a tendência de diminuição da frequência de células positivas para os outros dois receptores inibitórios, Lag-3 e Tim-3. Em oposição ao que se viu na frequência, os níveis de expressão de PD-1 tenderam a ser menores em células T $CD8^+$ antígeno-específicas de animais Cbx4 T KO e em concordância com este achado, os níveis de expressão de Lag-3 e Tim-3 foram significativamente menores neste grupo (Figura 49H-J). Foi analisada também a frequência de células triplo produtoras de três dos principais receptores inibitórios expressos no contexto da exaustão de células T $CD8^+$: PD-1, Lag-3 e Tim-3 (Figura 49K, L). A múltipla expressão dos três receptores está associada a um maior comprometimento com o fenótipo de exaustão e, portanto, uma maior perda da funcionalidade e responsividade. Para definir a população de células triplo-produtoras foi primeiro definida a população de células positivas para ambos PD-1 e Lag-3 (*contour plot*) e, dentro dessa população, definidas as células positivas para o receptor Tim-3 (histograma) (Figura 49K). Foi observada a tendência de menor frequência de células triplo-produtoras de receptores inibitórios em células T $CD8^+$ antígeno-específicas de animais Cbx4 T KO, em comparação com as células dos animais controle, sugerindo uma menor representatividade de células T $CD8^+$ exaustas em estágios mais terminais de diferenciação com este fenótipo (Figura 49L). Além disso, foram medidos os níveis de expressão dos receptores inibitórios isoladamente dentro da população de células triplo-produtoras (Figura 49M-O). O que foi observado foram níveis menores de expressão de todos os três receptores inibitórios nas células T $CD8^+$ antígeno-específicas de animais Cbx4 T KO, em comparação as células dos animais do grupo controle.

Os resultados da análise fenotípica sugerem um menor comprometimento com o fenótipo de exaustão terminal nas células T CD8⁺ LCMV-específicas deficientes pra Cbx4, em comparação ao grupo controle. Isso é caracterizado pela menor frequência de células T CD8⁺ co-expressando múltiplos receptores inibitórios (PD-1⁺Lag-3⁺Tim3⁺) e menores níveis de expressão destes receptores, seja na população antígeno-específica total ou na população triplo-positiva para os receptores inibitórios.

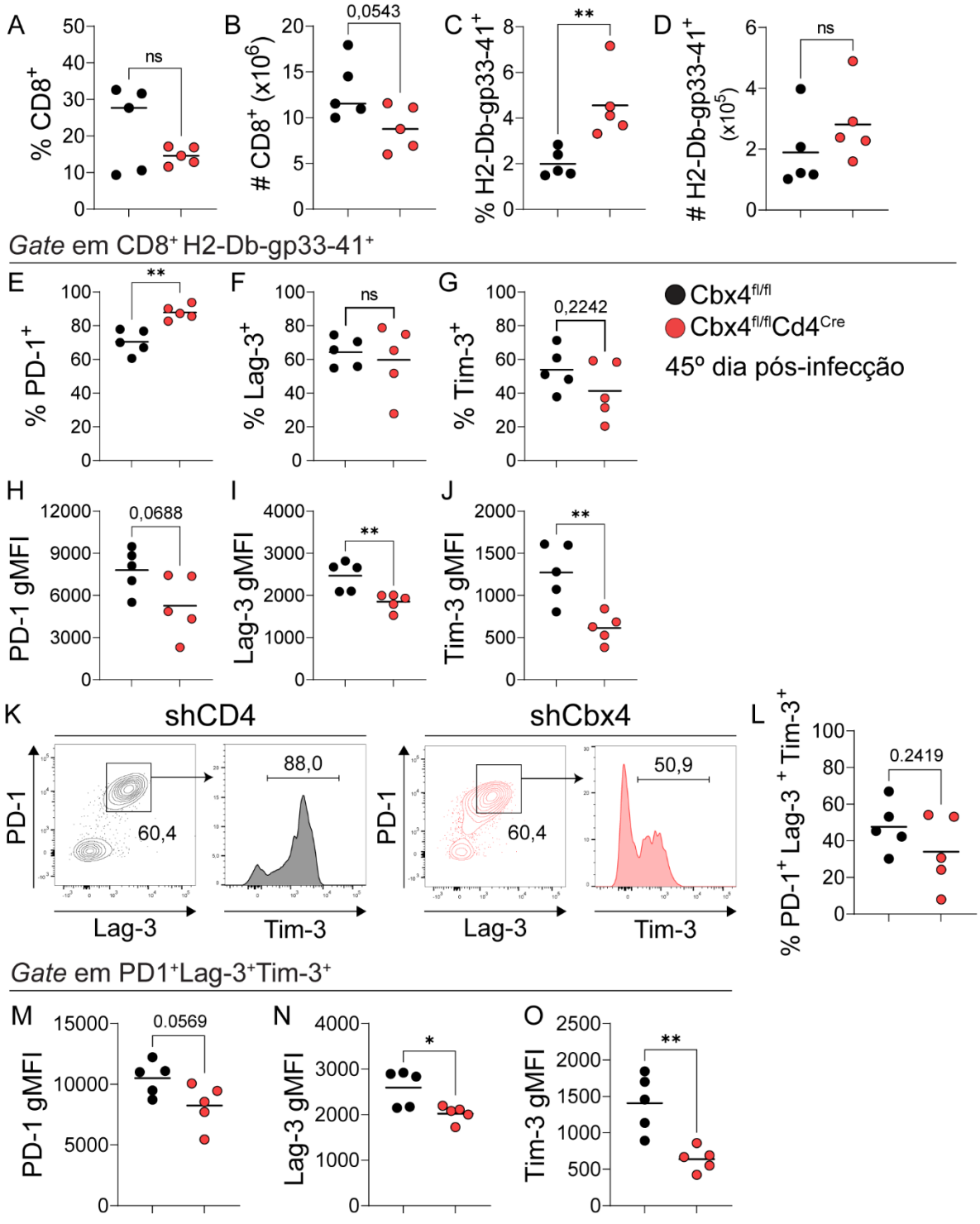


Figura 49. Análise fenotípica de células T CD8$^+$ de animais Cbx4 T KO diferenciadas em resposta a infecção viral crônica por LCMV. Os esplenócitos de animais do grupo controle ("Cbx4$^{fl/fl}$", em preto) e animais Cbx4 T KO ("Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre}", em vermelho) foram analisados por citometria de fluxo no 45º dia pós-infecção por LCMV-cl13 (4 x 10^6 UFP). (**A**) Frequência e (**B**) número total de células T CD8$^+$ e de (**C**, **D**) células T CD8$^+$ LCMV-específicas marcadas com molécula de tetrâmero. (**E-G**) Frequência e (**H-J**) níveis de expressão, em gMFI, de receptores inibitórios em células T CD8$^+$ LCMV-específicas. (**K**) *Contour plot* e histograma representativo da estratégia de *gate* utilizada para a definição subpopulação de células T CD8$^+$ triplo positivas para receptores inibitórios na análise fenotípica. (**L**) Frequência da subpopulação de células T CD8$^+$ triplo positivas para receptores inibitórios. (**G-I**) Níveis de expressão, quantificados por gMFI, de receptores inibitórios na população PD1$^+$Lag-3$^+$Tim3$^+$ de células T CD8$^+$ LCMV-específicas. Dados de um experimento independente (n = 5). Cada círculo representa um animal, barra representa o valor de média do grupo. ns = não significativo, *p < 0,05, **p < 0,01 calculado por teste t de Student bicaudal não pareado.

Para investigar em maiores detalhes as subpopulações de células T CD8$^+$ exaustas geradas no curso da resposta à infecção crônica por LCMV-cl13, os esplenócitos foram também analisados quanto a expressão das moléculas de superfície CD69 e Ly108 (Figura 50). Foi observado que células T CD8$^+$ antígeno-específicas de animais Cbx4 T KO apresentaram frequências significativamente maiores das populações de células T CD8$^+$ exaustas progenitoras em estágios de menor e maior comprometimento com o fenótipo de exaustão (CD69$^+$Ly108$^+$ e CD69$^-$ Ly108$^+$, respectivamente) em comparação aos animais controle (Cbx4$^{fl/fl}$) (Figura 50B). Consequentemente, foi observada a tendência de menores frequências das populações em estágio intermediário de exaustão (CD69$^-$Ly108$^-$) e estágio terminal de exaustão (CD69$^+$Ly108$^-$) (Figura 50B).

Esses resultados correlacionam positivamente com resultados prévios que demonstram que células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4 possuem regulação positiva (ao nível transcricional) dos fatores de transcrição Tcf-1 e Myb, associados com a geração de células T CD8$^+$ exaustas progenitoras. No entanto, quando analisado os níveis de expressão proteica de Tcf-1, não foi possível ver esse aumento. Também há concordância com a análise de expressão de receptores inibitórios, onde foi observado em células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4 menores níveis de expressão de PD-1, Lag-3 e Tim3 e menor frequência da população positiva para os três receptores, característica de células em estágio terminal de exaustão. Outra concordância é a maior expressão de T-bet em células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4, fator de transcrição associado aos estágios de células exaustas progenitoras em proliferação em células exaustas intermediárias.

Em resumo, a análise fenotípica de células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4 diferenciadas em resposta à infecção crônica indicou por vários parâmetros que a

ausência do modulador epigenético Cbx4 provocou um desvio para um menor comprometimento das células T CD8⁺ com o fenótipo de exaustão, sendo observado a regulação negativa de fatores associados ao fenótipo de exaustão terminal e o aumento de subpopulações de células T CD8⁺ exaustas progenitoras.

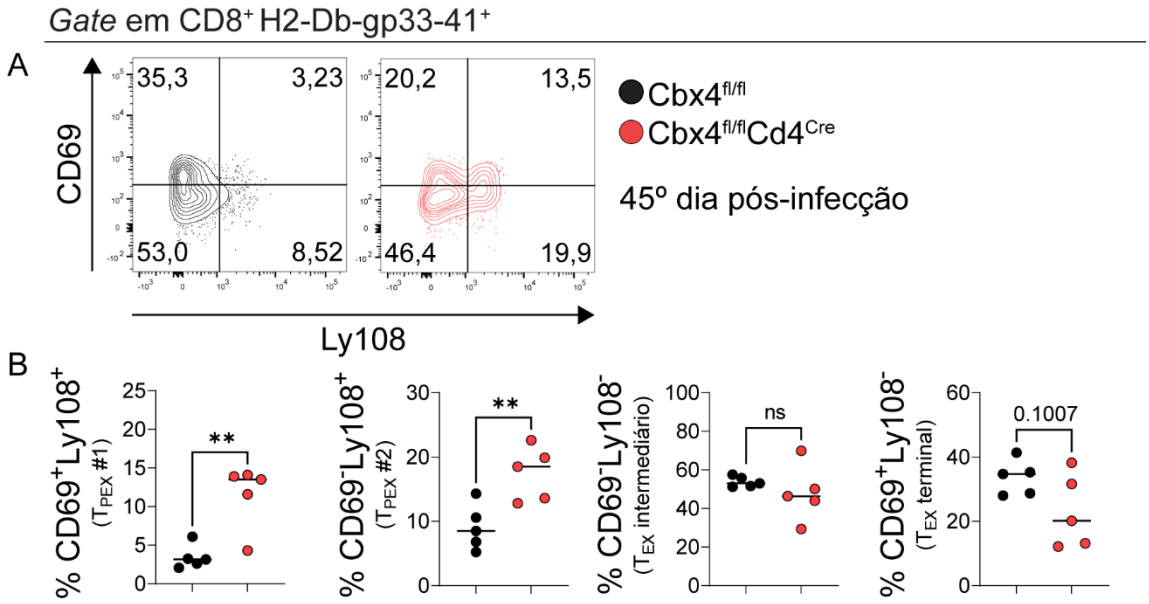


Figura 50. Análise subpopulações em diferentes estágios de exaustão de células T CD8⁺ de animais Cbx4 T KO diferenciadas em resposta a infecção viral crônica por LCMV. Os esplenócitos de animais do grupo controle ("Cbx4$^{fl/fl}$", em preto) e animais Cbx4 T KO ("Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre}", em vermelho) foram analisados por citometria de fluxo no 45º dia pós-infecção por LCMV-cl13 (4 x 10^6 UFP). (**A**) *Contour plot* representativo da estratégia de *gate* utilizada para a definição de subpopulações de células T CD8⁺ em diferentes estágios de exaustão, caracterizadas pela expressão das moléculas Ly108 e CD69. (**B**) Frequência da subpopulação de células T CD8⁺ em diferentes estágios de exaustão. Dados de um experimento independente (n = 5). Cada círculo representa um animal, barra representa o valor de média do grupo. ns = não significativo, **p < 0,01 calculado por teste t de Student bicaudal não pareado.

A análise fenotípica foi complementada com a análise dos níveis de expressão de fatores de transcrição T-bet, Eomes e Tcf-1 (Figura 51). Células T CD8⁺ antígeno-específicas de animais Cbx4 T KO apresentaram maiores níveis de expressão de T-bet de forma estatisticamente significativa quando comparadas com células de animais do grupo controle (Figura 51A). A tendência de menores níveis de expressão de Eomes e Tcf-1 nessas células também foi observada (Figura 51B, C). Corroborando esses resultados, a razão da expressão de T-bet sobre Eomes foi maior em células T CD8⁺ antígeno- específicas de animais Cbx4 T KO (Figura 51D).

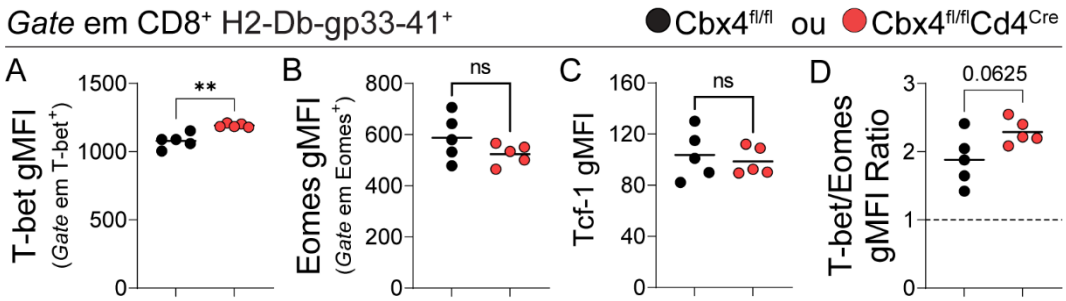


Figura 51. Análise da expressão de fatores de transcrição associados ao fenótipo efetor ou de memória em células T CD8⁺ de animais Cbx4 T KO diferenciadas em resposta a infecção viral crônica por LCMV. Os esplenócitos de animais do grupo controle ("Cbx4$^{fl/fl}$", em preto) e animais Cbx4 T KO ("Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre}", em vermelho) foram analisados por citometria de fluxo no 45º dia pós-infecção por LCMV-cl13. Níveis de expressão, quantificados por gMFI, dos fatores de transcrição (**A**, **D**) T-bet, (**B**, **E**) Eomes e (**G**, **H**) Tcf-1 em células T CD8⁺ LCMV-específicas nas subpopulações KLRG1⁺ (**A-C**, **G**) e KLRG1⁻ (**D-F**, **H**). (**C**, **F**) Razão dos valores de nível de expressão em gMFI dos fatores de transcrição T-bet e Eomes. Dados de um experimento independente (n = 5). Cada círculo representa um animal, barra representa o valor de média do grupo. ns = não significativo, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 calculado por teste t de Student bicaudal não pareado.

5.12.2 Análise funcional (LCMV-cl13, 45º dia pós-infecção)

Além da análise fenotípica, foi também avaliada a funcionalidade de células T CD8⁺ exaustas antígeno-específicas, observadas no 45º dia pós-infecção por LCMV-cl13, de animais Cbx4 T KO (Figura 52). Em resultados preliminares, não foi encontrada diferença significativa na frequência da população de células duplo-produtoras de IFN-γ e TNF (IFN-γ⁺TNF⁺) quando comparados os dois grupos analisados (Figura 52A, B). Quando avaliada a frequência das populações positivas para IFN-γ ou TNF, foi encontrada diferença apenas na primeira, onde as células T CD8⁺ antígeno-específicas deficientes em Cbx4 apresentaram uma tendência de maior frequência (Figura 52C, D). Os níveis de expressão, medidos por gMFI, acompanharam o mesmo padrão observado na frequência (Figura 52E, F). Quanto a produção da proteína citotóxica Granzima B, células T CD8⁺ antígeno-específicas de animas Cbx4 T KO apresentaram uma menor frequência de células positivas para Granzima B. Porém, quando comparado os níveis de expressão da molécula, as células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 mostraram uma ligeira tendência de maior produção da proteína citotóxica, quando comparado com as células do grupo controle (Figura 52G, H).

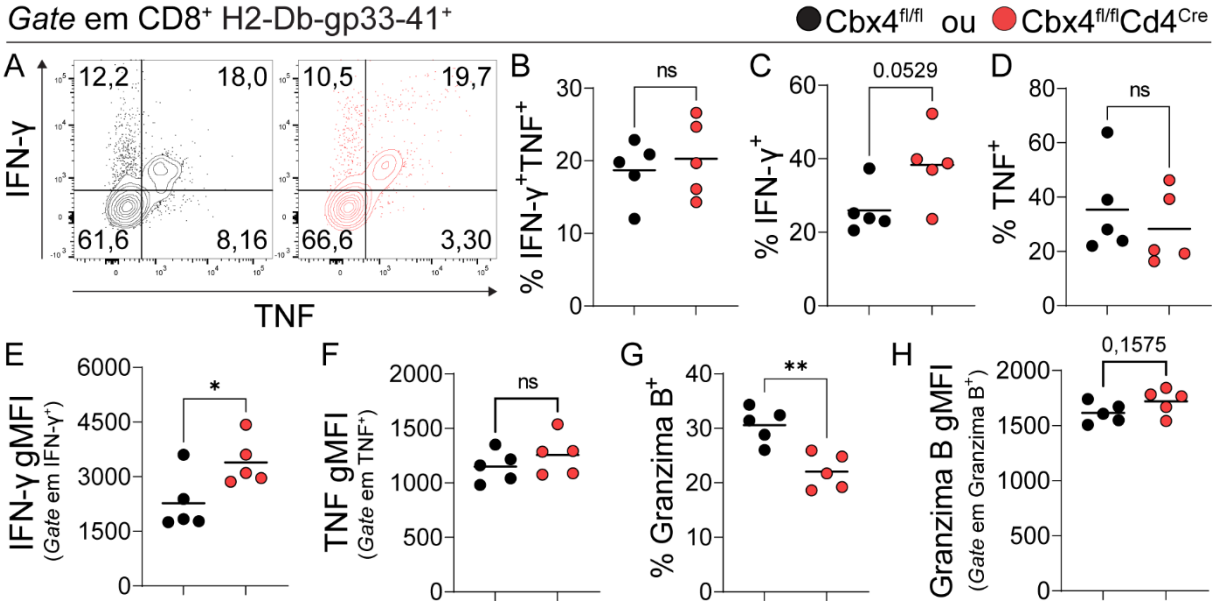


Figura 52. Análise funcional de células T CD8⁺ de animais Cbx4 T KO diferenciadas em resposta a infecção viral crônica por LCMV. Os esplenócitos de animais do grupo controle ("Cbx4$^{fl/fl}$", em preto) e animais Cbx4 T KO ("Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre}", em vermelho) foram isolados no 45º dia pós-infecção e reestimulados *ex vivo* com o peptídeo recombinante gp33-41 (0,2 µg/mL), na presença de Brefeldina A, por quatro horas. Em seguida, as células foram analisadas por citometria de fluxo. (A) *Contour plot* representativo da *gate* utilizada para a definição das subpopulações de células T CD8⁺ exaustas na análise funcional. (B-D) Frequência de células T CD8⁺ antígeno-específicas produtoras de IFN-γ e/ou TNF. (E, F) Níveis de expressão das citocinas pró-inflamatórias IFN-γ e TNF. (G) Frequência e (H) e níveis de expressão de Granzima B em células T CD8⁺ antígeno-específicas. Dados de um experimento independente (n = 5). Cada círculo representa um animal, barra representa o valor de média do grupo. ns = não significativo, *p < 0,05, **p < 0,01 calculado por teste t de Student bicaudal não pareado.

A análise funcional de células T CD8⁺ exaustas deficientes em Cbx4 em resposta a infecção crônica não apresentou os mesmos resultados observados em células T CD8⁺ efetoras (infecção viral aguda primária, no 8º dia pós-infecção, ou diferenciadas *in vitro* para o fenótipo tipo efetor), onde foi observada a tendência de queda da expressão de citocinas pró-inflamatórias IFN-γ e TNF, além da queda da população duplo produtora de ambas as citocinas. Ao contrário, em células T CD8⁺ exaustas foi observado a tendência de aumento da expressão de ambas as citocinas (sendo significativo para IFN-γ) e da população IFN-γ⁺TNF⁺. Além disso, pode-se notar a queda na frequência de células T CD8⁺ exaustas antígeno-específicas produtoras de Granzima B. Seguindo a hipótese de que Cbx4 é um regulador negativo do fator de transcrição Myb, esses resultados se alinham apenas parcialmente com a descrição de que Myb regula negativamente a função efetora pró-inflamatória e citotóxica em células T CD8⁺ exaustas. Em conjunto, as evidências sugerem que o impacto de Cbx4, e da sua deficiência, em células T CD8⁺ é complexo e envolve múltiplos reguladores da diferenciação e função dessas células, que podem estar representados de forma distinta em tipos de resposta diferentes. Outros estudos

explorando melhor o papel de Cbx4 na funcionalidade de células T CD8$^+$ em respostas agudas ou crônicas, abordando tanto a modulação da função efetora de células T CD8$^+$ efetoras e exaustas, quanto o potencial de reativação de células de memória em respostas secundárias são necessários, não somente para a melhor compreensão dos mecanismos que regem esses processos, mas também para a melhoria de estratégias imunoterapêuticas.

6 DISCUSSÃO

Os resultados gerados no presente trabalho revelam que a proteína Cbx4, que pode atuar como subunidade do complexo epigenético cPRC1, participa do processo de diferenciação de células T CD8$^+$ inibindo o fenótipo de memória. Em células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4, foi verificado um desvio para o fenótipo de memória caracterizado tanto por alterações no fenótipo quanto na expressão gênica (Figura 53A). Cbx4 também atua como regulador positivo da função efetora de células T CD8$^+$, controlando a função citotóxica e a produção de citocinas pró-inflamatórias, e a ausência de Cbx4 provocou o prejuízo dessa função (Figura 53A). Em concordância, a superexpressão de Cbx4 em células T CD8$^+$ provocou a diminuição da expressão (tanto ao nível proteico quanto ao transcricional) de moléculas de memória (CD127 e CD62L), o aumento da expressão de moléculas associadas ao fenótipo efetor (CD25) e da produção de citocinas pró-inflamatórias (Figura 53A).

Investigamos ainda o mecanismo de atuação de Cbx4 na regulação da diferenciação e função de células T CD8$^+$: através da função dependente de seu cromodomínio ou da função dependente de seus dois motivos de interação com SUMO (SIM). A superexpressão de mutantes funcionais para cada um desses domínios (ΔChromo e ΔSIM1-2) indicou que ambos são requeridos no controle da diferenciação e função de células T CD8$^+$, embora a participação no processo seja principalmente dependente dos motivos SIM (Figura 53B). Também foi notado que Cbx4 possui um importante papel no controle do ciclo celular, proliferação e sobrevivência de células T CD8$^+$, principalmente de maneira dependente do cromodomínio (Figura 53B).

Além disso, Cbx4 está envolvido na repressão dos fatores de transcrição Eomes (*Eomes*), Tcf-1 (*Tcf7*) e Myb (*Myb*), cruciais para o comprometimento com o fenótipo de memória e na manutenção do potencial progenitor de células T CD8$^+$

(Figura 53A). A repressão de *Myb* foi perdida na condição de superexpressão de Cbx4 ΔSIM1-2, corroborando a hipótese de que os motivos SIM possuem papel chave na diferenciação de células T $CD8^+$. Resultados preliminares também mostraram o enriquecimento da deposição de H2AK119Ub no TSS de *Tcf7*. Essa pode ser uma evidência do recrutamento de cPRC1 para esse *locus*, o qual pode ser mediado por Cbx4 de maneira cromodomínio-dependente. A investigação de possíveis proteínas alvo da função SUMO E3 ligase mediada pelos domínios SIM de Cbx4 apontou para alguns candidatos que poderiam estar envolvidos com a regulação da diferenciação de células T $CD8^+$, no entanto mais estudos focados nesses alvos são necessários.

Por fim, a investigação do papel de Cbx4 na diferenciação de células T $CD8^+$ em um contexto de resposta crônica revelou sua participação na determinação do fenótipo de exaustão. Os resultados sugerem que Cbx4 se opõe à diferenciação para o fenótipo de células T $CD8^+$ exaustas precursoras, mais uma vez evidenciando o seu papel na repressão de um fenótipo menos terminalmente diferenciado e com características progenitoras (Figura 53C). A deficiência em Cbx4 provocou a diminuição da frequência de células expressando múltiplos receptores inibitórios ($PD1^+Lag\text{-}3^+Tim\text{-}3^+$) e dos níveis de expressão destes receptores, características associadas à diferenciação terminal para o fenótipo de exaustão. Em concordância, observamos o aumento da frequência de células T $CD8^+$ T_{PEX} e o aumento da expressão de T-bet, associado à população de células T $CD8^+$ exaustas que retém função efetora e capacidade proliferativa (Figura 53C).

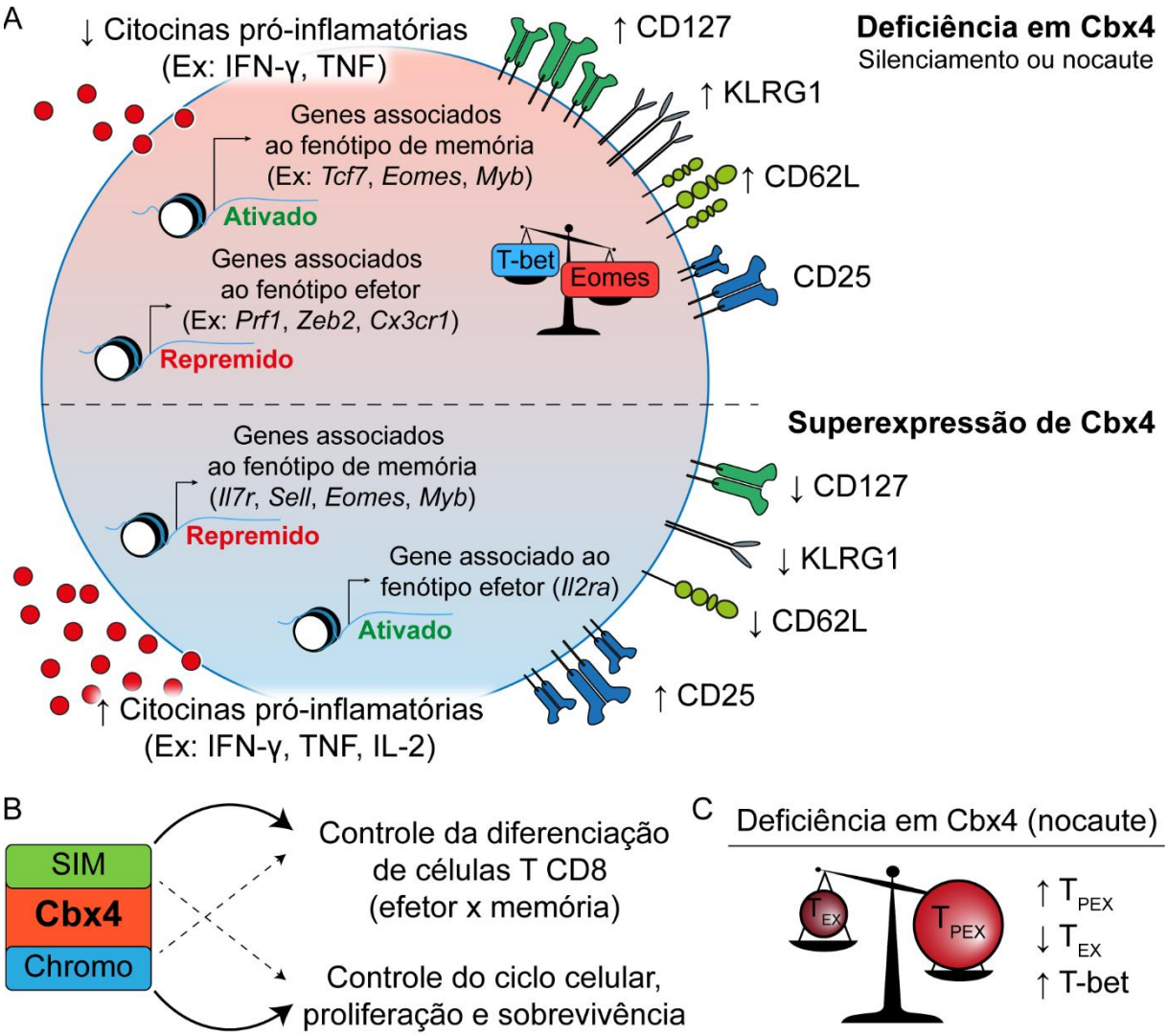


Figura 53. Resumo gráfico dos principais resultados. Principais evidências levantadas na investigação de células T CD8⁺ deficientes em Cbx4 ou super expressando Cbx4 (WT ou formas mutantes), diferenciadas *in vitro* ou em modelo de infecção viral aguda ou crônica por LCMV. (A) A deficiência em Cbx4 aumenta a expressão de moléculas de superfície (CD127 e CD62L) e perfil transcricional (Ex: *Tcf7*, *Eomes*, *Myb*) associados ao fenótipo de memória. Em animais $Cbx4^{fl/fl}Cd4^{Cre}$ foi observada uma menor taxa da razão T-bet/Eomes, indicando o favorecimento do fator de transcrição associado ao fenótipo de memória. Também foi observada menor expressão de genes associados ao fenótipo efetor e menor função efetora, caracterizada, principalmente, na queda da produção de citocinas pró-inflamatórias. Em contrapartida, a superexpressão de Cbx4 provocou a queda da expressão de CD127 (*Il7r*) e CD62L (*Sell*) e o aumento da expressão da molécula associada ao fenótipo efetor CD25 (*Il2ra*) e da produção de citocinas. De forma contraintuitiva, a molécula associada ao fenótipo efetor KLRG1 foi encontrada aumentada na deficiência em Cbx4 e diminuída na sua superexpressão, porém a regulação dessa proteína pode estar associada a outros processos biológicos da célula T CD8⁺ afetados por Cbx4, como o controle do ciclo celular. (B) Foi observado que Cbx4 atua no controle da diferenciação no fenótipo efetor/memória principalmente através dos seus motivos SIM (seta contínua) e parcialmente através de seu cromodomínio (seta tracejada). No entanto, para o controle do ciclo celular, proliferação e sobrevivência, este papel se alterna e o cromodomínio é o principal componente nessa regulação. (C) Cbx4 também participa do controle da diferenciação de células T CD8⁺ em resposta imune crônica, antagonizando a diferenciação para o fenótipo de células T CD8⁺ exaustas progenitoras (T_{PEX}) e favorecendo a diferenciação no fenótipo de exaustão terminal (T_{EX}), uma vez que na sua deficiência é observado o favorecimento da diferenciação no fenótipo T_{PEX}. A deficiência em Cbx4 também aumenta T-bet, associado à geração de células exaustas com capacidade funcional aumentada.

Diferentes modelos foram empregados para a investigação do papel de Cbx4 na diferenciação de células T CD8$^+$. Além disso, a deficiência em Cbx4 foi induzida em diferentes estratégias, por silenciamento com shRNA ou nocaute condicional por sistema loxP-Cre. Embora tenha sido observada a reprodução consistente de algumas das evidências centrais entre os diferentes modelos, alguns dos achados não foram encontrados em todos os modelos, ou foram conflitantes. As evidências convergentes e discrepantes encontradas a respeito da regulação de Cbx4 sobre o processo de diferenciação de células T CD8$^+$ para o fenótipo efetor ou de memória serão discutidas em maiores detalhes a seguir.

6.1 Cbx4 reprime a diferenciação para o fenótipo de memória e favorece a diferenciação para o fenótipo efetor

De forma consistente, foi demonstrado que Cbx4 regula negativamente a expressão de moléculas de superfície associados ao fenótipo de memória e de genes que integram a assinatura transcricional de células T CD8$^+$ de memória e, portanto, atua na repressão da diferenciação de células T CD8$^+$ nesse fenótipo. Em todas as estratégias empregadas, a deficiência ou a superexpressão de Cbx4 resultou no aumento ou diminuição da expressão do receptor CD127, respectivamente. Nos modelos de diferenciação *in vitro*, foi observado o papel regulador negativo de Cbx4 sobre CD62L, marcador associado ao fenótipo de memória central (Figuras 23 e 36) e em suporte a esse dado, a superexpressão de Cbx4 provocou a redução da frequência de células CD62L$^+$CD127$^+$.

A regulação dessas moléculas de superfície associadas ao fenótipo de memória ocorreu tanto no nível proteico quanto transcricional. Foram detectadas outras alterações na expressão gênica de células T CD8$^+$ P14 deficientes em Cbx4 em resposta à LCMV-Arm, com destaque para o aumento da expressão dos fatores de transcrição associados ao fenótipo de memória *Tcf7*, *Eomes* e *Myb* e redução de genes associados ao fenótipo efetor, como *Klrg1*, *Cx3cr1*, *Prf1*, *Runx1* e *Zeb2*, sugerindo um desvio para um perfil transcricional associado ao fenótipo de memória. Essa hipótese foi testada e corroborada pelo enriquecimento da assinatura gênica de células T CD8$^+$ T_{MPEC} nos DEGs achados na comparação de células T CD8$^+$ P14 deficientes em Cbx4 com células T CD8$^+$ P14 controle. Além disso, foi comprovado que essas alterações não decorriam do aumento da população de células T CD8$^+$

T_{MPEC} na condição de deficiência, e sim de uma alteração global em todas as células deficientes em Cbx4.

A análise da expressão de *Tcf7* em células T CD8$^+$ policlonais diferenciadas *in vitro* para os fenótipos tipo efetor ou tipo memória revelou o aumento da expressão do fator de transcrição apenas na segunda condição, corroborando em parte os resultados encontras na análise de RNA-Seq. Uma possível explicação é a de que a forte sinalização empregada para a ativação e diferenciação *in vitro* para o fenótipo tipo efetor provoca um fenótipo robusto mascarando ou neutralizando o efeito causado pela deficiência em Cbx4. Em linha com essa hipótese, a análise fenotípica dessas células revelou um efeito mais potente de aumento das moléculas CD127 e CD62L em células T CD8$^+$ polarizadas para o fenótipo tipo memória. Esse resultado também evidencia que Tcf-1 não é o único regulador determinante para o controle da diferenciação de células T CD8$^+$ de memória. Por exemplo, o gene *Eomes* é visto regulado positivamente na análise de RNA-Seq de células silenciadas para Cbx4 e a análise da expressão gênica por RT-qPCR de células T CD8$^+$ P14 super expressando Cbx4 mostrou a redução da expressão de *Eomes*, mas não de *Tcf7*.

6.1.1 Discrepância entre os modelos: Condições diferentes de ativação e diferenciação de células T CD8$^+$

Um ponto de divergência importante foi visto entre os resultados encontrados na estratégia de transferência adotiva de células T CD8$^+$ P14 com silenciamento de Cbx4 com os efeitos encontrados no nocaute condicional de Cbx4 em células T CD8$^+$ policlonais diferenciadas em resposta à infecção viral aguda por LCMV. Embora tenha sido observado o aumento da frequência e número absoluto de células T CD8$^+$ T_{MPEC} e células duplo positivas para KLRG1 e CD127, e diminuição para a subpopulação de células T CD8$^+$ T_{SLEC}, na estratégia de silenciamento durante a fase aguda da infecção (8º dia pós-infecção), o mesmo não foi detectado no modelo de nocaute condicional no mesmo tempo de resposta. Ao invés disso, esse efeito foi verificado na fase tardia (na análise do 60º dia pós-infecção).

Uma das possíveis explicações é a de que essas diferenças são derivadas das condições de ativação e diferenciação distintas entre os modelos utilizados nos experimentos. Na abordagem de deficiência em Cbx4 em células T CD8$^+$, estas foram uniformemente ativadas *in vitro* através do forte estímulo com anticorpos agonistas para a proteína CD3ζ do complexo TCR e para o receptor co-estimulatório CD28,

representando uma condição artificial em comparação à condição complexa e dinâmica de sinais presentes no microambiente de ativação *in vivo*. Somado a isso, na estratégia de transferência adotiva, as células ativadas e transduzidas *in vitro* foram transferidas em alto número para animais recipientes, o que estabelece uma dinâmica de resposta imune diferente da resposta conduzida por células T $CD8^+$ antígeno-específicas endógenas.

É descrito na literatura que a cinética e magnitude da resposta imune de células T $CD8^+$ transgênicas transferidas adotivamente é diferente da exibida por células endógenas em uma maneira dose-dependente (BADOVINAC; HARING; HARTY, 2007; MARZO et al., 2005). Além disso, o número de células T $CD8^+$ transgênicas transferidas adotivamente para animais desafiados em modelo de infecção aguda também é um fator decisivo para a diferenciação destas células (BADOVINAC; HARING; HARTY, 2007; MARZO et al., 2005). Em acréscimo, um maior número de células T $CD8^+$ respondedoras pode estar associado a maior eficiência de eliminação do patógeno (EHL et al., 1998), levando à redução da exposição ao antígeno, encurtamento da duração da infecção e consequente diminuição da sinalização associada a esses fatores, o que pode alterar a diferenciação de células T $CD8^+$ (BADOVINAC; HARTY, 2007; CUI et al., 2009; JOSHI et al., 2007; KAECH; CUI, 2012; PRLIC; HERNANDEZ-HOYOS; BEVAN, 2006). Dito isso, a resposta de células T $CD8^+$ transgênicas transferidas adotivamente e a resposta mediada por células T $CD8^+$ policlonais endógenas possuem uma sinalização antigênica e inflamatória distinta e, consequentemente, processos de diferenciação no fenótipo efetor ou de memória também distintos.

Considerando que a função de Cbx4 no mecanismo molecular de diferenciação de células T $CD8^+$ poderia ser modulada pela sinalização associada ao processo de ativação e pelos sinais inflamatórios expostos às células no curso da resposta, é possível conjecturar que as condições diferentes de ativação e diferenciação impactem o efeito observado pela deficiência deste modulador epigenético. Em suporte a essa ideia, diversos trabalhos já relataram a ativação ou a função de outras proteínas Polycomb acoplada à sinalização do complexo TCR, como Ezh2, Cbx7, Pcgf2 e Jarid-2 (DOBENECKER et al., 2018; HOD-DVORAI et al., 2011; LI et al., 2014b; PEREIRA et al., 2014).

Outro aspecto distinto entre os experimentos utilizando células T CD8$^+$ P14 e policlonais é que na população policlonal encontram-se clones de células T CD8$^+$ específicos para outros epítopos imunodominantes (np396-404 e gp34-43) ou subdominantes (gp276-286) do LCMV além das células T CD8$^+$ específicas para o peptídeo gp33-41 (especificidade representada pela célula T CD8$^+$ transgênica P14) (HERRATH; WHITTON, 2000; WHERRY et al., 2003). A resposta dos diferentes clones, apesar de semelhante, possui diferenças notáveis em relação ao potencial proliferativo e função efetora, como a capacidade citotóxica e produção de citocinas pró-inflamatórias IFN-γ e TNF (WHERRY et al., 2003), o que indica também diferenças na sinalização associada ao reconhecimento do antígeno. Dessa maneira, seguindo a hipótese de que a ativação ou recrutamento da função de Cbx4 está abaixo da sinalização via TCR, um fator que pode colaborar para a discrepância nos resultados é a presença de respostas derivadas pelo reconhecimento de epítopos diferentes na população de células T CD8$^+$ policlonais. Para esclarecer esse ponto, novos experimentos analisando populações de células específicas para outros epítopos imunodominantes em animais Cbx4 T KO poderiam revelar se os efeitos causados pela deficiência deste modulador epigenético estão relacionados à força de sinalização intrínseca ao TCR associados ao epítopo do vírus.

6.1.2 Discrepância entre os modelos: Efeitos compensatórios no modelo de Cbx4 T KO (Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre})

Uma outra explicação para a discrepância entre os diferentes modelos usados aqui é a de que no modelo animal de nocaute condicional de Cbx4 haja compensação funcional da proteína por outra isoforma da proteína Chromobox, que poderia tomar seu lugar na composição do complexo epigenético cPRC1 (GAO et al., 2012; MELO et al., 2022). Já foi relatado anteriormente na literatura que isoformas de Cbx podem compensar a função uma da outra. Por exemplo, a função de Cbx7 em células-tronco embrionárias murinas poderia ser substituída por Cbx2, Cbx4 ou Cbx8 (MOREY et al., 2012; O'LOGHLEN et al., 2012). No entanto, essa compensação contemplaria apenas a função de Cbx4 desempenhada em cooperação com o cPRC1, o recrutamento do complexo para áreas marcadas por H3K27me3 mediado pelo cromodomínio (BERNSTEIN et al., 2006), uma vez que Cbx4 é a única isoforma de Chromobox (identificada até o presente momento) onde foram descritos motivos SIM (KAGEY; MELHUISH; WOTTON, 2003; MERRILL et al., 2010). Sendo assim, a função E3

SUMO ligase ou sinalização mediada pela interação com SUMO permaneceriam ausentes mesmo caso ocorra a compensação.

Em suporte à essa hipótese, já foi relatado que Cbx2 regula a proliferação e desenvolvimento de timócitos, e em timócitos DN3 esta isoforma de Chromobox se liga ao *locus* genômico do inibidor do ciclo celular *Cdkn2a* em parceria com outro componente do cPRC1, Pcgf4 (Bmi-1), atuando na manutenção da sua repressão mediada por H3K27me3 (CORÉ et al., 1997; MIYAZAKI et al., 2008). Também é conhecido que Cbx7 atua em células T $CD4^+$ maduras regulando negativamente o processo de apoptose dessas células através da repressão do gene para a proteína pró-apoptótica FasL/CD95L (LI et al., 2014b). Portanto, existem evidências da atuação de outras proteínas Cbx em timócitos e em células T maduras, sugerindo que as proteínas Cbx capazes de compor o cPRC1 (Cbx2, Cbx4, Cbx6, Cbx7 ou Cbx8) podem atuar de forma redundante e compensar a ausência uma da outra nesta linhagem.

Resultados preliminares do nosso grupo mostraram que há maior expressão gênica (quantificada por RT-qPCR) de Cbx2 e Cbx8 em células T $CD8^+$ naïve de animas $Cbx4^{fl/fl}Cd4^{Cre}$ em comparação a animais controle ($Cbx4^{fl/fl}$) (dados não mostrados). Mais experimentos estão sendo planejados para a validação desses resultados, quantificando a expressão gênica e proteica das outras isoformas de Cbx que integram o cPRC1 tanto no estado de célula T $CD8^+$ *naïve* quanto após a ativação das células.

Além disso, uma perspectiva para o futuro do projeto é a caracterização do perfil de expressão de proteínas Polycomb em células T $CD8^+$ por abordagens de proteômica. Pouco é conhecido sobre a composição dos complexos em células T $CD8^+$ e os relatos descrevem a atuação de uma ou poucas subunidades em cooperação (MELO et al., 2022). Através da co-imunoprecipitação de proteínas associadas a uma determinada proteína Polycomb (por exemplo, Cbx4, Ring1a/b ou Ezh2) é possível investigar a possível composição e a identificação da variante do complexo PRC. Essa é uma informação crucial para o entendimento dos mecanismos moleculares mediados por proteínas Polycomb, uma vez que há uma grande heterogeneidade na composição dos complexos e as diferentes variantes podem exercer funções diferentes (BLACKLEDGE; KLOSE, 2021; PIUNTI; SHILATIFARD, 2021).

6.2 Cbx4 regula a geração e manutenção de células T CD8$^+$ de memória

Nossos resultados mostraram que Cbx4 regula a geração da população de células T CD8$^+$ de memória em resposta a infecção viral aguda por LCMV. Foi observado o aumento significativo em frequência e número de células T CD8$^+$ P14 T_{MPEC} (KLRG1$^-$CD127$^+$) no 8º dia pós-infecção na estratégia de deficiência em Cbx4 e o aumento significativo do número de células T CD8$^+$ de memória (KLRG1$^-$CD127$^+$) no 60º dia pós-infecção na estratégia de nocaute condicional. Esses achados se alinham com outros resultados que mostram o aumento da expressão gênica dos fatores de transcrição associados ao fenótipo de memória, *Tcf7*, *Eomes* e *Myb*, e o favorecimento da expressão proteica de Eomes na razão com a expressão do fator de transcrição T-bet. Outra evidência que sugere o favorecimento da geração de células T CD8$^+$ de memória é a queda de CXCR3, receptor associado ao fenótipo de memória efetora. No entanto, a associação de CXCR3 com o fenótipo efetor ou de memória é controversa e dependente de contexto. Algumas evidências mostram que a expressão do receptor pode estar associada a diferenciação terminal de células T CD8$^+$, porém outras mostram que a expressão do receptor é necessária para a geração de memória protetora (ARSENIO et al., 2014; KOHLMEIER et al., 2011; KURACHI et al., 2011; SLÜTTER et al., 2013).

Corroborando as evidências encontradas nos modelos de deficiência, a superexpressão de Cbx4 em células T CD8$^+$ P14 polarizadas para o fenótipo tipo memória *in vitro* provocou a diminuição na frequência de células T CD8$^+$ com fenótipo de memória central (CD127$^+$CD62L$^+$), e a diminuição da expressão de ambos as moléculas tanto no nível proteico quanto transcricional. Nos modelos de diferenciação *in vivo* em resposta à infecção viral aguda por LCMV foram obtidos resultados menos claros em respeito a esse efeito. Foi observada uma discreta tendência de redução no número absoluto de células T CD8$^+$ T_{MPEC} e no nível de expressão de CD127 na condição de superexpressão de Cbx4 (Cbx4 OE). Em contrapartida, não foi observado o aumento de células T CD8$^+$ T_{SLEC}, o que era esperado seguindo a hipótese de que Cbx4 promoveria a diferenciação para este fenótipo. Em vez disso, foi observado o aumento da frequência de células T CD8$^+$ efetoras precoces (KLRG1$^-$ CD127$^-$), com tendência de aumento no número de células nessa população.

Seguindo os resultados de que a superexpressão de Cbx4 aumenta a funcionalidade das células T CD8$^+$ *in vitro*, uma possível razão para explicar esse

resultado visto no modelo *in vivo* é a alteração na cinética e dinâmica da resposta de células T $CD8^+$ por conta de uma eliminação mais rápida do vírus. Como já mencionado anteriormente na introdução e na discussão, a duração dos sinais antigênicos e inflamatórios modula a diferenciação das células T $CD8^+$ e é possível que o ganho na funcionalidade de células T $CD8^+$ super expressando Cbx4 possa ter resultado na eliminação do vírus em um tempo tão curto. Assim, o cessar de sinais inflamatórios precoce teria provocado o atraso na diferenciação, sobretudo em um modelo onde há a transferência adotiva de um número alto de células. Novos experimentos de infecção viral aguda por LCMV em camundongos controle e $Cbx4^{fl/fl}Cd4^{Cre}$ estão em andamento para a análise da carga viral no soro e baço dos animais em tempos mais precoces no curso da infecção, a fim de verificar se há de fato uma eliminação mais rápida do patógeno. Além disso, mais estudos com alterações no número de células transferidas adotivamente ou utilizando outros modelos de infecção são necessários para a melhor conclusão desse efeito.

6.2.1 Cbx4 controla a população de células $KLRG1^+CD127^+$

No modelo de resposta viral aguda, tanto na fase aguda quanto na fase crônica, foi observado o aumento da população duplo-positiva para as moléculas KLRG1 e CD127. Em paralelo, e concordando com esses achados, a superexpressão de Cbx4 provocou a redução da frequência dessa população.

Anteriormente era descrito na literatura que as células T $CD8^+$ $KLRG1^+CD127^+$ representavam uma subpopulação com potencial limitado de geração de células T $CD8^+$ de memória de longa vida e que, após longos períodos pós-infecção, uma grande parte da população é eliminada (JOSHI et al., 2007; VOEHRINGER et al., 2001). No entanto, um estudo recente demonstrou que em respostas primárias parte da população de células T $CD8^+$ $KLRG1^+CD127^+$, que acreditava-se ser eliminada, perde a expressão de KLRG1 durante a fase de contração e dá origem a todos os subconjuntos de células T $CD8^+$ de memória, memória central, efetora e residente (HERNDLER-BRANDSTETTER et al., 2018). A diferenciação e plasticidade de células T $CD8^+$ que perdem a expressão de KLRG1 (exKLRG1) é dependente de alterações na acessibilidade da cromatina de genes envolvidos tanto com o fenótipo efetor (*Klrg1*, *Cx3cr1*, *Gzma*) quanto fenótipo de memória (*Il7r*, *Tcf7*, *Bach2*) ou genes importantes para a funcionalidade de células T $CD8^+$ (*Il2*). Foi visto também que células T $CD8^+$ exKLRG1 apresentam níveis de expressão e de acessibilidade de cromatina

intermediários para todos esses genes em comparação com células T CD8$^+$ que mantém expressão de KLRG1 ou células T CD8$^+$ de memória que nunca expressaram KLRG1.

A análise do perfil transcricional por RNA-Seq mostrou que entre os genes diferencialmente expressos em células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4 encontravam-se regulados negativamente *Klrg1*, *Cx3cr1* e *Gzma,* e regulados positivamente *Il7r* e *Tcf7*. Além disso, análises preliminares do ATAC-Seq mostraram que células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4 também apresentaram acessibilidade diferencial nos genes *Klrg1*, *Cx3cr1* (menor acessibilidade) e *Tcf7* (maior acessibilidade). Esses resultados indicam que Cbx4 controla a expressão e acessibilidade de parte dos alvos que também são regulados durante o processo de diferenciação de células T CD8$^+$ KLRG1$^+$CD127$^+$.

Dessa maneira, em conjunto com o aumento na frequência de células T CD8$^+$ KLRG1$^+$CD127$^+$ na condição de deficiência em Cbx4, nossos dados indicam que Cbx4 pode estar envolvido ou pode impactar o processo de diferenciação de células T CD8$^+$ KLRG1$^+$CD127$^+$, uma vez que sua ausência promove a retenção das células T CD8$^+$ duplo positivas nesse estado ou o aumento da geração dessa população. É possível que a proteína Cbx4 tenha participação no ajuste fino do mecanismo de repressão de genes associados ao fenótipo de memória e ativação de genes associados ao fenótipo efetor para que sejam estabelecidos os níveis intermediários requisitados para o fenótipo exKLRG1. Assim, a deficiência em Cbx4 poderia impedir a diferenciação para o estado exKLRG1 e promoveria a aquisição de um fenótipo e perfil transcricional associado ao fenótipo de memória.

6.2.2 Cbx4 regula o ciclo celular, sobrevivência e proliferação e pode estar envolvido com a senescência de células T CD8$^+$

Uma outra hipótese para explicar o aumento da população de células T CD8$^+$ KLRG1$^+$CD127$^+$ na deficiência em Cbx4, e a diminuição na superexpressão de Cbx4, é a de que a regulação de KLRG1 seja um efeito independente do processo de diferenciação de células T CD8$^+$. Um resultado que dá suporte a isso é que a superexpressão de Cbx4 promove a queda na expressão de KLRG1, molécula associada ao fenótipo efetor, em células T CD8$^+$ P14 em fase aguda da infecção por LCMV-Arm, o que foi diferente do esperado, uma vez que a nossa hipótese inicial era de que Cbx4 favorecia a diferenciação para o fenótipo efetor. Uma hipótese alternativa

é a de que a regulação do marcador KLRG1 pela proteína Cbx4 estaria na verdade associada a um controle do processo de senescência replicativa nestas células.

A molécula de superfície KLRG1 é um receptor inibitório, principalmente, expresso em células T e células NK que se liga a moléculas de E-, N- ou R-caderinas e possui em sua porção citoplasmática domínio ITIM (BORYS et al., 2022). Antes de estar associada ao fenótipo de células T $CD8^+$ efetoras de vida curta, era estabelecido na literatura que a expressão de KLRG1 caracterizava células T $CD8^+$ terminalmente diferenciadas e senescentes (VOEHRINGER et al., 2001; VOEHRINGER; KOSCHELLA; PIRCHER, 2002).

É demonstrado que um importante controlador da senescência de células T $CD8^+$ é a proteína Polycomb Pcgf4 (Bmi-1), subunidade que compõe o cerne do complexo cPRC1 (HEFFNER; FEARON, 2007). A função de Pcgf4 como controlador da senescência é bem estabelecida em diversos tipos celulares, incluindo células embrionárias, precursores hematopoiéticos e células tumorais, atuando na regulação transcricional do gene *Cdkn2a*, codificante para os reguladores do ciclo celular $p16^{Ink4a}$ e $p19^{Arf}$. Foi descrito ainda que a expressão de Pcgf4 é induzida através da sinalização via complexo TCR e de IL-2 e associada a maior capacidade proliferativa, enquanto correlaciona negativamente com a expressão de KLRG1, $p16^{Ink4a}$ e $p19^{Arf}$. Além disso, como citado anteriormente, a proteína Cbx2 também participa da regulação de *Cdkn2a* em timócitos DN3 (MIYAZAKI et al., 2008).

Adicionalmente, Cbx4 controla o processo de senescência em diversos tipos celulares, incluindo células-tronco epiteliais e mesenquimais humanas, e fibroblastos (CHEN et al., 2022; LUIS et al., 2011; REN et al., 2019). Também é bem relatado que Cbx4 regula a capacidade proliferativa e pluripotente de diversos tipos de células, como por exemplo, células epiteliais do timo e da pele (queratinócitos), e diversos tipos de células tumorais (JIANG et al., 2020; LI et al., 2022; LIU et al., 2013; MARDARYEV et al., 2016; WANG et al., 2021; ZENG et al., 2018). Dessa maneira, Cbx4 poderia ser um regulador epigenético acionado pela sinalização associada à ativação da célula T $CD8^+$, tal qual Pcgf4, que trabalha para a manutenção da capacidade proliferativa e de regeneração, se opondo a mecanismos de inibição do ciclo celular e ao processo de senescência replicativa, que tem como principais condutores os produtos de *Cdkn2a* (AKBAR; HENSON, 2011). Como consequência, a deficiência em Cbx4 provocaria o interrompimento da progressão do ciclo celular,

perda da capacidade proliferativa e aumento da morte celular. Essa hipótese ganha suporte com a observação de que células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4 polarizadas para o fenótipo de memória *in vitro* apresentaram maior frequência de células apoptóticas e necróticas, caracterizadas pela marcação com Anexina-V e 7-AAD, e de células em fase sub-G0/G1. Também em convergência com a hipótese, foi detectado no RNA-Seq de células T CD8$^+$ P14 deficientes em Cbx4 o aumento da expressão de genes associados a via de resposta à dano de DNA (*H2afx*, *Rad51*, *Chek1*, *Brca1*, *Cdc25c*), ativada no processo de senescência (dados não mostrados).

De forma contraintuitiva, as análises de RNA-Seq de células T CD8$^+$ P14 deficientes em Cbx4 mostraram a regulação positiva de diversos genes relacionados à progressão do ciclo celular (quinases dependentes de ciclinas e ciclinas) e proliferação (associados aos processos de mitose e segregação de cromossomos). A análise de ciclo celular em células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4 polarizadas para o fenótipo de memória *in vitro* também mostraram o aumento da frequência de células em fase S e G2/M, referentes às etapas de duplicação do material genômico e preparo e execução da mitose, respectivamente.

Uma possível explicação para esse conjunto de resultados é que a deficiência em Cbx4 poderia induzir uma maior progressão no ciclo celular de células T CD8$^+$ e, em consequência de uma divisão celular mais intensa, a regulação positiva da via de reparo ao dano de DNA. A ativação dessa via de sinalização poderia ser suficiente para a indução de alterações fenotípicas associadas à senescência replicativa, como a alta expressão de KLRG1. Dessa maneira, em células T CD8$^+$ diferenciadas *in vitro* para o fenótipo tipo memória, os efeitos provocados pela indução da progressão no ciclo celular e a consequente sustentação da via de resposta ao dano de DNA provocariam o aumento da morte dessas células. É possível que esse aumento de morte celular não tenha sido detectado em células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4 polarizadas para o fenótipo tipo efetor por conta de uma maior taxa de proliferação, de maneira que a curva de expansão de células se manteve igual à visualizada para células do grupo controle. Além disso, outro aspecto que precisa ser conciliado e expõe a necessidade de investigações mais profundas a respeito dessa regulação é que a superexpressão de Cbx4 não provoca alteração na expansão de células T CD8$^+$ de animais Cbx4 T KO ou animais do grupo controle. Ensaios focados na investigação da proliferação de células T CD8$^+$ deficientes ou super expressando Cbx4

diferenciadas *in vitro* para o fenótipo tipo efetor ou tipo memória utilizando a incorporação de CFSE estão sendo planejados para compreender melhor esse efeito.

Nosso grupo também observou que Cbx4 participa do controle da sobrevivência de células T $CD8^+$ visto que sua superexpressão com cromodominio inativado (ΔChromo) provoca um aumento significativo na morte celular de células T $CD8^+$ polarizadas para o fenótipo tipo memória. Esse efeito foi observado tanto na superexpressão de Cbx4 ΔChromo em células T $CD8^+$ Cbx4 T KO quanto em células do grupo controle, sugerindo que esse mutante funcional de Cbx4 provoque um efeito dominante negativo sobre Cbx4 endógena nas células do grupo controle ou sobre a isoforma de Cbx4, que eventualmente tenham compensado sua função nas células deficientes para Cbx4. De forma notável, esse resultado também indica que a função que Cbx4 exerce sobre o controle da sobrevivência de células T $CD8^+$ é dependente do cromodomínio, reforçando a hipótese de que Cbx4 poderia atuar na repressão de inibidores de ciclo celular e genes pró-apoptóticos compondo cPRC1 e conectando a atividade de ambos os complexos cPRC1 e PRC2.

Por fim, a investigação do perfil de proteínas diferencialmente SUMOiladas na comparação de células T $CD8^+$ deficientes em Cbx4 e do grupo controle revelou que alguns dos candidatos a alvo da função SUMO E3 ligase de Cbx4 nessas células são proteínas que participam do controle do ciclo celular. As proteínas candidatas a serem alvo de SUMOilação por Cbx4 encontradas na abordagem proteômica e que estão envolvidas com a regulação de processos associados ao ciclo celular, proliferação e sobrevivência foram Tnr1b e Ddx3x.

Tnr1b (também chamada de Tnfr2) e Ddx3x se apresentam diferencialmente SUMOiladas na comparação de células T $CD8^+$ deficientes para Cbx4 com células do grupo controle. É relatado que Tnr1b cumpre funções distintas em células T $CD8^+$, que inclui a sinalização para promoção da proliferação e sobrevivência de células T $CD8^+$ em respostas primárias, a regulação da secreção de citocinas pró-inflamatórias e Granzima B e a ativação de vias de apoptose (YE et al., 2018). Da mesma forma, Ddx3x também é uma proteína multifuncional e diversos relatos demonstraram sua participação em diferentes processos associados à regulação transcricional, processamento de RNA e controle do ciclo celular (MO et al., 2021). Mais experimentos focados na atividade dessas proteínas são necessários para identificar se elas são de fato alvo da função SUMO E3 ligase de Cbx4 e, caso sejam, delimitar

quais mecanismos que essas proteínas desempenham estão sendo regulados pela proteína Polycomb.

As evidências levantadas aqui mostram que a proteína Polycomb Cbx4 possui um papel importante na regulação do ciclo celular, proliferação e sobrevivência de células T $CD8^+$. Diferentes resultados mostraram que a ausência de Cbx4, em particular de sua função dependente de cromodomínio, impactam negativamente a sobrevivência de células T $CD8^+$ diferenciadas para o fenótipo tipo memória *in vitro*. Em contraste a ausência de Cbx4 também provocou o aumento da expressão de genes associados a progressão do ciclo celular, divisão celular e genes que participam da via de resposta ao dano de DNA, além de aumentar a frequência de células em fase S e G2/M. Esses efeitos podem estar relacionados a regulação de inibidores do ciclo celular, como as proteínas $p16^{Ink4a}$ e $p19^{Arf}$, à modulação da atividade de proteínas associadas ao controle do ciclo celular e ao aumento da expressão de fatores de transcrição associados a capacidade proliferativa e pluripotente, como Tcf-1, Eomes e Myb.

Com todas essas questões em aberto, são necessários mais experimentos aprofundando a investigação de quais os mecanismos associados ao controle do ciclo celular são impactados por Cbx4 em células T $CD8^+$. Um dos próximos objetivos do grupo é interrogar se a alteração em Cbx4 poderia provocar uma maior suscetibilidade da célula T $CD8^+$ ao processo de senescência replicativa (como indicado pela maior expressão de KLRG1 e maior apoptose).

6.3 Cbx4 regula a diferenciação de células T $CD8^+$ principalmente através de seus motivos de interação com SUMO e parcialmente através do cromodomínio

No modelo de diferenciação *in vitro* polarizando as células para um fenótipo tipo memória, como já citado, a superexpressão de Cbx4 em células T $CD8^+$ do grupo controle ($Cbx4^{fl/fl}$) ou deficientes para Cbx4 ($Cbx4^{fl/fl}Cd4^{Cre}$) promove a repressão do fenótipo de memória central ($CD62L^+CD127^+$) e da expressão a nível proteico e transcricional das moléculas CD127 (*Il7r*) e CD62L (*Sell*), enquanto é observado o oposto para as moléculas de fenótipo efetor CD25 (e para o gene *Il2ra*) e CXCR3. A superexpressão dos mutantes funcionais ΔChromo ou ΔSIM1-2 mostrou que esse efeito era parcialmente dependente do cromodomínio, uma vez que a sua inativação recuperava apenas parcialmente o fenótipo da condição controle, e principalmente

dependente dos SIM, já que não foi observada diferença significativa na frequência de células de memória central entre essa condição e a condição de deficiência em Cbx4. Inclusive, foi detectado um aumento da frequência da população de células de memória central quando Cbx4 ΔSIM1-2 foi super expresso em células T $CD8^+$ controle. Uma possível explicação para esse aumento na frequência da população de memória central em células T $CD8^+$ controle super expressando Cbx4 ΔSIM1-2 é que a construção de Cbx4 mutante exógena pode provocar um efeito dominante negativo sobre Cbx4 endógeno, mimetizando a sua deficiência.

Para entender o papel dos diferentes domínios na regulação dos fatores de transcrição que se mostraram alterados na deficiência em Cbx4, a expressão gênica de T-bet (*Tbx21*), Eomes (*Eomes*), Tcf-1 (*Tcf7*) e Myb (*Myb*) foi analisada em células super expressando os mutantes funcionais de Cbx4. Em relação à análise de *Tbx21*, *Eomes* e *Tcf7*, poucas alterações foram significativas, comparando as diferentes condições de superexpressão com a sua respectiva condição controle. Quanto à tendência de alteração vista para a superexpressão de Cbx4 selvagem, o resultado corroborou com os achados prévios de que Cbx4 estaria envolvido na regulação positiva de genes associados ao fenótipo efetor e regulação negativa de genes associados ao fenótipo de memória. No entanto, quanto ao padrão de alteração observado para as condições de superexpressão de mutantes funcionais, foram obtidos resultados não significativos e mais experimentos são necessários para esclarecer a participação de cada domínio na regulação desses fatores de transcrição. Por fim, a análise da expressão de *Myb* nas diferentes condições de superexpressão de Cbx4 mostrou um padrão que se alinha com os demais resultados. A superexpressão de Cbx4 selvagem provocou a diminuição da expressão desse fator de transcrição, em concordância com o que é visto no silenciamento (no modelo de diferenciação *in vivo* e *in vitro*) e nocaute de Cbx4. Em concordância com a análise fenotípica, é observado que a expressão de *Myb* é inibida por Cbx4 através de uma função dependente de SIM, uma vez que sua expressão retorna aos níveis encontrados na condição controle quando há a superexpressão de Cbx4 ΔSIM1-2, sugerindo que esse fator de transcrição pode ser regulado por uma via de sinalização por SUMO integrada por Cbx4.

O papel de Cbx4 na regulação da expressão gênica de Tcf-1 é menos claro. Foi observado que a deficiência em Cbx4 em células T $CD8^+$ promove o aumento da

expressão de *Tcf7*, porém apenas em modelos de silenciamento. Em modelos de deficiência em Cbx4 por nocaute condicional não é visível a regulação positiva da proteína Tcf-1 e, em concordância, a superexpressão de Cbx4 não provoca a diminuição da expressão gênica desse fator de transcrição. Como já discutido, é possível que o modelo de nocaute condicional não reproduza os efeitos encontrados na estratégia de silenciamento por conta da compensação de Cbx4 por outra isoforma de Cbx. Essa hipótese pressupõe que a regulação exercida por Cbx4 seja mediada pela participação dessa proteína no complexo cPRC1, onde sua função seria intercambiável por outra isoforma de Cbx. De fato, nossos resultados preliminares de ChIP-qPCR dão suporte à essa hipótese, onde foi observado o enriquecimento da marca de cPRC1, H2AK119Ub, na TSS de *Tcf7*. No entanto, não é possível descartar que a função de Cbx4 dependente de SIM também participe da regulação de mecanismos relacionados às modificações pós-traducionais de histonas através da interação com outros moduladores epigenéticos.

Além das proteínas já mencionadas nessa discussão que poderiam ter uma participação importante na regulação do ciclo celular de células T $CD8^+$, outros candidatos de serem alvo de SUMOilação Cbx4 que poderiam contribuir para a regulação da diferenciação destas células são as proteínas Ddx3x, Alrf2 e Tpr, todas envolvidas com a regulação transcricional, em particular com processos de processamento e transporte de mRNA (MO et al., 2021; SCOTT et al., 2019; SNOW; PASCHAL, 2014). Além disso, Ddx3x é uma proteína multifuncional com diversas outras funções que poderiam estar envolvidas com o processo de diferenciação de células T $CD8^+$, como a cooperação com NF-κB e Irf-7 (fatores de transcrição importantes na ativação de células T $CD8^+$). Ddx3x também pode atuar como sensor de RNA viral e sua SUMOilação poderia estar envolvida com fato de que as células analisadas passaram por um processo de transdução retroviral. Mais experimentos focados na investigação desses candidatos são necessários para validar se participam do processo de diferenciação de células T $CD8^+$.

Apesar de não ser detectado na análise proteômica, é conhecido que Myb pode ser SUMOilada, e sua SUMOilação está associada à diminuição da sua atividade (BIES; MARKUS; WOLFF, 2002; DAHLE et al., 2003; ŠRAMKO et al., 2006). Essa informação demonstrada na literatura dá forte suporte às evidências levantadas pelo nosso grupo e a validação desse eixo regulatório Cbx4-Myb-Tcf-1 através da função

SUMO E3 ligase fortaleceria os resultados obtidos no presente trabalho. Um possível motivo para não se ter detectado a SUMOilação diferencial de Myb (além da baixa massa utilizada no ensaio) é o fato de que foram co-IP apenas proteínas SUMOiladas com modificações de SUMO-1. No entanto, é conhecido que vertebrados expressam três diferentes isoformas de SUMO e foi descrito que além de SUMO-1, Myb pode ser SUMOilada por SUMO-2 e SUMO-3. São necessários novos experimentos focados na investigação direta do papel de Myb, como por exemplo, utilizando estratégias de silenciamento com shRNA, e ensaios de biologia molecular direcionados para essa proteína, como a co-IP de Myb e marcação em *Western blotting* de outras variantes de SUMO, para melhor interrogar o papel desse fator de transcrição na diferenciação de células T $CD8^+$ e conectar a validar a conexão entre a função SUMO E3 ligase de Cbx4 à atividade dele.

É descrito que outros reguladores transcricionais importantes para o controle da diferenciação de células T $CD8^+$ também são SUMOilados por Cbx4: Dnmt3a e Hif-1α (LI et al., 2007, 2014a). Apesar de não ser conhecido qual o impacto funcional da SUMOilação de Dnmt3a, é demonstrado que a SUMOilação de Hif-1α mediada por Cbx4 aumenta a atividade do fator de transcrição associado à aquisição de características metabólicas fundamentais para fenótipo efetor. Dessa maneira, um mecanismo pelo qual Cbx4 estaria envolvido na diferenciação de células T $CD8^+$ para o fenótipo efetor seria no auxílio de reguladores transcricionais associados a aquisição desse fenótipo. É possível que não se tenha detectado Dnmt3a e Hif-1α na abordagem proteômica pelo fato de que uma baixa massa de proteínas (300 µg) foi utilizada nos experimentos de co-IP seguido de análise por LC:MS ou por conta de essas proteínas serem expressas em tempos mais precoces no curso da diferenciação das células *in vitro*. No entanto, não se pode descartar que, embora não detectadas, a ausência da função SUMO E3 ligase de Cbx4 tenha impactado a atividade desses reguladores transcricionais e assim o processo de diferenciação dessas células. Novos ensaios de proteômica utilizando uma maior massa de proteínas extraídas de células T $CD8^+$ de fenótipo de tipo efetor são necessários para investigar se Cbx4 participa do controle do processo de diferenciação de células T $CD8^+$ através da SUMOilação de Dnmt3a e Hif-1α ou ainda identificar outros candidatos não representados em nossos resultados. Também no intuito de aumentar o repertório de proteínas SUMOiladas identificadas em células T $CD8^+$, são planejados ensaios realizando a co-IP com

anticorpos específicos para outras isoformas de SUMO além de SUMO-1 (SUMO-2 e -3).

Por fim, é descrito na literatura que Cbx4 tem a capacidade de SUMOilar outra proteína Polycomb, a subunidade catalítica do PRC2, Ezh2 (WU et al., 2022). Foi recentemente mostrado que a SUMOilação de Ezh2 mediada por Cbx4 melhora sua função histona metiltransferase de deposição da marca H3K27me3 em células T $CD4^+$ infectadas com HIV. Essa interação entre as proteínas Polycomb Cbx4 e Ezh2 pode estar ocorrendo no contexto do processo de diferenciação de células T $CD8^+$. Essa hipótese explicaria o porquê da função de Cbx4 dependente dos motivos SIM exibir um papel mais significativo no controle da diferenciação de células T $CD8^+$, uma vez que ela seria fundamental para a modulação da atividade de Ezh2, importante regulador do comprometimento com o fenótipo efetor. A proteína Polycomb L3MBTL2, componente da variante nâo canônica de PRC1 ncPRC1.6, também pode ser SUMOilada (SUMO-2/3), embora não se saiba a enzima E3 que cumpre essa tarefa (STIELOW et al., 2014). Foi observado que a SUMOilação de L3MBTL2 auxilia na sua função repressora de recrutamento de ncPRC1.6 e deposição da marca H2AK119Ub. Dessa forma, também é possível que a função SUMO E3 ligase exercida por Cbx4 possa auxiliar na função repressora de PRC1.

A investigação do mecanismo pelo qual Cbx4 participa dessa regulação mostrou que os motivos SIM e, por consequência, suas funções relacionadas a sinalização por SUMO, desempenham um papel proeminente em comparação com as funções relacionadas ao cromodomínio da proteína Polycomb. No entanto, as funções dependentes do cromodomínio não são dispensáveis. É necessária a continuação da investigação a respeito dos mecanismos que Cbx4 pode controlar a diferenciação de células T $CD8^+$, incluindo o aprofundamento nos mecanismos relacionados a modificação pós-traducional de histonas, a identificação dos alvos da função SUMO E3 ligase de Cbx4 em células T $CD8^+$ nos diferentes fenótipos e a análise de possíveis cooperações entre Cbx4 e outros reguladores transcricionais (Dnmt3a, Hif-1α, Ezh2 etc.).

6.4 Cbx4 regula a função efetora e de memória de células T $CD8^+$

No presente projeto de tese de doutorado, nosso grupo também investigou o papel de Cbx4 na regulação da função efetora de células T $CD8^+$. Nossos resultados

mostraram que Cbx4 regula positivamente a função efetora de células T CD8$^+$ diferenciadas *in vitro* e em resposta primária à LCMV-Arm, uma vez que sua deficiência provoca a diminuição da frequência de células duplo produtoras de IFN-γ e TNF, e a diminuição dos níveis de produção das citocinas IFN-γ, TNF e IL-2 e da proteína citotóxica Granzima B. Também foi observada a menor função citotóxica *in vitro* de células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4 em comparação a células do grupo controle. Em contrapartida, corroborando parcialmente os resultados, foi observado que a superexpressão de Cbx4 tanto em modelo de diferenciação *in vitro* quanto *in vivo* em resposta à infecção viral aguda leva ao aumento dessas citocinas e à diminuição da produção de Granzima B.

Um mecanismo pelo qual Cbx4 poderia controlar a produção de citocinas em células T CD8$^+$ é através da regulação dos fatores de transcrição T-bet e Eomes. Em suporte à essa ideia, foi observada uma menor razão nos níveis de expressão de T-bet e Eomes nas células T CD8$^+$ deficientes para Cbx4 no 8º dia pós-infecção por LCMV, em comparação com o grupo controle, e essa diminuição correlacionou com a menor frequência de células duplo produtoras de IFN-γ e TNF, menor expressão de ambas as citocinas e menor produção de Granzima B. Em contrapartida, mesmo com a menor taxa de T-bet e Eomes, não foi detectada alteração na capacidade funcional de células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4 na fase tardia da resposta aguda. No entanto, células T CD8$^+$ de memória naturalmente diminuem sua capacidade funcional e é possível que isso impeça de se detectar os efeitos causados pela deficiência em Cbx4.

A análise funcional de células super expressando diferentes mutantes funcionais de Cbx4 mostrou que a regulação de Cbx4 sobre citocinas e Granzima B ocorre por diferentes domínios da proteína. Os resultados dos experimentos feitos em modelo de diferenciação *in vitro* sugerem que o aumento na produção da citocina pró-inflamatória IFN-γ em decorrência da superexpressão de Cbx4 é mediado principalmente pelo cromodomínio, uma vez que a superexpressão do mutante Cbx4 ΔChromo provoca a perda quase que total do efeito de ganho na produção observado na condição de superexpressão de Cbx4 selvagem. Em paralelo, a superexpressão de Cbx4 ΔSIM1-2 provoca o aumento da produção de IFN-γ em níveis equivalentes ao encontrado na superexpressão de Cbx4 selvagem, indicando que os motivos SIM de Cbx4 são dispensáveis para a regulação positiva de IFN-γ. No entanto, para a regulação de TNF os resultados indicam que ambos cromodomínio e motivos SIM são

requisitados para a regulação positiva dessa citocina, enquanto para a regulação de IL-2 os resultados indicam que a função mediada por SIMs é a que contribuiu mais para o aumento dessa citocina (apesar de essa conclusão ser menos clara).

Para a regulação da proteína citotóxica Granzima B, um outro padrão foi observado. A superexpressão de Cbx4 selvagem provocou a redução na produção de Granzima B. Esse resultado não é esperado, uma vez que nos experimentos de deficiência em Cbx4 em células T $CD8^+$ de animais Cbx4 T KO também foi observada essa queda nos níveis da proteína citotóxica (apenas na fase aguda da resposta à LCMV-Arm) e foi observada a menor citotoxicidade *in vitro* de células T $CD8^+$ P14 deficientes para Cbx4. Por sua vez, células T $CD8^+$ recuperadas na fase tardia de resposta à LCMV e células T $CD8^+$ de fenótipo tipo memória diferenciadas *in vitro* não mostraram alteração na produção de Granzima B na condição de deficiência em Cbx4. Dessa forma, é possível que o efeito regulatório de Cbx4 sobre Granzima B seja dependente do fenótipo da célula. Além disso, a superexpressão dos mutantes funcionais de Cbx4 sugere que esse efeito de regulação negativa exercido por Cbx4 sobre Granzima B é dependente, principalmente, do cromodomínio e em menor nível dos motivos SIM.

Para investigar o impacto de Cbx4 no fenótipo de células T $CD8^+$ reativadas em uma resposta secundária, camundongos Cbx4 T KO ou do grupo controle previamente infectados por LCMV-Arm foram desafiados 60 dias pós-infecção com a bactéria *L. monocytogenes*-GP33 para reativação das células de memória e analisados no 4º dia pós-reativação. Nossos resultados mostraram que após a reativação as células T $CD8^+$ deficientes em Cbx4 não mostraram diferenças na frequência ou número absoluto de células T $CD8^+$ totais ou antígeno-específicas. A análise fenotípica mostrou que não houve alterações na frequência e número total de células efetoras de vida curta ou células precursoras de memória. Também não foi observada alterações significativas na função efetora de células T $CD8^+$ deficientes em Cbx4, apenas uma tendência de diminuição na produção de Granzima B. Em conjunto, os resultados apontam que apesar de ter sido observado o aumento de várias características fenotípicas associados ao fenótipo de memória em células T $CD8^+$ deficientes em Cbx4 durante a resposta primária contra LCMV-Arm, não houve uma alteração significativa no fenótipo e funcionalidade das células reativadas em resposta secundária. No entanto, mais experimentos são necessários para avaliar melhor a

capacidade protetora e de persistência das células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4 de memória.

No entanto, como na resposta primária, foi observado o aumento da população de células T CD8$^+$ KLRG1$^+$CD127$^+$ em frequência e número absoluto, com consequente diminuição na população de células T CD8$^+$ KLRG1$^-$CD127$^-$ (efetoras precoces). Também foi detectado que na população total de células T CD8$^+$ antígeno-específicas deficientes em Cbx4 houve queda nos níveis de expressão de KLRG1 e aumento de CD127. Novamente foi observada a menor taxa na expressão de T-bet e Eomes (significativa apenas na população KLRG1$^-$), característica associada ou fenótipo de memória e menor expressão de T-bet (tendência na população KLRG1$^+$ e significativa na população KLRG1-). Esses resultados indicam que células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4 geradas em resposta secundária sofrem efeitos semelhantes aos observados na resposta primária, o que pode sugerir que esses efeitos são causados em resposta ao estímulo via TCR ou que são herdados epigeneticamente das células T CD8$^+$ de memória geradas na resposta primária para as células-filhas geradas após a reativação.

Mais uma vez, é possível que a ausência de Cbx4 impacte o processo de diferenciação de células T CD8$^+$ KLRG1$^+$CD127$^+$ em células T CD8$^+$ exKLRG1 na resposta secundária, promovendo o aumento ou acúmulo dessa população. Seguindo essa hipótese, a deficiência em Cbx4 nesse contexto promoveria a manutenção da expressão de elementos associados ao fenótipo de memória enquanto elementos associados ao fenótipo efetor não seriam regulados positivamente, ou até mesmo regulados negativamente (como no caso de KLRG1, T-bet e Granzima B). Também é descrito que em infecções consecutivas (como na reativação realizada no experimento com *L. monocytogenes*-GP33) o fenótipo KLRG1$^+$CD127$^+$ pode caracterizar células T CD8$^+$ de memória efetora de vida longa (MASOPUST et al., 2006). Nesse contexto, a ausência de Cbx4 poderia também prejudicar a funcionalidade de células T CD8$^+$ de memória efetora através desse prejuízo da ativação de elementos associados ao fenótipo efetor, limitando a função efetora dessas células. Mais experimentos são necessários para investigar melhor o papel que Cbx4 exerce sofre a funcionalidade de células T CD8$^+$ de memória reativadas em resposta secundária.

6.5 Cbx4 reprime diferenciação de células T CD8$^+$ exaustas precursoras

O papel de Cbx4 na diferenciação de células T $CD8^+$ em um contexto de resposta crônica também foi investigado no presente projeto de tese. Utilizando o mesmo modelo animal para a obtenção de células T $CD8^+$ deficientes em Cbx4 ($Cbx4^{fl/fl}Cd4^{Cre}$), a diferenciação para o fenótipo de exaustão foi avaliada em modelo de infecção viral crônica por LCMV-cl13, analisando as células antígeno-específicas no 60º dia pós-infecção. Não foi possível observar alterações significativas na frequência ou número de células T $CD8^+$ totais, no entanto, foi notado uma significativa maior frequência de células T $CD8^+$ antígeno-específicas (e tendência de maior número de células), o que sugere um ganho na capacidade proliferativa ou na viabilidade das células respondedoras ao vírus.

Esse resultado se alinha com a análise fenotípica, onde foi observada a maior frequência de células T $CD8^+$ T_{PEX} (populações $CD69^+Ly108^+$ e $CD69^-Ly108^+$) (BELTRA et al., 2020). Reforçando a ideia de que há um favorecimento da geração de células menos comprometidas com o fenótipo de exaustão, foi observada também na condição de deficiência em Cbx4 uma menor frequência de células T $CD8^+$ expressando receptores inibitórios PD-1, Lag-3 e Tim-3, menores níveis de expressão dessas moléculas e menor frequência da população de células co-expressando os três receptores inibitórios, uma das principais características de células T $CD8^+$ exaustas terminais (WHERRY, 2011; WHERRY; KURACHI, 2015). Em concordância, foi observada a tendência de menor frequência de células T $CD8^+$ exaustas terminais ($CD69^+Ly108^-$).

A análise da expressão de fatores de transcrição T-bet e Eomes em células T $CD8^+$ exaustas deficientes para Cbx4 mostrou um perfil oposto ao encontrado no modelo de infecção viral aguda. Na resposta crônica foi detectado o aumento do nível de expressão de T-bet e tendência de queda de Eomes, com consequente aumento da T-bet/Eomes em células T $CD8^+$ deficientes em Cbx4. Apesar de discordante com os resultados anteriores, esse dado se alinha com o fato de que T-bet está associado a um estágio menos terminalmente diferenciado de células T $CD8^+$ exaustas, mais citotóxico e proliferativo, enquanto Eomes indica o contrário, como descrito na literatura e discutido na introdução (BELTRA et al., 2020; HUDSON et al., 2019; PALEY et al., 2012; RAJU et al., 2021).

O aumento nos níveis de expressão de T-bet e a sugestão de uma maior população de células T $CD8^+$ exaustas que guardam capacidade proliferativa e

citotóxica se alinha com outras evidências observadas na condição de deficiência em Cbx4, como o aumento na população de células T CD8$^+$ exaustas antígeno-específicas e a tendência de maiores níveis de produção de Granzima B, apesar da menor frequência de células produtoras dessa proteína citotóxica. É possível que esse contraste exista em decorrência do aumento na frequência de células T CD8$^+$ exaustas precursoras, que não apresentam capacidade citotóxica alta. Seguindo a respeito da análise funcional de células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4, foi observada a tendência de aumento na frequência de células produtoras de IFN-γ e dentro da população produtora foi detectado o aumento significativo nos níveis de produção dessa citocina pró-inflamatória. Esse pode também ser um reflexo do aumento da frequência de população de células T CD8$^+$ exaustas em um estado menos terminalmente diferenciado.

A deficiência em Cbx4 provocando o aumento de T-bet em células T CD8$^+$ exaustas em resposta crônica enquanto é observado a diminuição desse fator de transcrição em células T CD8$^+$ de memória em resposta aguda (dia 60 pós-infecção) sugere que esse modulador epigenético não exerce um papel regulatório direto sobre o locus de *Tbx21*. Em alternativa, Cbx4 poderia participar do controle da diferenciação inibindo diretamente agentes que orquestram um programa transcricional associado a um estado menos diferenciado (como Myb ou Tcf-1) ou ativando agentes que contrapõem esse programa (como Dnmt3a ou Hif-1α), ou ainda modulando o remodelamento da acessibilidade de cromatina em parceria com cPRC1 e a atividade de PRC2. Mais experimentos focados no mecanismo de Cbx4 na diferenciação de células T CD8$^+$ exaustas são necessários para elucidar esse ponto.

Os resultados da análise fenotípica também entram em acordo com os resultados obtidos na análise do perfil transcricional de células T CD8$^+$ P14 deficientes em Cbx4 diferenciadas em resposta aguda, onde foi observada maior expressão do gene *Slamf6*, que codifica a proteína de superfície Ly108 que está associada às populações de células T CD8$^+$ exaustas progenitoras (BELTRA et al., 2020). Essa conexão dá suporte à hipótese de que Cbx4 é um repressor do programa transcricional relacionado a estados de menor diferenciação em células T CD8$^+$ e sua ausência favorece a aquisição de um programa transcricional e fenotípico associado a células com alta capacidade progenitora. Recentemente, foi demonstrado que o fator de transcrição Myb possui um papel essencial na geração da população de

células T CD8$^+$ exaustas progenitoras CD62L$^+$, além de ser fundamental para a indução da diferenciação de células T CD8$^+$ de memória em respostas agudas, servindo como regulador positivo do fator de transcrição Tcf-1, chave para este fenótipo (CHEN et al., 2019; GAUTAM et al., 2019; TSUI et al., 2022). Nossos dados em modelos de diferenciação *in vitro* mostraram que Myb é um alvo de regulação de Cbx4 e é possível que essa proteína Polycomb também atue nesse importante regulador transcricional no contexto de resposta crônica. Mais experimentos voltados para o estudo do mecanismo molecular de Cbx4 em células T CD8$^+$ em respostas crônicas são necessários para identificar essa rede regulatória.

Além disso, a deficiência em Cbx4 também provocou o aumento de T-bet, associado a população de células T CD8$^+$ exaustas em estado intermediário de diferenciação e que mantém capacidade citotóxica e proliferativa, apesar de não ter sido observada a frequência desta população pela análise fenotípica. Também foi observada o aumento na produção de IFN-γ e tendência de aumento na frequência de células produtoras dessa citocina e nos níveis de produção de Granzima B. Todos essas evidências sugerem que estratégias de silenciamento de Cbx4 em células T CD8$^+$ no contexto de resposta crônica, como a resposta antitumoral, poderiam aprimorar estratégias de imunoterapia contra câncer. Os protocolos e metodologias para a utilização de modelos murinos de câncer utilizando a linhagem de célula de melanoma murino B16 e a geração de células CAR-T já foram estabelecidos em nosso laboratório para o prosseguimento desse novo objetivo.

6.6 Considerações Finais

Os resultados encontrados neste trabalho demonstraram que a proteína Polycomb Cbx4 atua no controle de diferentes processos biológicos de células T CD8$^+$, incluindo o controle do ciclo celular e de sua função efetora, e dos processos de diferenciação, tanto na resposta imune aguda quanto na crônica (Figura 53). Parte desses resultados foram utilizados para a composição de um manuscrito depositado em repositório aberto de pré-publicação (Biorxiv), anexado ao fim deste documento (**ANEXO B**), e submetido para o periódico com revisão de pares *The Journal of Immunology* (AAI), onde se encontra em processo de revisão para o aceite da publicação.

A descrição de Cbx4 como um regulador da diferenciação de células T CD8$^+$ expande o alcance do conhecimento a cerca desse processo, incluindo mais uma regulador epigenético nesse cenário. A melhor caracterização dos integrantes desse circuito regulatório não só aprofunda a compreensão do mecanismo molecular complexo que está por trás desse processo, como também evidencia um possível alvo para manipulação em estratégias terapêuticas, como vacinas ou imunoterapias contra o câncer, o que é de importante utilidade para a medicina. O estudo da proteína Polycomb em células T CD8$^+$ também avança o entendimento de como este grupo de proteínas atua em células diferenciadas, o que pouco se sabe, e contribui para o arcabouço teórico que serve de plataforma para novos estudos desses moduladores epigenéticos em outros tipos celulares. Por fim, os resultados descritos nesse trabalho constituem uma investigação em curso e evidenciam também novas perguntas que serão investigadas por nosso grupo a respeito dos mecanismos epigenéticos de células T CD8$^+$ e o funcionamento das proteínas envolvidas nesses mecanismos.

7 CONCLUSÕES

1. Em um contexto de resposta imune aguda, Cbx4 promove a diferenciação no fenótipo efetor através da repressão do perfil transcricional de células T CD8$^+$ de memória, e a deficiência do modulador epigenético acarreta o desvio para a diferenciação no fenótipo de memória. Foi observado também que esse papel é mediado principalmente por mecanismos desempenhados pelos motivos SIM e parcialmente pelo cromodomínio de Cbx4.

2. O cromodomínio de Cbx4 possui papel proeminente no controle do ciclo celular, proliferação e sobrevivência de células T CD8$^+$, embora não possa ser descartada a relevância dos motivos SIM nessa regulação através da participação em vias de sinalização por SUMO.

3. Cbx4 participa do controle da função efetora de células T CD8$^+$, principalmente através da regulação positiva das citocinas IFN-γ, TNF e IL-2.

4. Em um contexto de resposta imune crônica, Cbx4 participa da diferenciação de células T CD8$^+$ exaustas reprimindo a geração de células T CD8$^+$ exaustas progrenitoras (T_{PEX}). Em concordância, a deficiência em Cbx4 causa o aumento de células T CD8$^+$ T_{PEX}, queda de células T CD8$^+$ exaustas terminais e o aumento na

expressão de T-bet, associado a população de células T CD8$^+$ exaustas que mantém capacidades proliferativas e citotóxicas.

8 PERSPECTIVAS

1 Esclarecer o mecanismo molecular pelo qual Cbx4 participa do controle dos processos listas acima: (i) investigando sua participação como subunidade recrutadora de cPRC1 para sítios que receberam a marca repressora H3K27me3, potencialmente recrutando a deposição da marca H2AK119Ub em genes associados ao fenótipo de memória (Ex: *Tcf7*) e; (ii) investigando sua função E3 SUMO ligase e sua participação em vias de sinalização por SUMO, confirmando alvos encontrados na análise de proteômica e identificando novos possíveis alvo dessas funções, como as proteínas Ezh2, Myb, Hif-1α e Dnmt3a, associadas a diferenciação de células T CD8$^+$.

2 Estudar o papel regulatório de Cbx4 sobre a funcionalidade das células T CD8$^+$ investigando: (i) a capacidade proliferativa, de renovação e de pluripotência de células T CD8$^+$ de memória geradas em animais deficientes em Cbx4; (ii) o aumento na função efetora de células T CD8$^+$ (capacidade citotóxica e produção de citocinas) super expressando Cbx4 em respostas imunes agudas e crônicas e; (iii) a avaliação da capacidade funcional e protetora de células T CD8$^+$ deficientes em Cbx4 em modelos experimentais de resposta antitumoral.

REFERÊNCIAS

AHMED, R. et al. Selection of genetic variants of lymphocytic choriomeningitis virus in spleens of persistently infected mice. Role in suppression of cytotoxic T lymphocyte response and viral persistence. **Journal of Experimental Medicine**, v. 160, n. 2, p. 521–540, 1 ago. 1984.

AKASAKA, T. et al. The role of mel-18, a mammalian Polycomb group gene, during IL-7-dependent proliferation of lymphocyte precursors. **Immunity**, v. 7, n. 1, p. 135–146, jul. 1997.

AKASHI, K. et al. Lymphoid precursors. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 2, p. 144–150, abr. 2000.

AKBAR, A. N.; HENSON, S. M. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 4, p. 289–295, abr. 2011.

ALFEI, F. et al. TOX reinforces the phenotype and longevity of exhausted T cells in chronic viral infection. **Nature**, v. 571, n. 7764, p. 265–269, jul. 2019.

ALLFREY, V. G.; FAULKNER, R.; MIRSKY, A. E. ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 51, n. 5, p. 786–794, maio 1964.

ALLIS, C. D.; JENUWEIN, T. The molecular hallmarks of epigenetic control. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 8, p. 487–500, ago. 2016.

AMEMIYA, H. M.; KUNDAJE, A.; BOYLE, A. P. The ENCODE Blacklist: Identification of Problematic Regions of the Genome. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 9354, 27 jun. 2019.

ANDERSSON, R.; SANDELIN, A. Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements. **Nature Reviews Genetics**, v. 21, n. 2, p. 71–87, fev. 2020.

ARAKI, Y. et al. Genome-wide analysis of histone methylation reveals chromatin state-based regulation of gene transcription and function of memory CD8+ T cells. **Immunity**, v. 30, n. 6, p. 912–925, 19 jun. 2009.

ARSENIO, J. et al. Early specification of CD8+ T lymphocyte fates during adaptive immunity revealed by single-cell gene-expression analyses. **Nature Immunology**, v. 15, n. 4, p. 365–372, abr. 2014.

ARVEY, A. et al. Inflammation-induced repression of chromatin bound by the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells. **Nature Immunology**, v. 15, n. 6, p. 580–587, jun. 2014.

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Death Receptors: Signaling and Modulation. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1305–1308, 28 ago. 1998.

BADOVINAC, V. P.; HARING, J. S.; HARTY, J. T. Initial T Cell Receptor Transgenic Cell Precursor Frequency Dictates Critical Aspects of the CD8+ T Cell Response to Infection. **Immunity**, v. 26, n. 6, p. 827–841, jun. 2007.

BADOVINAC, V. P.; HARTY, J. T. Manipulating the Rate of Memory CD8+ T Cell Generation after Acute Infection. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 1, p. 53–63, 1 jul. 2007.

BADOVINAC, V. P.; PORTER, B. B.; HARTY, J. T. Programmed contraction of CD8+ T cells after infection. **Nature Immunology**, v. 3, n. 7, p. 619–626, jul. 2002.

BADOVINAC, V. P.; PORTER, B. B.; HARTY, J. T. CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation. **Nature Immunology**, v. 5, n. 8, p. 809–817, ago. 2004.

BANERJEE, A. et al. Cutting Edge: The Transcription Factor Eomesodermin Enables CD8 $^{+}$ T Cells To Compete for the Memory Cell Niche. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 9, p. 4988–4992, 1 nov. 2010.

BELK, J. A.; DANIEL, B.; SATPATHY, A. T. Epigenetic regulation of T cell exhaustion. **Nature Immunology**, v. 23, n. 6, p. 848–860, jun. 2022.

BELTRA, J.-C. et al. Developmental Relationships of Four Exhausted CD8+ T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms. **Immunity**, v. 52, n. 5, p. 825- 841.e8, maio 2020.

BENGSCH, B. et al. Epigenomic-Guided Mass Cytometry Profiling Reveals Disease-Specific Features of Exhausted CD8 T Cells. **Immunity**, v. 48, n. 5, p. 1029-1045.e5, maio 2018.

BENNETT, S. R. M. et al. Induction of a CD8+ Cytotoxic T Lymphocyte Response by Cross-priming Requires Cognate CD4+ T Cell Help. **Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 1, p. 65–70, 7 jul. 1997.

BERNSTEIN, B. E. et al. A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. **Cell**, v. 125, n. 2, p. 315–326, abr. 2006a.

BERNSTEIN, E. et al. Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 7, p. 2560–2569, abr. 2006b.

BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 1, p. 1–5, 1 jan. 2007.

BIES, J.; MARKUS, J.; WOLFF, L. Covalent Attachment of the SUMO-1 Protein to the Negative Regulatory Domain of the c-Myb Transcription Factor Modifies Its Stability and Transactivation Capacity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 11, p. 8999–9009, mar. 2002.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 396–398, maio 2007.

BLACKLEDGE, N. P. et al. Variant PRC1 complex-dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and polycomb domain formation. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1445–1459, 5 jun. 2014.

BLACKLEDGE, N. P. et al. PRC1 Catalytic Activity Is Central to Polycomb System Function. **Molecular Cell**, v. 77, n. 4, p. 857- 874.e9, 20 fev. 2020.

BLACKLEDGE, N. P.; KLOSE, R. J. The molecular principles of gene regulation by Polycomb repressive complexes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 22, n. 12, p. 815–833, dez. 2021.

BLANK, C. U. et al. Defining 'T cell exhaustion'. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 11, p. 665–674, nov. 2019.

BONASIO, R. et al. Interactions with RNA direct the Polycomb group protein SCML2 to chromatin where it represses target genes. **eLife**, v. 3, p. e02637, 1 jul. 2014.

BORYS, S. M. et al. The Yin and Yang of Targeting KLRG1+ Tregs and Effector Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 894508, 29 abr. 2022.

BOURGEOIS, C.; ROCHA, B.; TANCHOT, C. A Role for CD40 Expression on CD8 $^{+}$ T Cells in the Generation of CD8 $^{+}$ T Cell Memory. **Science**, v. 297, n. 5589, p. 2060–2063, 20 set. 2002.

BUTZ, E. A.; BEVAN, M. J. Massive Expansion of Antigen-Specific CD8+ T Cells during an Acute Virus Infection. **Immunity**, v. 8, n. 2, p. 167–175, fev. 1998.

BYERS, V. S.; SERCARZ, E. E. THE X-Y-Z SCHEME OF IMMUNOCYTE MATURATION. **Journal of Experimental Medicine**, v. 127, n. 2, p. 307–325, 1 fev. 1968.

CANNARILE, M. A. et al. Transcriptional regulator Id2 mediates CD8+ T cell immunity. **Nature Immunology**, v. 7, n. 12, p. 1317–1325, dez. 2006.

CASTELLINO, F. et al. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell–dendritic cell interaction. **Nature**, v. 440, n. 7086, p. 890–895, abr. 2006.

CHANG, J. T. et al. Asymmetric T Lymphocyte Division in the Initiation of Adaptive Immune Responses. **Science**, v. 315, n. 5819, p. 1687–1691, 23 mar. 2007.

CHANG, J. T.; WHERRY, E. J.; GOLDRATH, A. W. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. **Nature Immunology**, v. 15, n. 12, p. 1104–1115, dez. 2014.

CHEN, G. et al. Ezh2 Regulates Activation-Induced CD8+ T Cell Cycle Progression via Repressing Cdkn2a and Cdkn1c Expression. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 549, 26 mar. 2018a.

CHEN, L.; FLIES, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 4, p. 227–242, abr. 2013.

CHEN, Q. et al. Cbx4 Sumoylates Prdm16 to Regulate Adipose Tissue Thermogenesis. **Cell Reports**, v. 22, n. 11, p. 2860–2872, mar. 2018b.

CHEN, R. et al. In Vivo RNA Interference Screens Identify Regulators of Antiviral CD4+ and CD8+ T Cell Differentiation. **Immunity**, v. 41, n. 2, p. 325–338, ago. 2014.

CHEN, Y. et al. Transcriptional and Epigenetic Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2826, 7 dez. 2018c.

CHEN, Y.-H. et al. CBX4 Regulates Replicative Senescence of WI-38 Fibroblasts. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. 1–15, 23 fev. 2022.

CHEN, Z. et al. TCF-1-Centered Transcriptional Network Drives an Effector versus Exhausted CD8 T Cell-Fate Decision. **Immunity**, v. 51, n. 5, p. 840- 855.e5, nov. 2019.

COOPER, S. et al. Targeting polycomb to pericentric heterochromatin in embryonic stem cells reveals a role for H2AK119u1 in PRC2 recruitment. **Cell Reports**, v. 7, n. 5, p. 1456–1470, 12 jun. 2014.

CORÉ, N. et al. Altered cellular proliferation and mesoderm patterning in Polycomb-M33-deficient mice. **Development (Cambridge, England)**, v. 124, n. 3, p. 721–729, fev. 1997.

CUI, W. et al. Effects of Signal 3 during CD8 T cell priming: Bystander production of IL-12 enhances effector T cell expansion but promotes terminal differentiation. **Vaccine**, v. 27, n. 15, p. 2177–2187, mar. 2009.

CUI, W.; KAECH, S. M. Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells: Effector and memory T-cell differentiation. **Immunological Reviews**, v. 236, n. 1, p. 151–166, 15 jun. 2010.

DAHLE, O. et al. Transactivation properties of c-Myb are critically dependent on two SUMO-1 acceptor sites that are conjugated in a PIASy enhanced manner. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 6, p. 1338–1348, mar. 2003.

DANIEL, B. et al. Divergent clonal differentiation trajectories of T cell exhaustion. **Nature Immunology**, v. 23, n. 11, p. 1614–1627, nov. 2022.

DANILO, M. et al. Suppression of Tcf1 by Inflammatory Cytokines Facilitates Effector CD8 T Cell Differentiation. **Cell Reports**, v. 22, n. 8, p. 2107–2117, fev. 2018.

DE OBALDIA, M. E.; BHANDOOLA, A. Transcriptional Regulation of Innate and Adaptive Lymphocyte Lineages. **Annual Review of Immunology**, v. 33, n. 1, p. 607–642, 21 mar. 2015.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The Immune System. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 1, p. 37–49, 6 jul. 2000a.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The Immune System. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 2, p. 108–117, 13 jul. 2000b.

DERBINSKI, J. et al. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. **Nature Immunology**, v. 2, n. 11, p. 1032–1039, nov. 2001.

DIAO, H.; PIPKIN, M. Stability and flexibility in chromatin structure and transcription underlies memory CD8 T-cell differentiation. **F1000Research**, v. 8, 2019.

DOBENECKER, M.-W. et al. Signaling function of PRC2 is essential for TCR-driven T cell responses. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 4, p. 1101–1113, 2 abr. 2018.

DOERING, T. A. et al. Network Analysis Reveals Centrally Connected Genes and Pathways Involved in CD8+ T Cell Exhaustion versus Memory. **Immunity**, v. 37, n. 6, p. 1130–1144, dez. 2012.

D'SOUZA, W. N.; HEDRICK, S. M. Cutting Edge: Latecomer CD8 T Cells Are Imprinted with a Unique Differentiation Program. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 2, p. 777–781, 15 jul. 2006.

DUDLEY, M. E. et al. Cancer Regression and Autoimmunity in Patients After Clonal Repopulation with Antitumor Lymphocytes. **Science**, v. 298, n. 5594, p. 850–854, 25 out. 2002.

DUPAGE, M. et al. The chromatin-modifying enzyme Ezh2 is critical for the maintenance of regulatory T cell identity after activation. **Immunity**, v. 42, n. 2, p. 227–238, 17 fev. 2015.

DUSTIN, M. L. T-cell activation through immunological synapses and kinapses. **Immunological Reviews**, v. 221, n. 1, p. 77–89, fev. 2008.

EHL, S. et al. The Impact of Variation in the Number of CD8+T-Cell Precursors on the Outcome of Virus Infection. **Cellular Immunology**, v. 189, n. 1, p. 67–73, out. 1998.

ELTANBOULY, M. A.; NOELLE, R. J. Rethinking peripheral T cell tolerance: checkpoints across a T cell's journey. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 4, p. 257–267, abr. 2021.

ENDOH, M. et al. Histone H2A mono-ubiquitination is a crucial step to mediate PRC1-dependent repression of developmental genes to maintain ES cell identity. **PLoS genetics**, v. 8, n. 7, p. e1002774, 2012.

ESCOBAR, T. M. et al. miR-155 activates cytokine gene expression in Th17 cells by regulating the DNA-binding protein Jarid2 to relieve polycomb-mediated repression. **Immunity**, v. 40, n. 6, p. 865–879, 19 jun. 2014.

ESKELAND, R. et al. Ring1B compacts chromatin structure and represses gene expression independent of histone ubiquitination. **Molecular Cell**, v. 38, n. 3, p. 452–464, 14 maio 2010.

ESTRUCH, S. B. et al. The language-related transcription factor FOXP2 is post-translationally modified with small ubiquitin-like modifiers. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 20911, 12 fev. 2016.

FARCAS, A. M. et al. KDM2B links the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) to recognition of CpG islands. **eLife**, v. 1, p. e00205, 18 dez. 2012.

FENG, X. et al. Transcription factor Foxp1 exerts essential cell-intrinsic regulation of the quiescence of naive T cells. **Nature Immunology**, v. 12, n. 6, p. 544–550, jun. 2011.

FISCHLE, W. et al. Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. **Genes & Development**, v. 17, n. 15, p. 1870–1881, 1 ago. 2003.

GALLIMORE, A. et al. Induction and Exhaustion of Lymphocytic Choriomeningitis Virus–specific Cytotoxic T Lymphocytes Visualized Using Soluble Tetrameric Major Histocompatibility Complex Class I–Peptide Complexes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 187, n. 9, p. 1383–1393, 4 maio 1998.

GAO, Z. et al. PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes. **Molecular Cell**, v. 45, n. 3, p. 344–356, 10 fev. 2012.

GATTINONI, L. et al. A human memory T cell subset with stem cell–like properties. **Nature Medicine**, v. 17, n. 10, p. 1290–1297, out. 2011.

GAUTAM, S. et al. The transcription factor c-Myb regulates CD8+ T cell stemness and antitumor immunity. **Nature Immunology**, v. 20, n. 3, p. 337–349, mar. 2019.

GEBHARDT, T. et al. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. **Nature Immunology**, v. 10, n. 5, p. 524–530, maio 2009.

GEISS-FRIEDLANDER, R.; MELCHIOR, F. Concepts in sumoylation: a decade on. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 12, p. 947–956, dez. 2007.

GERLACH, C. et al. One naive T cell, multiple fates in CD8+ T cell differentiation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 6, p. 1235–1246, 7 jun. 2010.

GILES, J. R. et al. Shared and distinct biological circuits in effector, memory and exhausted CD8+ T cells revealed by temporal single-cell transcriptomics and epigenetics. **Nature Immunology**, v. 23, n. 11, p. 1600–1613, nov. 2022.

GODEC, J. et al. Inducible RNAi in vivo reveals that the transcription factor BATF is required to initiate but not maintain CD8 $^{+}$ T-cell effector differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 2, p. 512–517, 13 jan. 2015.

GRAY, S. M. et al. Polycomb Repressive Complex 2-Mediated Chromatin Repression Guides Effector CD8+ T Cell Terminal Differentiation and Loss of Multipotency. **Immunity**, v. 46, n. 4, p. 596–608, 18 abr. 2017.

GUNN, M. D. et al. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 1, p. 258–263, 6 jan. 1998.

HAMANN, D. et al. Phenotypic and Functional Separation of Memory and Effector Human CD8+ T Cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 9, p. 1407–1418, 3 nov. 1997.

HARGREAVES, D. C.; CRABTREE, G. R. ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. **Cell Research**, v. 21, n. 3, p. 396–420, mar. 2011.

HARTY, J. T.; TVINNEREIM, A. R.; WHITE, D. W. CD8+ T Cell Effector Mechanisms in Resistance to Infection. **Annual Review of Immunology**, v. 18, n. 1, p. 275–308, abr. 2000.

HE, R. et al. Follicular CXCR5-expressing CD8+ T cells curtail chronic viral infection. **Nature**, v. 537, n. 7620, p. 412–416, 15 set. 2016.

HE, S. et al. Ezh2 phosphorylation state determines its capacity to maintain CD8+ T memory precursors for antitumor immunity. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 2125, dez. 2017.

HEFFNER, M.; FEARON, D. T. Loss of T cell receptor-induced Bmi-1 in the KLRG1(+) senescent CD8(+) T lymphocyte. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 33, p. 13414–13419, 14 ago. 2007.

HEMMERICH, S. et al. Sulfation of L-Selectin Ligands by an HEV-Restricted Sulfotransferase Regulates Lymphocyte Homing to Lymph Nodes. **Immunity**, v. 15, n. 2, p. 237–247, ago. 2001.

HENNING, A. N.; ROYCHOUDHURI, R.; RESTIFO, N. P. Epigenetic control of CD8+ T cell differentiation. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 5, p. 340–356, maio 2018.

HERNDLER-BRANDSTETTER, D. et al. KLRG1+ Effector CD8+ T Cells Lose KLRG1, Differentiate into All Memory T Cell Lineages, and Convey Enhanced Protective Immunity. **Immunity**, v. 48, n. 4, p. 716- 729.e8, abr. 2018.

HERRATH, M.; WHITTON, J. L. Animal Models Using Lymphocytic Choriomeningitis Virus. **Current Protocols in Immunology**, v. 36, n. 1, abr. 2000.

HNISZ, D. et al. Super-Enhancers in the Control of Cell Identity and Disease. **Cell**, v. 155, n. 4, p. 934–947, nov. 2013.

HOD-DVORAI, R. et al. The binding activity of Mel-18 at the Il17a promoter is regulated by the integrated signals of the TCR and polarizing cytokines. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 8, p. 2424–2435, ago. 2011.

HOLLIDAY, R.; PUGH, J. E. DNA modification mechanisms and gene activity during development. **Science (New York, N.Y.)**, v. 187, n. 4173, p. 226–232, 24 jan. 1975.

HOSOKAWA, H.; ROTHENBERG, E. V. How transcription factors drive choice of the T cell fate. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 3, p. 162–176, mar. 2021.

HOTCHKISS, R. D. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 175, n. 1, p. 315–332, ago. 1948.

HUANG, A. C. et al. T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. **Nature**, v. 545, n. 7652, p. 60–65, maio 2017.

HUANG, Y. et al. Combinatorial Control of Recruitment of a Variant PRC1.6 Complex in Embryonic Stem Cells. **Cell Reports**, v. 22, n. 11, p. 3032–3043, mar. 2018.

HUDSON, W. H. et al. Proliferating Transitory T Cells with an Effector-like Transcriptional Signature Emerge from PD-1+ Stem-like CD8+ T Cells during Chronic Infection. **Immunity**, v. 51, n. 6, p. 1043- 1058.e4, dez. 2019.

HWANG, J.-R. et al. Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 52, n. 5, p. 750–761, maio 2020.

IKAWA, T. et al. Conversion of T cells to B cells by inactivation of polycomb-mediated epigenetic suppression of the B-lineage program. **Genes & Development**, v. 30, n. 22, p. 2475–2485, 15 nov. 2016.

ILLINGWORTH, R. S. et al. The E3 ubiquitin ligase activity of RING1B is not essential for early mouse development. **Genes & Development**, v. 29, n. 18, p. 1897–1902, 15 set. 2015.

IM, S. J. et al. Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. **Nature**, v. 537, n. 7620, p. 417–421, 15 set. 2016.

INTLEKOFER, A. M. et al. Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p. 1236–1244, 1 dez. 2005.

ISMAIL, I. H. et al. CBX4-mediated SUMO modification regulates BMI1 recruitment at sites of DNA damage. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 12, p. 5497–5510, jul. 2012.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature Immunology**, v. 16, n. 4, p. 343–353, abr. 2015.

JACOBS, J. J. et al. The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. **Nature**, v. 397, n. 6715, p. 164–168, 14 jan. 1999.

JACOBSEN, J. A. et al. EZH2 Regulates the Developmental Timing of Effectors of the Pre-Antigen Receptor Checkpoints. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 198, n. 12, p. 4682–4691, 15 jun. 2017.

JAMESON, S. C.; MASOPUST, D. Diversity in T Cell Memory: An Embarrassment of Riches. **Immunity**, v. 31, n. 6, p. 859–871, dez. 2009.

JEANNET, G. et al. Essential role of the Wnt pathway effector Tcf-1 for the establishment of functional CD8 T cell memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 21, p. 9777–9782, 25 maio 2010.

JIANG, N. et al. CBX4 transcriptionally suppresses KLF6 via interaction with HDAC1 to exert oncogenic activities in clear cell renal cell carcinoma. **EBioMedicine**, v. 53, p. 102692, mar. 2020.

JOSHI, N. S. et al. Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8+ T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. **Immunity**, v. 27, n. 2, p. 281–295, ago. 2007.

KAECH, S. M. et al. Molecular and Functional Profiling of Memory CD8 T Cell Differentiation. **Cell**, v. 111, n. 6, p. 837–851, dez. 2002.

KAECH, S. M. et al. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. **Nature Immunology**, v. 4, n. 12, p. 1191–1198, dez. 2003.

KAECH, S. M.; CUI, W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 11, p. 749–761, nov. 2012.

KAECH, S. M.; WHERRY, E. J. Heterogeneity and Cell-Fate Decisions in Effector and Memory CD8+ T Cell Differentiation during Viral Infection. **Immunity**, v. 27, n. 3, p. 393–405, set. 2007.

KAGEY, M. H.; MELHUISH, T. A.; WOTTON, D. The Polycomb Protein Pc2 Is a SUMO E3. **Cell**, v. 113, n. 1, p. 127–137, abr. 2003.

KAKARADOV, B. et al. Early transcriptional and epigenetic regulation of CD8+ T cell differentiation revealed by single-cell RNA sequencing. **Nature Immunology**, v. 18, n. 4, p. 422–432, abr. 2017.

KALLIES, A. et al. Blimp-1 Transcription Factor Is Required for the Differentiation of Effector CD8+ T Cells and Memory Responses. **Immunity**, v. 31, n. 2, p. 283–295, ago. 2009.

KALLIES, A.; ZEHN, D.; UTZSCHNEIDER, D. T. Precursor exhausted T cells: key to successful immunotherapy? **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 2, p. 128–136, fev. 2020.

KANAMORI, M. et al. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. **Trends in Immunology**, v. 37, n. 11, p. 803–811, nov. 2016.

KANG, X. et al. SUMO-Specific Protease 2 Is Essential for Suppression of Polycomb Group Protein-Mediated Gene Silencing during Embryonic Development. **Molecular Cell**, v. 38, n. 2, p. 191–201, abr. 2010.

KANNO, Y. et al. Transcriptional and Epigenetic Control of T Helper Cell Specification: Molecular Mechanisms Underlying Commitment and Plasticity. **Annual Review of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 707–731, 23 abr. 2012.

KAO, C. et al. Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8+ T cell responses during chronic infection. **Nature Immunology**, v. 12, n. 7, p. 663–671, jul. 2011.

KAUSTOV, L. et al. Recognition and specificity determinants of the human cbx chromodomains. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 1, p. 521–529, 7 jan. 2011.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 373–384, maio 2010.

KHAN, O. et al. TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8+ T cell exhaustion. **Nature**, v. 571, n. 7764, p. 211–218, jul. 2019.

KIM, M. V. et al. The Transcription Factor Foxo1 Controls Central-Memory CD8+ T Cell Responses to Infection. **Immunity**, v. 39, n. 2, p. 286–297, ago. 2013.

KOHLMEIER, J. E. et al. Inflammatory chemokine receptors regulate CD8+ T cell contraction and memory generation following infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 8, p. 1621–1634, 1 ago. 2011.

KORNBERG, R. D. Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA: Chromatin structure is based on a repeating unit of eight histone molecules and about 200 DNA base pairs. **Science**, v. 184, n. 4139, p. 868–871, 24 maio 1974.

KOSS, B. et al. Epigenetic Control of *Cdkn2a.Arf* Protects Tumor-Infiltrating Lymphocytes from Metabolic Exhaustion. **Cancer Research**, v. 80, n. 21, p. 4707–4719, 1 nov. 2020.

KOUZARIDES, T. Chromatin Modifications and Their Function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693–705, fev. 2007.

KU, M. et al. Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. **PLoS genetics**, v. 4, n. 10, p. e1000242, out. 2008.

KURACHI, M. et al. Chemokine receptor CXCR3 facilitates CD8+ T cell differentiation into short-lived effector cells leading to memory degeneration. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 8, p. 1605–1620, 1 ago. 2011.

KURACHI, M. et al. The transcription factor BATF operates as an essential differentiation checkpoint in early effector CD8+ T cells. **Nature Immunology**, v. 15, n. 4, p. 373–383, abr. 2014.

KURACHI, M. CD8+ T cell exhaustion. **Seminars in Immunopathology**, v. 41, n. 3, p. 327–337, maio 2019.

KYEWSKI, B.; KLEIN, L. A CENTRAL ROLE FOR CENTRAL TOLERANCE. **Annual Review of Immunology**, v. 24, n. 1, p. 571–606, 1 abr. 2006.

LI, B. et al. Polycomb protein Cbx4 promotes SUMO modification of *de novo* DNA methyltransferase Dnmt3a. **Biochemical Journal**, v. 405, n. 2, p. 369–378, 15 jul. 2007.

LI, F. et al. Ezh2 programs TFH differentiation by integrating phosphorylation-dependent activation of Bcl6 and polycomb-dependent repression of p19Arf. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 5452, 21 dez. 2018.

LI, J. et al. Cbx4 Governs HIF-1α to Potentiate Angiogenesis of Hepatocellular Carcinoma by Its SUMO E3 Ligase Activity. **Cancer Cell**, v. 25, n. 1, p. 118–131, jan. 2014a.

LI, J. et al. Polycomb chromobox (Cbx) 7 modulates activation-induced CD4+ T cell apoptosis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 564, p. 184–188, 15 dez. 2014b.

LI, J. et al. KDM6B-dependent chromatin remodeling underpins effective virus-specific CD8+ T cell differentiation. **Cell Reports**, v. 34, n. 11, p. 108839, mar. 2021.

LI, W. et al. Chromobox 4 (CBX4) promotes tumor progression and stemness via activating CDC20 in gastric cancer. **Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 13, n. 3, p. 1058–1072, jun. 2022.

LIN, W.-H. W. et al. CD8 + T Lymphocyte Self-Renewal during Effector Cell Determination. **Cell Reports**, v. 17, n. 7, p. 1773–1782, nov. 2016.

LIU, B. et al. Cbx4 regulates the proliferation of thymic epithelial cells and thymus function. **Development**, v. 140, n. 4, p. 780–788, 15 fev. 2013.

LUGLI, E. et al. Stem, Effector, and Hybrid States of Memory CD8+ T Cells. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 1, p. 17–28, jan. 2020.

LUIS, N. M. et al. Regulation of Human Epidermal Stem Cell Proliferation and Senescence Requires Polycomb- Dependent and -Independent Functions of Cbx4. **Cell Stem Cell**, v. 9, n. 3, p. 233–246, set. 2011.

MACIÁN, F. et al. Transcriptional Mechanisms Underlying Lymphocyte Tolerance. **Cell**, v. 109, n. 6, p. 719–731, jun. 2002.

MAN, K. et al. Transcription Factor IRF4 Promotes CD8+ T Cell Exhaustion and Limits the Development of Memory-like T Cells during Chronic Infection. **Immunity**, v. 47, n. 6, p. 1129- 1141.e5, dez. 2017.

MAQBOOL, M. A. et al. Alternative Enhancer Usage and Targeted Polycomb Marking Hallmark Promoter Choice during T Cell Differentiation. **Cell Reports**, v. 32, n. 7, p. 108048, 18 ago. 2020.

MARDARYEV, A. N. et al. Cbx4 maintains the epithelial lineage identity and cell proliferation in the developing stratified epithelium. **Journal of Cell Biology**, v. 212, n. 1, p. 77–89, 4 jan. 2016.

MARGUERON, R.; REINBERG, D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 343–349, jan. 2011.

MARTINEZ, G. J. et al. The Transcription Factor NFAT Promotes Exhaustion of Activated CD8 + T Cells. **Immunity**, v. 42, n. 2, p. 265–278, fev. 2015.

MARZO, A. L. et al. Initial T cell frequency dictates memory CD8+ T cell lineage commitment. **Nature Immunology**, v. 6, n. 8, p. 793–799, ago. 2005.

MATLOUBIAN, M. et al. Genetic basis of viral persistence: single amino acid change in the viral glycoprotein affects ability of lymphocytic choriomeningitis virus to persist in adult mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 172, n. 4, p. 1043–1048, 1 out. 1990.

MCLANE, L. M.; ABDEL-HAKEEM, M. S.; WHERRY, E. J. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. **Annual Review of Immunology**, v. 37, n. 1, p. 457–495, 26 abr. 2019.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 24 jul. 2008.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, CHARLES. J. Innate immune recognition: mechanisms and pathways: Innate immune recognition. **Immunological Reviews**, v. 173, n. 1, p. 89–97, fev. 2000.

MEHTA, A. K.; GRACIAS, D. T.; CROFT, M. TNF activity and T cells. **Cytokine**, v. 101, p. 14–18, jan. 2018.

MELO, G. A. et al. Epigenetic regulation of T cells by Polycomb group proteins. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 111, n. 6, p. 1253–1267, jun. 2022.

MERRILL, J. C. et al. A Role for Non-Covalent SUMO Interaction Motifs in Pc2/CBX4 E3 Activity. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, p. e8794, 20 jan. 2010.

MERWE, P. A. VAN DER; DAVIS, S. J. Molecular Interactions Mediating T Cell Antigen Recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 21, n. 1, p. 659–684, abr. 2003.

MILLER, B. C. et al. Subsets of exhausted CD8+ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. **Nature Immunology**, v. 20, n. 3, p. 326–336, mar. 2019.

MIYAZAKI, M. et al. Thymocyte proliferation induced by pre-T cell receptor signaling is maintained through polycomb gene product Bmi-1-mediated Cdkn2a repression. **Immunity**, v. 28, n. 2, p. 231–245, fev. 2008.

MO, J. et al. DDX3X: structure, physiologic functions and cancer. **Molecular Cancer**, v. 20, n. 1, p. 38, 24 fev. 2021.

MOGNOL, G. P. et al. Exhaustion-associated regulatory regions in CD8 $^{+}$ tumor-infiltrating T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 13, 28 mar. 2017.

MOREY, L. et al. Nonoverlapping Functions of the Polycomb Group Cbx Family of Proteins in Embryonic Stem Cells. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 1, p. 47–62, jan. 2012.

MUELLER, D. L. E3 ubiquitin ligases as T cell anergy factors. **Nature Immunology**, v. 5, n. 9, p. 883–890, set. 2004.

NAKANISHI, Y. et al. CD8+ T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4+ T-cell help. **Nature**, v. 462, n. 7272, p. 510–513, nov. 2009.

NEITZKE-MONTINELLI, V. et al. Differentiation of Memory CD8 T Cells Unravel Gene Expression Pattern Common to Effector and Memory Precursors. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 840203, 2022.

NOLZ, J. C.; STARBECK-MILLER, G. R.; HARTY, J. T. Naive, effector and memory CD8 T-cell trafficking: parallels and distinctions. **Immunotherapy**, v. 3, n. 10, p. 1223–1233, out. 2011.

NUTT, S. L. et al. EZH2 function in immune cell development. **Biological Chemistry**, v. 401, n. 8, p. 933–943, 28 jul. 2020.

OBAR, J. J.; KHANNA, K. M.; LEFRANÇOIS, L. Endogenous Naive CD8+ T Cell Precursor Frequency Regulates Primary and Memory Responses to Infection. **Immunity**, v. 28, n. 6, p. 859–869, jun. 2008.

ODORIZZI, P. M. et al. Genetic absence of PD-1 promotes accumulation of terminally differentiated exhausted CD8+ T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 212, n. 7, p. 1125–1137, 29 jun. 2015.

OGURO, H. et al. Poised Lineage Specification in Multipotential Hematopoietic Stem and Progenitor Cells by the Polycomb Protein Bmi1. **Cell Stem Cell**, v. 6, n. 3, p. 279–286, mar. 2010.

O'LOGHLEN, A. et al. MicroRNA Regulation of Cbx7 Mediates a Switch of Polycomb Orthologs during ESC Differentiation. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 1, p. 33–46, jan. 2012.

ONODERA, A.; NAKAYAMA, T. Epigenetics of T cells regulated by Polycomb/Trithorax molecules. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 5, p. 330–340, maio 2015.

ORAVECZ, A. et al. Ikaros mediates gene silencing in T cells through Polycomb repressive complex 2. **Nature Communications**, v. 6, p. 8823, 9 nov. 2015.

O'SHEA, J. J.; PAUL, W. E. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 327, n. 5969, p. 1098–1102, 26 fev. 2010.

PACE, L.; AMIGORENA, S. Epigenetics of T cell fate decision. **Current Opinion in Immunology**, v. 63, p. 43–50, abr. 2020.

PAIS FERREIRA, D. et al. Central memory CD8+ T cells derive from stem-like Tcf7hi effector cells in the absence of cytotoxic differentiation. **Immunity**, v. 53, n. 5, p. 985- 1000.e11, nov. 2020.

PALEY, M. A. et al. Progenitor and Terminal Subsets of CD8 $^{+}$ T Cells Cooperate to Contain Chronic Viral Infection. **Science**, v. 338, n. 6111, p. 1220–1225, 30 nov. 2012.

PALEY, M. A. et al. Technical Advance: Fluorescent reporter reveals insights into eomesodermin biology in cytotoxic lymphocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, n. 2, p. 307–315, 1 fev. 2013.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **The Lancet**, v. 357, n. 9270, p. 1777–1789, jun. 2001.

PAUKEN, K. E. et al. Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. **Science**, v. 354, n. 6316, p. 1160–1165, 2 dez. 2016.

PENGELLY, A. R. et al. Transcriptional repression by PRC1 in the absence of H2A monoubiquitylation. **Genes & Development**, v. 29, n. 14, p. 1487–1492, 15 jul. 2015.

PEREIRA, R. M. et al. Jarid2 is induced by TCR signalling and controls iNKT cell maturation. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 4540, dez. 2014.

PEREIRA, R. M. et al. Transcriptional and epigenetic regulation of T cell hyporesponsiveness. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 102, n. 3, p. 601–615, set. 2017.

PHILIP, M. et al. Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming. **Nature**, v. 545, n. 7655, p. 452–456, maio 2017.

PINTACUDA, G. et al. hnRNPK Recruits PCGF3/5-PRC1 to the Xist RNA B-Repeat to Establish Polycomb-Mediated Chromosomal Silencing. **Molecular Cell**, v. 68, n. 5, p. 955- 969.e10, dez. 2017.

PIPKIN, M. E. et al. Interleukin-2 and Inflammation Induce Distinct Transcriptional Programs that Promote the Differentiation of Effector Cytolytic T Cells. **Immunity**, v. 32, n. 1, p. 79–90, jan. 2010.

PIPKIN, M. E. Runx proteins and transcriptional mechanisms that govern memory CD8 T cell development. **Immunological Reviews**, v. 300, n. 1, p. 100–124, mar. 2021.

PIPKIN, M.; LIEBERMAN, J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 3, p. 301–308, jun. 2007.

PISHESHA, N.; HARMAND, T. J.; PLOEGH, H. L. A guide to antigen processing and presentation. **Nature Reviews Immunology**, v. 22, n. 12, p. 751–764, dez. 2022.

PIUNTI, A.; SHILATIFARD, A. The roles of Polycomb repressive complexes in mammalian development and cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 22, n. 5, p. 326–345, maio 2021.

POLLIZZI, K. N. et al. Asymmetric inheritance of mTORC1 kinase activity during division dictates CD8+ T cell differentiation. **Nature Immunology**, v. 17, n. 6, p. 704–711, jun. 2016.

PRITYKIN, Y. et al. A unified atlas of CD8 T cell dysfunctional states in cancer and infection. **Molecular Cell**, v. 81, n. 11, p. 2477- 2493.e10, jun. 2021.

PRLIC, M.; HERNANDEZ-HOYOS, G.; BEVAN, M. J. Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8+ T cell response. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 9, p. 2135–2143, 4 set. 2006.

QI, H.; KASTENMÜLLER, W.; GERMAIN, R. N. Spatiotemporal Basis of Innate and Adaptive Immunity in Secondary Lymphoid Tissue. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 30, n. 1, p. 141–167, 11 out. 2014.

QUEZADA, L. K. et al. Early transcriptional and epigenetic divergence of CD8+ T cells responding to acute versus chronic infection. **PLOS Biology**, v. 21, n. 1, p. e3001983, 30 jan. 2023.

RAJU, S. et al. Identification of a T-bethi Quiescent Exhausted CD8 T Cell Subpopulation That Can Differentiate into TIM3+CX3CR1+ Effectors and Memory-like Cells. **The Journal of Immunology**, v. 206, n. 12, p. 2924–2936, 15 jun. 2021.

RAO, R. R. et al. Transcription Factor Foxo1 Represses T-bet-Mediated Effector Functions and Promotes Memory CD8+ T Cell Differentiation. **Immunity**, v. 36, n. 3, p. 374–387, mar. 2012.

REN, X. et al. Maintenance of Nucleolar Homeostasis by CBX4 Alleviates Senescence and Osteoarthritis. **Cell Reports**, v. 26, n. 13, p. 3643- 3656.e7, mar. 2019.

ROSE, N. R. et al. RYBP stimulates PRC1 to shape chromatin-based communication between Polycomb repressive complexes. **eLife**, v. 5, 5 out. 2016.

ROTHENBERG, E. V. Transcriptional Control of Early T and B Cell Developmental Choices. **Annual Review of Immunology**, v. 32, n. 1, p. 283–321, 21 mar. 2014.

ROYCHOUDHURI, R. et al. BACH2 regulates CD8+ T cell differentiation by controlling access of AP-1 factors to enhancers. **Nature Immunology**, v. 17, n. 7, p. 851–860, jul. 2016.

RUSS, B. E. et al. Distinct epigenetic signatures delineate transcriptional programs during virus-specific CD8(+) T cell differentiation. **Immunity**, v. 41, n. 5, p. 853–865, 20 nov. 2014.

RUTISHAUSER, R. L. et al. Transcriptional Repressor Blimp-1 Promotes CD8+ T Cell Terminal Differentiation and Represses the Acquisition of Central Memory T Cell Properties. **Immunity**, v. 31, n. 2, p. 296–308, ago. 2009.

SAKAGUCHI, S. Regulatory T Cells. **Cell**, v. 101, n. 5, p. 455–458, maio 2000.

SALLUSTO, F. et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, v. 402, n. S6763, p. 34–38, dez. 1999.

SARAVIA, J.; CHAPMAN, N. M.; CHI, H. Helper T cell differentiation. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 16, n. 7, p. 634–643, jul. 2019.

SATPATHY, A. T. et al. Massively parallel single-cell chromatin landscapes of human immune cell development and intratumoral T cell exhaustion. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 925–936, ago. 2019.

SCHOEFTNER, S. et al. Recruitment of PRC1 function at the initiation of X inactivation independent of PRC2 and silencing. **The EMBO journal**, v. 25, n. 13, p. 3110–3122, 12 jul. 2006.

SCHOENFELDER, S.; FRASER, P. Long-range enhancer–promoter contacts in gene expression control. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 8, p. 437–455, ago. 2019.

SCHUETTENGRUBER, B. et al. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. **Cell**, v. 171, n. 1, p. 34–57, set. 2017.

SCHWARTZ, R. S. Diversity of the Immune Repertoire and Immunoregulation. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 11, p. 1017–1026, 13 mar. 2003.

SCOTT, A. C. et al. TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation. **Nature**, v. 571, n. 7764, p. 270–274, jul. 2019a.

SCOTT, D. D. et al. It's Not the Destination, It's the Journey: Heterogeneity in mRNA Export Mechanisms. Em: OEFFINGER, M.; ZENKLUSEN, D. (Eds.). **The Biology of mRNA: Structure and Function**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2019b. v. 1203p. 33–81.

SCOTT-BROWNE, J. P. et al. Dynamic Changes in Chromatin Accessibility Occur in CD8+ T Cells Responding to Viral Infection. **Immunity**, v. 45, n. 6, p. 1327–1340, 20 dez. 2016.

SEN, D. R. et al. The epigenetic landscape of T cell exhaustion. **Science**, v. 354, n. 6316, p. 1165–1169, 2 dez. 2016.

SEO, H. et al. TOX and TOX2 transcription factors cooperate with NR4A transcription factors to impose CD8 $^{+}$ T cell exhaustion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 25, p. 12410–12415, 18 jun. 2019.

SHANKARAN, V. et al. IFN-γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 1107–1111, 26 abr. 2001.

SHIN, H. M. et al. Epigenetic Modifications Induced by Blimp-1 Regulate CD8+ T Cell Memory Progression during Acute Virus Infection. **Immunity**, v. 39, n. 4, p. 661–675, out. 2013.

SLÜTTER, B. et al. Lung Airway-Surveilling CXCR3hi Memory CD8+ T Cells Are Critical for Protection against Influenza A Virus. **Immunity**, v. 39, n. 5, p. 939–948, nov. 2013.

SMITH-GARVIN, J. E.; KORETZKY, G. A.; JORDAN, M. S. T Cell Activation. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 591–619, 1 abr. 2009.

SNOW, C. J.; PASCHAL, B. M. Roles of the Nucleoporin Tpr in Cancer and Aging. Em: SCHIRMER, E. C.; DE LAS HERAS, J. I. (Eds.). **Cancer Biology and the Nuclear Envelope**. Advances in Experimental Medicine and Biology. New York, NY: Springer New York, 2014. v. 773p. 309–322.

SPEISER, D. E. et al. T cell differentiation in chronic infection and cancer: functional adaptation or exhaustion? **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 11, p. 768–774, nov. 2014.

ŠRAMKO, M. et al. Stress-induced Inactivation of the c-Myb Transcription Factor through Conjugation of SUMO-2/3 Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 52, p. 40065–40075, dez. 2006.

STEMBERGER, C. et al. A Single Naive CD8+ T Cell Precursor Can Develop into Diverse Effector and Memory Subsets. **Immunity**, v. 27, n. 6, p. 985–997, dez. 2007.

ŠTERZL, J.; SILVERSTEIN, A. M. Developmental Aspects of Immunity. Em: **Advances in Immunology**. [s.l.] Elsevier, 1967. v. 6p. 337–459.

STIELOW, B. et al. MGA, L3MBTL2 and E2F6 determine genomic binding of the non-canonical Polycomb repressive complex PRC1.6. **PLOS Genetics**, v. 14, n. 1, p. e1007193, 30 jan. 2018.

STIELOW, C. et al. SUMOylation of the polycomb group protein L3MBTL2 facilitates repression of its target genes. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 5, p. 3044–3058, 1 mar. 2014.

ST-PIERRE, C. et al. Differential Features of AIRE-Induced and AIRE-Independent Promiscuous Gene Expression in Thymic Epithelial Cells. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 2, p. 498–506, 15 jul. 2015.

STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modifications. **Nature**, v. 403, n. 6765, p. 41–45, jan. 2000.

SU, I. -HSIN et al. Polycomb group protein ezh2 controls actin polymerization and cell signaling. **Cell**, v. 121, n. 3, p. 425–436, 6 maio 2005.

SURH, C. D.; SPRENT, J. Homeostasis of Naive and Memory T Cells. **Immunity**, v. 29, n. 6, p. 848–862, dez. 2008.

TAHERBHOY, A. M.; HUANG, O. W.; COCHRAN, A. G. BMI1–RING1B is an autoinhibited RING E3 ubiquitin ligase. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 7621, 7 jul. 2015.

TAKABA, H.; TAKAYANAGI, H. The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 11, p. 805–816, nov. 2017.

TAMBURRI, S. et al. Histone H2AK119 Mono-Ubiquitination Is Essential for Polycomb-Mediated Transcriptional Repression. **Molecular Cell**, v. 77, n. 4, p. 840-856.e5, 20 fev. 2020.

TANIUCHI, I. CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. **Annual Review of Immunology**, v. 36, n. 1, p. 579–601, 26 abr. 2018.

TEIXEIRO, E. et al. Different T Cell Receptor Signals Determine CD8 $^{+}$ Memory Versus Effector Development. **Science**, v. 323, n. 5913, p. 502–505, 23 jan. 2009.

THE ENCODE PROJECT CONSORTIUM. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. **Nature**, v. 489, n. 7414, p. 57–74, set. 2012.

TRAMBAS, C. M.; GRIFFITHS, G. M. Delivering the kiss of death. **Nature Immunology**, v. 4, n. 5, p. 399–403, maio 2003.

TSUI, C. et al. MYB orchestrates T cell exhaustion and response to checkpoint inhibition. **Nature**, v. 609, n. 7926, p. 354–360, 8 set. 2022.

TUMES, D. J. et al. The polycomb protein Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4(+) T helper type 1 and type 2 cells. **Immunity**, v. 39, n. 5, p. 819–832, 14 nov. 2013.

UTZSCHNEIDER, D. T. et al. T Cell Factor 1-Expressing Memory-like CD8+ T Cells Sustain the Immune Response to Chronic Viral Infections. **Immunity**, v. 45, n. 2, p. 415–427, ago. 2016.

VASANTHAKUMAR, A. et al. A non-canonical function of Ezh2 preserves immune homeostasis. **EMBO reports**, v. 18, n. 4, p. 619–631, abr. 2017.

VIRGIN, H. W.; WHERRY, E. J.; AHMED, R. Redefining Chronic Viral Infection. **Cell**, v. 138, n. 1, p. 30–50, jul. 2009.

VOEHRINGER, D. et al. Viral Infections Induce Abundant Numbers of Senescent CD8 T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 9, p. 4838–4843, 1 nov. 2001.

VOEHRINGER, D.; KOSCHELLA, M.; PIRCHER, H. Lack of proliferative capacity of human effector and memory T cells expressing killer cell lectinlike receptor G1 (KLRG1). **Blood**, v. 100, n. 10, p. 3698–3702, 15 nov. 2002.

VOSKOBOINIK, I.; WHISSTOCK, J. C.; TRAPANI, J. A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 6, p. 388–400, jun. 2015.

WADDINGTON, C. H. The Epigenotype. **International Journal of Epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 10–13, fev. 2012.

WANG, D. et al. The Transcription Factor Runx3 Establishes Chromatin Accessibility of cis-Regulatory Landscapes that Drive Memory Cytotoxic T Lymphocyte Formation. **Immunity**, v. 48, n. 4, p. 659- 674.e6, abr. 2018.

WANG, L. et al. Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. **Molecular Cell**, v. 14, n. 5, p. 637–646, 4 jun. 2004.

WANG, Z. et al. Chromobox 4 facilitates tumorigenesis of lung adenocarcinoma through the Wnt/β-catenin pathway. **Neoplasia**, v. 23, n. 2, p. 222–233, fev. 2021.

WEBER, E. W. et al. Transient rest restores functionality in exhausted CAR-T cells through epigenetic remodeling. **Science**, v. 372, n. 6537, p. eaba1786, 2 abr. 2021.

WEI, G. et al. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. **Immunity**, v. 30, n. 1, p. 155–167, 16 jan. 2009.

WEI, H. et al. Cutting Edge: Foxp1 Controls Naive CD8+ T Cell Quiescence by Simultaneously Repressing Key Pathways in Cellular Metabolism and Cell Cycle Progression. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 9, p. 3537–3541, 1 maio 2016.

WELSH, R. M.; SEEDHOM, M. O. Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV): Propagation, Quantitation, and Storage. **Current Protocols in Microbiology**, v. 8, n. 1, fev. 2008.

WHERRY, E. J. et al. Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Impairment. **Journal of Virology**, v. 77, n. 8, p. 4911–4927, 15 abr. 2003.

WHERRY, E. J. et al. Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection. **Immunity**, v. 27, n. 4, p. 670–684, out. 2007.

WHERRY, E. J. T cell exhaustion. **Nature Immunology**, v. 12, n. 6, p. 492–499, jun. 2011.

WHERRY, E. J.; KURACHI, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 8, p. 486–499, ago. 2015.

WIESEL, M.; OXENIUS, A. From crucial to negligible: Functional CD8 $^{+}$ T-cell responses and their dependence on CD4 $^{+}$ T-cell help: HIGHLIGHTS. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 5, p. 1080–1088, maio 2012.

WILLIAMS, M. A.; BEVAN, M. J. Effector and Memory CTL Differentiation. **Annual Review of Immunology**, v. 25, n. 1, p. 171–192, 1 abr. 2007.

WONG, P.; PAMER, E. G. CD8 T Cell Responses to Infectious Pathogens. **Annual Review of Immunology**, v. 21, n. 1, p. 29–70, abr. 2003.

WU, L. et al. CBX4 contributes to HIV-1 latency by forming phase-separated nuclear bodies and SUMOylating EZH2. **EMBO reports**, jun. 2022.

WU, T. et al. The TCF1-Bcl6 axis counteracts type I interferon to repress exhaustion and maintain T cell stemness. **Science Immunology**, v. 1, n. 6, p. eaai8593, 23 dez. 2016.

XIONG, Y. et al. Polycomb antagonizes p300/CREB-binding protein-associated factor to silence FOXP3 in a Kruppel-like factor-dependent manner. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 41, p. 34372–34385, 5 out. 2012.

XU, T. et al. Kdm6b Regulates the Generation of Effector CD8 $^{+}$ T Cells by Inducing Chromatin Accessibility in Effector-Associated Genes. **The Journal of Immunology**, v. 206, n. 9, p. 2170–2183, 1 maio 2021.

XU, T.; KELLER, A.; MARTINEZ, G. J. NFAT1 and NFAT2 Differentially Regulate CTL Differentiation Upon Acute Viral Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 184, 15 fev. 2019.

XU, T.; PEREIRA, R. M.; MARTINEZ, G. J. An Updated Model for the Epigenetic Regulation of Effector and Memory CD8 $^{+}$ T Cell Differentiation. **The Journal of Immunology**, v. 207, n. 6, p. 1497–1505, 15 set. 2021.

YANG, C. Y. et al. The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8+ T cell subsets. **Nature Immunology**, v. 12, n. 12, p. 1221–1229, dez. 2011.

YANG, X.-P. et al. EZH2 is crucial for both differentiation of regulatory T cells and T effector cell expansion. **Scientific Reports**, v. 5, p. 10643, 19 jun. 2015.

YAO, C. et al. Single-cell RNA-seq reveals TOX as a key regulator of CD8+ T cell persistence in chronic infection. **Nature Immunology**, v. 20, n. 7, p. 890–901, jul. 2019.

YAO, S. et al. Interferon Regulatory Factor 4 Sustains CD8+ T Cell Expansion and Effector Differentiation. **Immunity**, v. 39, n. 5, p. 833–845, nov. 2013.

YE, L.-L. et al. The Significance of Tumor Necrosis Factor Receptor Type II in CD8+ Regulatory T Cells and CD8+ Effector T Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 583, 22 mar. 2018.

YOUNGBLOOD, B. et al. Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells. **Nature**, v. 552, n. 7685, p. 404–409, 21 dez. 2017.

ZAJAC, A. J. et al. Viral Immune Evasion Due to Persistence of Activated T Cells Without Effector Function. **Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 12, p. 2205–2213, 21 dez. 1998.

ZEHN, D.; LEE, S. Y.; BEVAN, M. J. Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. **Nature**, v. 458, n. 7235, p. 211–214, mar. 2009.

ZENG, J.-S. et al. CBX4 exhibits oncogenic activities in breast cancer via Notch1 signaling. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 95, p. 1–8, fev. 2018.

ZHANG, N.; BEVAN, M. J. CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. **Immunity**, v. 35, n. 2, p. 161–168, ago. 2011.

ZHANG, Y. et al. The polycomb repressive complex 2 governs life and death of peripheral T cells. **Blood**, v. 124, n. 5, p. 737–749, 31 jul. 2014.

ZHAO, X. SUMO-Mediated Regulation of Nuclear Functions and Signaling Processes. **Molecular Cell**, v. 71, n. 3, p. 409–418, ago. 2018.

ZHAO, X.; SHAN, Q.; XUE, H.-H. TCF1 in T cell immunity: a broadened frontier. **Nature Reviews Immunology**, v. 22, n. 3, p. 147–157, mar. 2022.

ZHENG, Y.; ZHA, Y.; GAJEWSKI, T. F. Molecular regulation of T-cell anergy. **EMBO reports**, v. 9, n. 1, p. 50–55, jan. 2008.

ZHOU, X. et al. Differentiation and Persistence of Memory CD8+ T Cells Depend on T Cell Factor 1. **Immunity**, v. 33, n. 2, p. 229–240, ago. 2010.

ZHOU, X.; XUE, H.-H. Cutting Edge: Generation of Memory Precursors and Functional Memory CD8 $^{+}$ T Cells Depends on T Cell Factor-1 and Lymphoid Enhancer-Binding Factor-1. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 6, p. 2722–2726, 15 set. 2012.

ZINKERNAGEL, R. M.; DOHERTY, P. C. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytes choriomeningitis. **Nature**, v. 251, n. 5475, p. 547–548, out. 1974.

ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J. C. T-cell development made simple. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 1, p. 67–72, jan. 2004.

Check for updates

Received: 20 January 2022 | Revised: 10 March 2022 | Accepted: 1 April 2022

DOI: 10.1002/JLB.2RI0122-039R

JLB JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY

ARTICLE

Epigenetic regulation of T cells by Polycomb group proteins

Guilherme A. Melo[1] | Carolina Calôba[1] | Gabrielle Brum[1] | Thaís O. Passos[1] | Gustavo J. Martinez[2] | Renata M. Pereira[1]

[1]Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Departamento de Imunologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

[2]Center for Cancer Cell Biology, Immunology and Infection, Discipline of Microbiology and Immunology, Rosalind Franklin University of Medicine and Science, Chicago, Illinois, USA

Correspondence
Renata M. Pereira, Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes – IMPG, Centro de Ciências da Saúde – CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Avenida Carlos Chagas Filho, 373, sala D1-035 CEP: 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
Email: renata.pereira@micro.ufrj.br
Gustavo J. Martinez, Center for Cancer Cell Biology, Immunology and Infection, Discipline of Microbiology and Immunology, Rosalind Franklin University of Medicine and Science, Chicago Medical School, 3333 Green Bay Road, North Chicago, IL 60064, USA.
Email: gustavo.martinez@rosalindfranklin.edu

Summary sentence: Review of how PRC1 and 2 regulate T cell development, differentiation, and function.

Abstract

T cells are critical for pathogen elimination, tumor surveillance, and immunoregulation. The development, activation, and differentiation of CD8 and CD4 T lymphocytes are a set of complex and dynamically regulated events that require epigenetic control. The Polycomb group (PcG) proteins are a family of diverse and evolutionarily conserved epigenetic modulators fundamentally involved in several mechanisms of gene regulation. PcG proteins can assemble into distinct repressor complexes, the two most understood being the Polycomb Repressor Complex (PRC)1 and PRC2, which control chromatin structure mainly through posttranslational modifications of histones. In this review, we will summarize the most recent findings regarding the diverse roles performed by PcG proteins in T cell biology. We will focus on PRC1 and PRC2 contribution to the regulation of T cell development in the thymus, CD4 T cell differentiation in helper or regulatory phenotypes and CD8 T cell fate commitment in the context of infections and cancer, highlighting the known mechanisms and knowledge gaps that still need to be addressed.

KEYWORDS
CD4 T cell, CD8 T cell, epigenetics, H2AK119ub, H3K27me3, Polycomb, PRC1, PRC2, T cell development, T cell differentiation, T lymphocyte

1 | INTRODUCTION

T cells are a very important arm of the adaptive immune response, critical for pathogen elimination, tumor surveillance, and immunoregulation. The generation, activation, and differentiation of CD8 and CD4 T lymphocytes comprises a series of complex and regulated processes modulated by cell extrinsic and intrinsic signals that need to be tightly coordinated through specific transcriptional and epigenetic control.[1–5]

The genome of eukaryotic cells is packaged in the nucleus in a macromolecular structure termed chromatin. The fundamental unit of chromatin is the nucleosome, composed of an octamer of 2 of each histones (H3, H2A, H2B, and H4), around which 147 base pairs of DNA are wrapped.[6] The density of nucleosomes near transcriptional control elements determines the accessibility of transcription factors to DNA,

Abbreviations: ATF3, activating transcription factor 3; BACH2, BTB domain and CNC homolog 2; BCL-6, B-cell lymphoma 6; BLIMP-1, B-lymphocyte-induced maturation protein 1; CAR-T, chimeric antigen receptor T cell; CDKN2A, cyclin dependent kinase inhibitor 2A; DLL4, delta like canonical notch ligand 4; DN, double-negative thymocyte; DP, double-positive thymocyte; Eomes, eomesodermin; FOXO1, Forkhead box O1; FOXP3, Forkhead box P3; GATA-3, GATA binding protein 3; GVHD, graft-versus-host disease; Hi-C, high-throughput chromatin conformation capture; HMT, histone methyltransferase; HSC, hematopoietic stem cell; ICOS, inducible T cell costimulatory; ID3, inhibitor of DNA binding 3; KDM, lysine demethylase; KLF2, Krppel like factor 2; KLRG1, killer cell lectin-like receptor G1; LAG-3, lymphocyte activating gene 3; LCK, leukocyte C-terminal Src kinase; LEF1, lymphoid enhancer-binding factor 1; lncRNA, long noncoding ribonucleic acid; NR4A, nuclear receptor subfamily 4 group A; PcG, Polycomb group protein; PD-1, programmed cell death 1; PRC, Polycomb repressor complex; PRDM1, positive regulatory domain I element; PTMs, posttranslational modifications; RAWUL, RING finger and WD40 ubiquitin-like; REPO, recruiter of Polycomb domain; RUNX3, Runt-related transcription factor 3; SET, su(var)3-9, enhancer-of-zeste and trithorax domain; SLE, systemic lupus erythematosus; SLECs, short-lived effector cells; SP, single-positive thymocytes; T-bet, T-box expressed in T cells; TCF, T-cell factor; ThPOK, T-helper-inducing POZ/Krueppel-like factor; TIGIT, T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains; TIM-3, T cell immunoglobulin mucin 3; TOX, thymocyte selection associated high mobility group box; TrxG, Trithorax group protein; Vav, vav guanine nucleotide exchange factor; XIST, X inactive specific transcript; ZEB2, zinc finger E-box binding homeobox 2.

 ©2022 Society for Leukocyte Biology.

orchestrating cell-specific gene expression programs.[7] The control of genome accessibility is dynamic and governed by ATP-dependent chromatin remodeling and chemical modifications of chromatin, including DNA methylation and hydroxymethylation, and histone posttranslational modifications (PTMs).[6,7]

The Polycomb group (PcG) of proteins are transcriptional regulatory factors that impose gene silencing from embryos to adulthood.[8,9] Despite the initial discovery of their role in maintaining the repressed state of homeotic (*Hox*) genes in *D. melanogaster*,[10] PcG proteins are currently known to participate in diverse cellular processes, from flies to vertebrates, including stem cell differentiation, tissue homeostasis, and cancer.[11,12]

In this review, we will discuss recent advances in PcG-mediated gene regulation in T cells. We will initially provide a quick overview on the structure and function of PcG complexes and then discuss the recent literature pointing to their critical role in T cell development, CD4 T cell differentiation in distinct T helper subsets, as well as effector/memory T cell fate decision in CD8 T cells.

2 | STRUCTURE AND FUNCTION OF PCG COMPLEXES

Through the course of metazoan evolution, multiple events of gene duplication seem to have taken place, increasing the number of PcG orthologs.[13] As most PcG proteins form multimeric complexes, the expansion of PcG family not only allows for specialization of paralogs, but also leads to the assembly of structurally and functionally diverse complexes. Of those, Polycomb repressive complex 1 (PRC1) and 2 (PRC2) are the most studied PcG complexes. PRC1 contains E3 ubiquitin ligases that monoubiquitinate lysine 119 of histone H2A (H2AK119ub), whereas PRC2 contains methyltransferases that methylate histone 3 lysine 27 residues by depositing mono-, di-, or tri-methyl groups (H3K27me1, H3K27me2, H3K27me3, respectively).[14,15] Other complexes, including the Polycomb Repressive Deubiquitinase complex, have been discovered.[16,17] However, in this review, we will focus on PRC1 and PRC2, whose function has been more characterized in T cells.

Mammalian PRC1 complexes are very heterogeneous. The core of PRC1 includes one of the E3 ubiquitin ligases Really Interesting New Gene 1A or 1B (RING1A/RING1B), which heterodimerize with a Polycomb group RING finger protein (PCGF) paralog (PCGF 1–6) through their N-terminal RING domains. This RING/PCGF core interacts with additional PRC1 components Chromobox protein (CBX2, CBX4, CBX6, CBX7, or CBX8) or YY1-binding protein (RYBP, or its homolog YAF2), in an exclusive manner, via their C-terminal RAWUL (Ring finger And WD40 Ubiquitin-Like) domains.[18] Based on the proteins that interact with RING RAWUL domain, PRC1 is subdivided into canonical PRC1 (cPRC1), with similar composition to the *D. melanogaster* counterpart, and noncanonical PRC1 (ncPRC1), which include a heterogeneous group of several complexes (Figure 1(A)). cPRC1 is defined by the presence of CBX, homologous to the *Drosophila* Polycomb (Pc) protein, that recognizes H3K27me3 residues, whereas ncPRC1 comprises RYBP or YAF2.[14] Besides the abundance of the core proteins paralogs, cPRC1 and ncPRC1 can interact with different partners, increasing the number and complexity of PRC1 variants.[19,20] Six different complexes (PRC1.1–6) have been identified through ectopic expression of 6 PCGF isoforms or RING1B in 293-TREx human cell line, followed by immunoprecipitation and subsequent liquid chromatography–mass spectrometry[21] (Figure 1(A)). A detailed description of the PRC1 complexes is beyond the scope of this review, but a comprehensive discussion also including distinct ubiquitination activity and genomic localization of these complexes has been previously reported.[14,22]

Like PRC1, mammalian PRC2 complexes can also have different compositions and can be divided in at least two functional subcomplexes: PRC2.1 and PRC2.2. A common core is shared by both complexes, composed of Enhancer of zeste homolog 1 (EZH1) or 2 (EZH2), Embryonic ectoderm development (EED), Supressor of zeste 12 homolog (SUZ12), and a histone binding protein RBBP4/7 (also known as RbAp48/p46) (Figure 1(B)). The paralogs EZH1 and EZH2 contain a SET domain with methyltransferase activity that allow PRC2 to add mono, di or trimethyl groups to H3K27 residues (H3K27me1/2/3).[14,15,18,23] The association of core proteins is essential for the modulation of H3K27me3 methylation activity as well as its propagation across the genome (reviewed in Ref. [24]). In depth discussion of PRC2 complexes composition is beyond the scope of this article, and it has been recently reviewed.[25]

H3K27 methylation, added by PRC2, is a crucial component of PcG-mediated repression. The deposition of the histone marks by EZH1/2 is a cumulative process, which means that H3K27me3 is the result of H3K27me2 methylation.[26] Besides serving as substrate for trimethylation, H3K27me2—as well as H3K27me3—can also prevent H3K27 acetylation, a histone mark associated with gene activation.[27–30] Likewise, the deposition of H2AK119ub prevents the addition of activating histone marks such as H3K4me3, thus maintaining an unfavorable chromatin accessibility for transcriptional initiation.[31] The contribution of H2AK119ub to gene repression has long been debated. Although some studies, both in mice and flies, support that RING ubiquitin ligase activity is dispensable for PRC1-dependent repression,[32–34] others have shown that H2AK119ub is essential.[35–37]

A hierarchical model for PRCs recruitment to the genome was proposed based on *D. melanogaster* studies. Sequence-specific DNA-binding proteins such as Pleiohomeotic (Pho) bind to regulatory elements known as Polycomb response elements and, in turn, recruit PRC2 to neighboring regions in the chromatin to induce methylation of H3K27 residues.[38,39] Then, Cbx proteins in PRC1 recognize H3K27me3 marks deposited by PRC2, leading to further repression of gene expression.[40–43] However, the recruitment of PcG complexes to DNA in mammalian cells is not primarily through sequence-specific DNA-binding factors.[22] In fact, the mechanism of action of mammalian orthologues for many of these proteins are still theme of debate. Many of the PcG proteins assessed, including Yin Yang 1 (YY1), the mammalian orthologue of *Pho*, or PCGF proteins, seemed to not play a major role in PcG recruitment or act in a limited number of contexts.[22,44] Two other key mechanisms for the PcG complexes targeting to DNA in mammals have already been suggested: (i) the partnership with

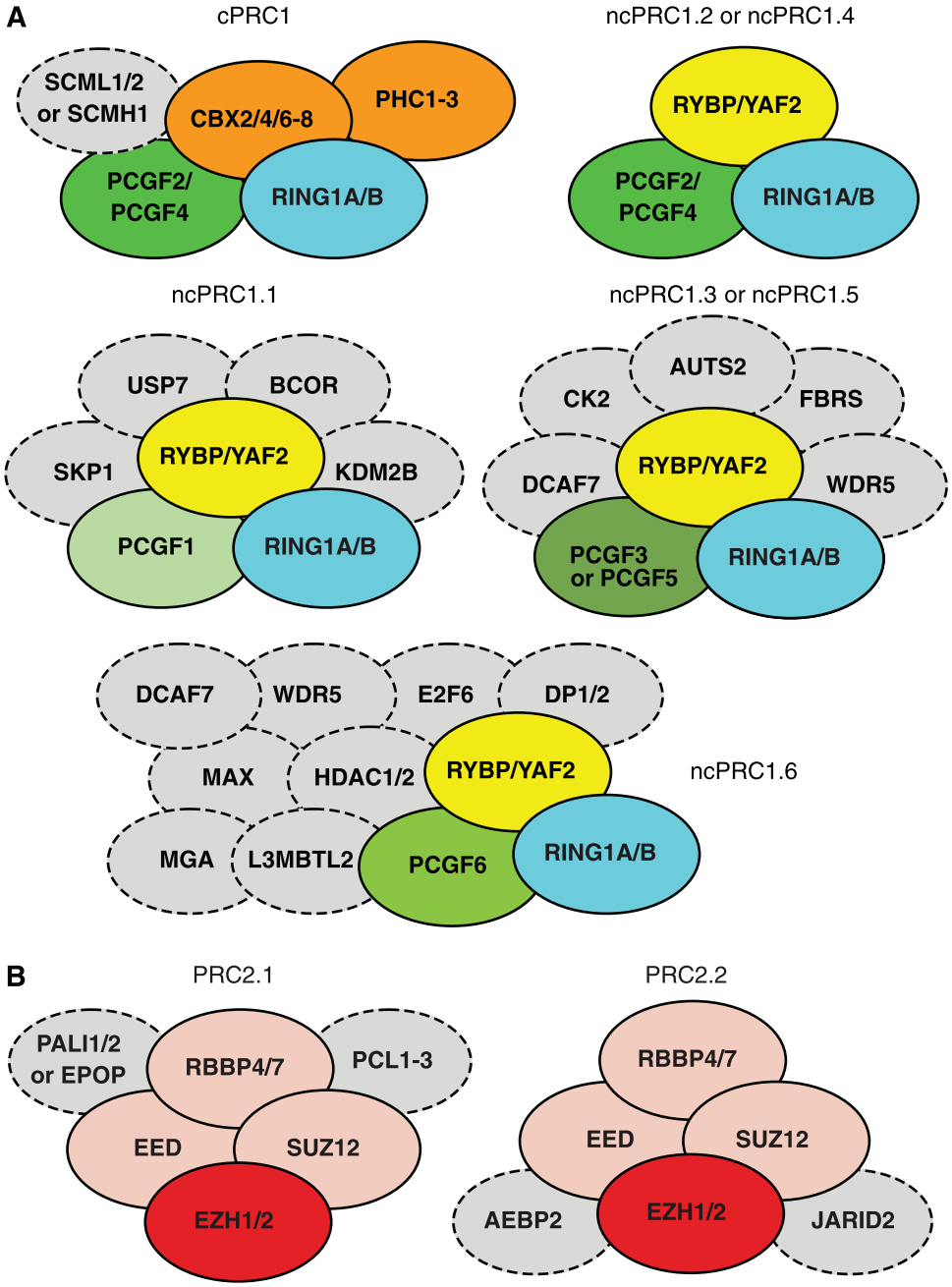


FIGURE 1 Mammalian Polycomb Repressive Complexes (PRC) 1 and 2. (A) The core subunits of all PRC1 complexes are RING1A/B (depicted light blue) and PCGF1-6 (depicted in shades of green). The noncanonical PRC1 complexes (ncPRC1) contain the core proteins together with RYBP or YAF2 (depicted in yellow). The specific PCGF isoform present in a complex defines its further classification. All other accessory proteins are indicated in shades of grey. The distinct complexes are: (i) cPRC1 (canonical PRC1), which contain RING1A/B partnered with PCGF2 (also known as MEL-18) or PCGF4 (also known as BMI-1) and also includes as other core proteins (depicted in orange): a CBX protein (CBX2, CBX4, CBX6, CBX7, or CBX8) and a PHC protein (PHC1-3). SCML1/2 or SCMH1 can also participate as an accessory protein; (ii) The ncPRC1.1 complex contains PGGF1, the histone demethylase KDM2B, BCL-6 corepressor (BCOR), ubiquitin carboxy-terminal hydrolase 7 (USP7) and S-phase kinase-associated protein 1 (SKP1); (iii) ncPRC1.2 or ncPRC1.4 contain either PCFG2 or PCGF4, respectively; (iv) ncPRC1.3 and ncPRC1.5 (possessing PCGF3 or PCGF5) complexes contain casein kinase 2 (CK2), autism susceptibility protein 2 (AUTS2), fibrosin (FBRS), DDB1, and CUL4 associated factor 7 (DCAF7) and WD repeat domain 5 (WDR5); (v) ncPRC1.6, that has PCGF6, contains the transcriptional repressor E2F6, the oncoprotein L3MBTL2, the histone deacetylases HDAC1 or HDAC2, MYC-associated factor X (MAX), MAX gene-associated protein (MGA) and dimerization partner 1 (DP1). In similarity to ncPRC1.3/5, ncPRC1.6 also presents WDR5 and DCAF7 in its assembly. (B) PRC2 core is composed by EZH1/2, EED, SUZ12, and RBBP4/7 together with other substoichiometric subunits. PRC2 can be further divided in: (i) PRC2.1, defined by the presence of one PCL paralog (PCL1-3, also known as PHF1, MTF2 and PHF19, respectively), Elongin BC and Polycomb repressive complex 2-associated protein (EPOP) and PRC2-associated LCOR isoform (PALI)1 or PALI2; and (ii) PRC2.2, which contains adipocyte enhancer-binding protein 2 (AEBP2) and Jumonji and (A+T)-rich interaction domain-containing protein 2 (JARID2)

chromatin-associated long noncoding RNA (lncRNA), as evidenced in the involvement of X chromosome inactivation through interaction with lncRNA *XIST*,[45,46] or Scm mammalian orthologue SCML2 with lncRNA[47]; (ii) and specific targeting to CpG islands, as shown in early genome wide studies as well as through molecular evidence for the ncPRC1.1 complex that incorporates the unmethylated CpG-binding protein KDM2B.[48–50]

Recent research has put the hierarchical model into question and suggested a more cooperative relationship. PRC1 can also be recruited independently of PRC2, and PRC2 can be targeted to chromatin by recognizing H2AK119Ub marks deposited by PRC1.[51–54] In the suggested model, ncPRC1 deposits H2AK119ub that acts as a template for recruitment of PRC2, which in turn adds H3K27me3. Then, this mark further mediates the recruitment of cPRC1, leading to feedback mechanisms amplifying repressive marks deposition throughout long sections of the genome, establishing transcriptionally silent domains.[22,55–57] These domains can establish long-range interactions in the genome and modulate chromatin tridimensional space, as seen by high-throughput chromatin conformation capture (Hi-C).[58–60] Additionally, visualization of these interactions by imaging studies showed them as a highly dynamic focal accumulation of PcG proteins, which were coined "Polycomb bodies."[61,62] Chromatin structure can also be impacted through liquid–liquid phase separation of PcG protein condensates, driven mostly by Cbx2 polymerization capacity.[63,64] How these interactions and structures regulate PRC-mediated functions remains largely unknown and further studies are necessary to unravel these complex features.

Despite the dense body of literature supporting a very critical role of distinct PcGs being recruited and regulating chromatin dynamics, which strongly impacts transcription, the mechanisms through which PRCs regulate gene expression are far from being completely understood. It is plausible to suggest that distinct PRC compositions, in a cell and context specific manner, will dictate the combinatorial role of these proteins together with other epigenetic regulators and transcription factors in cell phenotype definition. In the next section of this review, we will focus on the specific reported roles of PcGs in T cell biology.

3 | ROLE OF PCG PROTEINS IN T CELLS

In this section, we will discuss recent studies on the role of PcG proteins in (i) the generation of T cells in the thymus, (ii) the survival, proliferation and differentiation of CD4 T helper cells, and (iii) the generation of effector and memory CD8 T cells in the context of infection and cancer.

3.1 | PcGs in the development of T lymphocytes

Common lymphoid progenitors upon entering the thymus initiate the commitment toward the T cell lineage. Cells lacking expression of both CD4 and CD8, known as double-negative (DN) cells, are further divided in distinct stages defined by expression of CD44, CD25, and KIT (CD117) into DN1 (early T cell progenitor), DN2a (uncommitted proliferative Notch-dependent precursors), DN2b, DN3a (less proliferative, more Notch-dependent and undergoing TCR rearrangement), DN3b, and DN4 (that lose Notch dependency and proliferate in response to pre-TCR and $\gamma\delta$TCR signals). These cells will then up-regulate both CD4 and CD8 molecules to become double-positive (DP) ($CD4^+CD8^+$) cells, and finally commit into either CD4 or CD8 single-positive (SP) mature cells (reviewed in Ref. [5]).

Deficiency of PRC2 members Ezh2 or Suz12 in early lymphoid progenitor cells, using $Ezh2^{fl/fl}Il7ra^{Cre}$ or $Suz12^{fl/fl}Rag1^{Cre}$ mice, promotes a major defect on lymphopoiesis, as seen by the decrease of overall thymocyte cell numbers.[65,66] In addition to impacting cellularity, Ezh2 deficiency led to altered thymocyte differentiation, showing arrest at the DN3 stage. Consistent with these observations, PRC2 was shown to interact with the pioneer transcription factor Ikaros, a key player of T cell development. Ikaros targets PRC2 to repress several genes activated by Notch pathway or related to hematopoietic stem cells (HSC) as early as the DN3 stage[67] (Figure 2(A)). Ezh2-deficient DN3 thymocytes also displayed up-regulation of apoptosis-related genes *p21* and *Cdkn2a*, which shows H3K27me3 ,[65] suggesting its direct regulation by Ezh2 (Figure 2(B)). However, inactivation of either Ezh2, Eed, or Suz12 at the DP stage using $Ezh2^{fl/fl}CD4^{Cre}$ did not alter the maturation of CD4 or CD8 T cells,[68,69] suggesting their important function early during T cell development.

PRC1 members are also involved in thymocyte development. Double deficiency of Ring1 (using $Ring1a^{-/-}$ $Ring1b^{fl/fl}$ Lck^{Cre} mouse model) led to developmental arrest at the DN3 stage, decreased generation of $TCR\beta^+$ cells and T lineage instability, as shown by the de-repression of B-lineage specific genes such as *Pax5* and *Ebf1*.[70] This correlates with another finding showing de-repression of the same B cell lineage genes in HSC deficient for Bmi-1 (B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1, Pcgf4).[71] Mechanistically, it was demonstrated that Ring1B binds to *Pax5* and *Ebf1* genes, which also showed abundance of the PRC2 repressive mark H3K27me3, suggesting a joint role for PRC1 and PRC2 in T cell lineage stability through the repression of B cell lineage genes (Figure 2(C)). Binding of Ring1A to these loci has not been established, although it is possible that it might also regulate these genes based on genetic studies described above. Additionally, the group also showed that deletion of Ring proteins at the DP stage (using $Ring1a^{-/-}$ $Ring1b^{fl/fl}$ $Cd4^{Cre}$ mice) did not show defects in thymocyte development, indicating that Ring1 is required for early repression of alternative fates, and dispensable at later stages,[70] similar to what was described for PRC2.

Deficiency in other PRC1 members besides the catalytic subunits is associated with defects in lymphocyte differentiation and proliferation in mice.[72,73] Early reports on Bmi-$1^{-/-}$ mice showed reduced cellularity in lymphoid organs and arrested thymocyte development, with higher percentage of DN thymocytes.[74] This same phenotype was observed in mice deficient in Cbx2[75] or Mel-18 (Pcgf2).[76] Additionally, Bmi-1 and Cbx2 were involved in the regulation of DN3 thymocyte proliferation and cell death through binding to *Cdkn2a locus* and maintenance of H3K27me3 levels,[77] suggesting a cooperation between these molecules and Ezh2 or PRC2 complexes. However, direct interaction in this context remains to be demonstrated (Figure 2(B)). Bmi-1 was

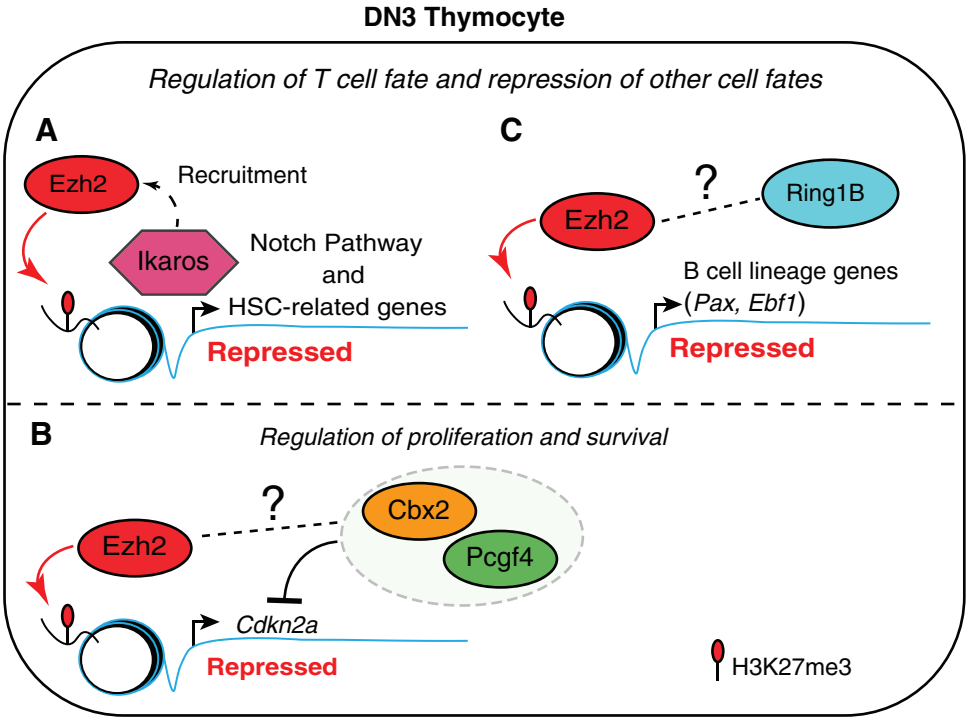


FIGURE 2 The role of PcG proteins on T cell development. Important roles of PcG proteins during DN3 stage of thymocyte development. (A) PRC2 enzymatic subunit Ezh2, recruited by the transcriptional factor Ikaros, deposits its repressive mark (H3K27me3) at the gene *loci* of Notch pathway genes and other HSC-related genes allowing for the progression of thymocyte maturation. (B) Components of both PRC1 (Cbx2 and Pcgf4 (Bmi-1)) and PRC2 (Ezh2) regulate thymocyte proliferation and survival through their repressive role in inhibiting apoptosis-related gene *Cdkn2a*. (C) Ring1B stabilizes T cell lineage commitment through the repression of B cell lineage genes. Deposition of H3K27me3 was also detected on these genomic *loci*; however, whether Ring1B or other PcG proteins engage in the recruitment of Ezh2 to those targets remains unknown

also reported in regulating mitochondrial function in thymocytes[78] and deficiency in this protein led to an increase of reactive oxygen species levels sufficient to trigger DNA damage response pathway, impacting thymocyte development.

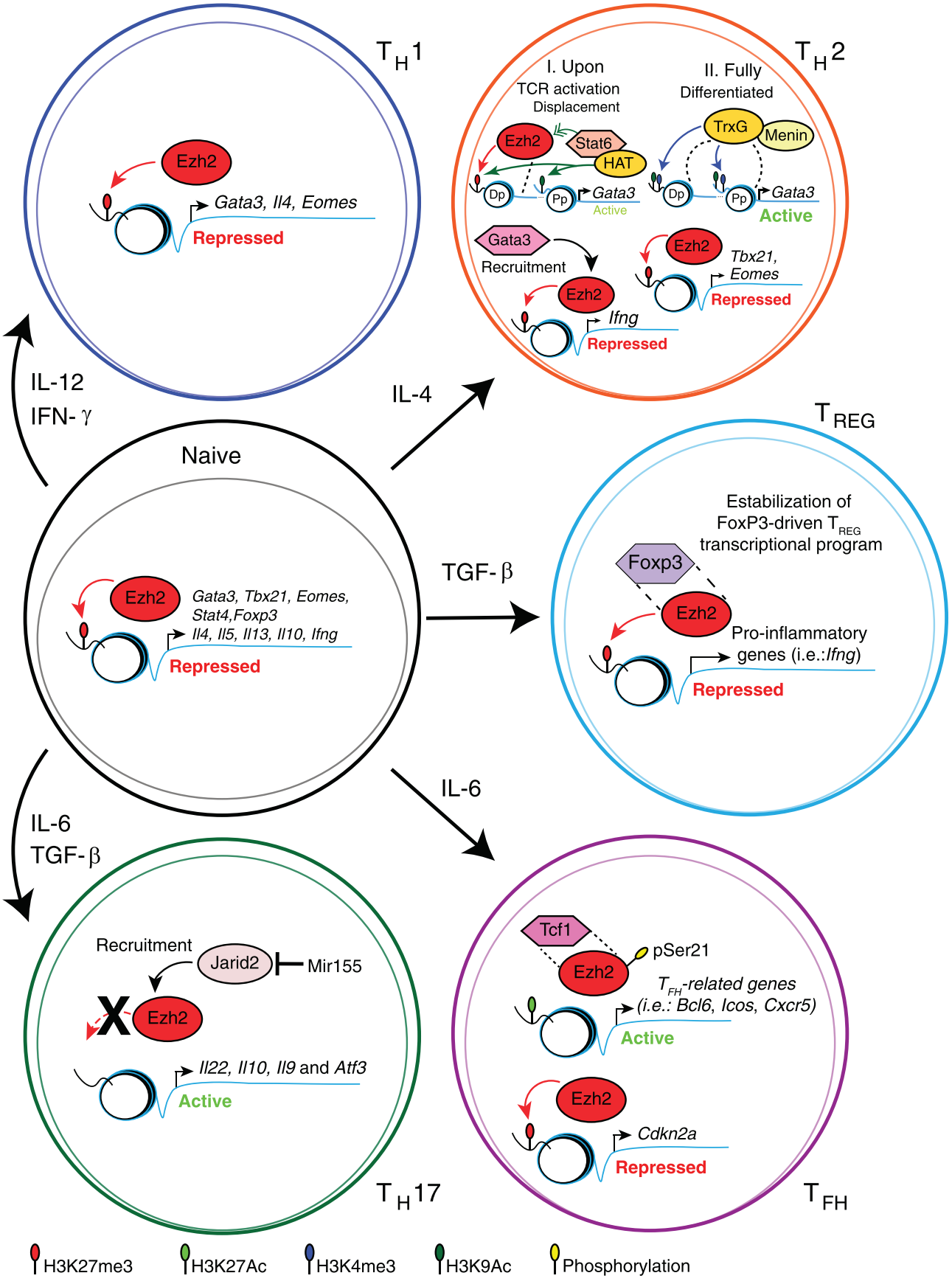
Another PcG protein, YY1, was described as indispensable for adequate development of thymocytes.[79] Inducible YY1 deficiency using $Yy1^{fl/fl}$ $Mx1^{Cre}$ mice treated with IFN-α-stimulating polyinosinic:polycytidylic acid (pI:pC) showed profound impact in T cell development, decreased cell numbers in all thymocyte developmental stages (DN, DP, or SP), and arrest of thymocyte development at the DN3 stage. YY1 deficiency in hematopoietic cells (using $Yy1^{fl/fl}$ Vav^{Cre} mice) also revealed that YY1 promotes thymocyte survival in ex vivo cell cultures. In addition, even though YY1 regulates thymocytes survival through its PcG function, this protein is also required for the DN1-to-DN2 transition and occupies *Notch1* enhancer *locus* regulating *Notch1* expression in a PcG-independent manner, as evidenced by studies using YY1 mutant in the REPO domain (required for recruiting other PcG proteins).[79]

Collectively, these reports indicate that PcG components are crucial for T cell development in murine models. In humans, PcG proteins BMI-1 and EZH2 were found to present distinct expression patterns during T cell development.[73,80] Early-stage DN thymocytes expressed BMI-1 but not EZH2, while more mature DN cells showed expression of both. When transitioning to the DP stage, $BMI\text{-}1^{+}EZH2^{+}$ DN thymocytes lose BMI-1 expression, while retain EZH2 and acquire KI-67 expression (a proliferation marker), suggesting an association between TCR signaling and Ezh2 activity with thymocyte proliferative capacity.[73]

It is evident that PcG proteins play a crucial role in the development of thymocytes, particularly at the DN3 stage. However, given the complexity in composition of PRC complexes, further elucidation of the other components will provide more clarity in the exact complexes regulating T cell development at distinct stages both in experimental models and humans.

3.2 | Role of PRC in the activation, differentiation, and senescence of CD4 T cells

Naïve CD4 T cells upon recognition of cognate antigen presented by antigen-presenting cells (APCs) in the context of MHC-II molecules become activated and can differentiate into distinct T_H subsets depending on the microenvironment in which T cell activation occurred (Figure 3). These T_H subsets are specialized in fighting against specific pathogens, and include: (i) T_H1 cells, polarized by IL-12 and IFN-γ, that express the lineage-determining transcription factor T-bet and produce IFN-γ, IL-2, and TNF among others and are crucial in host responses against intracellular pathogens; (ii) T_H2 cells, polarized by IL-4, that produce IL-4, IL-5, and IL-13, express the lineage-determining


T H 1
Ezh2
Gata3, Il4, Eomes
Repressed
T H 2
I. Upon
TCR activation
Displacement
II. Fully
Differentiated
Ezh2
Stat6
HAT
TrxG
Menin
Dp
Pp
Gata3
Active
Gata3
Recruitment
Ezh2
Tbx21,
Eomes
Repressed
Ifng
Repressed
IL-12
IFN- γ
IL-4
Naive
Ezh2
Gata3, Tbx21, Eomes,
Stat4,Foxp3
Il4, Il5, Il13, Il10, Ifng
Repressed
TGF- β
T REG
Estabilization of
FoxP3-driven T REG
transcriptional program
Foxp3
Ezh2
Pro-inflammatory
genes (i.e.:Ifng)
Repressed
IL-6
TGF- β
IL-6
Recruitment
Jarid2
Mir155
Ezh2
Il22, Il10, Il9 and Atf3
Active
T H 17
Tcf1
Ezh2
pSer21
T FH -related genes
(i.e.: Bcl6, Icos, Cxcr5)
Active
Ezh2
Cdkn2a
Repressed
T FH
H3K27me3
H3K27Ac
H3K4me3
H3K9Ac
Phosphorylation

transcription factor GATA-3 and protect against parasitic infections; (iii) T_H17 cells, polarized by IL-6 together with TGF-β, which express transcription factors RORγt and RORα, and produce IL-17, IL-17F, IL-22, and protect against extracellular pathogens including bacteria and fungi; (iv) T_{FH} cells, polarized by IL-6, which express the lineage-determining transcription factor Bcl6 and produces IL-21, which supports B cell activation and germinal center reactions; (v) T_{REG} cells, polarized by TGF-β, which express the master transcription factor Foxp3 and have immunosuppressive functions through mechanisms that include the production of IL-10, IL-35, and TGF-β. Although T_H subsets were initially thought to be fixed, research over the past 10–15 years has shed light into the plasticity of these cell subsets.[81–83]

In order for naïve T cells to differentiate into the above-mentioned subsets, an active and dynamic chromatin modification process is observed to allow for active transcription and repression of gene expression.[84] In particular, several genes including transcription factors have been shown to contain both activating H3K4me3 and repressive H3K27me3 marks, which has been termed as bivalent domains. Upon activation, loss or gain of either the activating or repressive marks leads to effects in chromatin accessibility, which directly impacts gene expression regulation.

3.2.1 | PcG function in Th1 and Th2 differentiation

PRC2 members, especially Ezh2, are associated with the regulation of CD4 T lymphocyte differentiation, proliferation, and function through modulation of regulatory regions. Through its methyltransferase activity, Ezh2 can directly repress the expression of transcription factors *Tbx21* (T-bet) and *Gata3* (GATA3) (Figure 3). Ezh2-deficient T cells presented high expression of T-bet and IFN-γ upon T_H1 differentiation, and enhanced GATA3 and IL-4 levels were identified during T_H2 differentiation compared with WT control cells. However, lack of Ezh2 also resulted in impaired stability of the effector subsets resulting in acquisition of plasticity when exposed to other T_H differentiation conditions.[85] Similarly, Zhang et al.[86] identified increased IFN-γ production upon Ezh2-deficient naive T cell activation as well as during differentiation of inducible regulatory T cells (iT_{REG}s). PRC2-dependent genetic silencing can also be observed in chemokine promoters, indicating that the expression of these proteins can be regulated epigenetically.[87]

Additional reports indicate that functional balance of PRC2 and TrxG (Trithorax group proteins), which oppose PcG function in part through methylation of H3K4 residues,[15] is relevant to establish the differentiation of T_H1 and T_H2 cells[88,89] (Figure 3). It was shown that expression of GATA3 in T_H2 cells requires STAT6-dependent dissociation of Ezh2 and Suz12 by TrxG. This leads to the concomitant demethylation of H3K27me3 and enrichment of H3K4me3 and H3K9ac marks from the upstream region of the proximal promoter of this gene.[88] GATA3 is required not only for producing T_H2 cytokines and stablish T_H2 cells, but also to repress commitment to T_H1 cells. In line with this, GATA3 expression is necessary for targeting Ezh2 and increase H3K27 methylation in the *Ifng* locus[90] (Figure 3).

Contradictory to previous reports, and to the well-known function of PRC2 components in mediating gene repression, Jacob et al.[91,92] have observed a positive regulation of gene expression by PRC2 proteins Ezh2 and Eed. Ezh2 bound to *Ifng* and *Il4* loci in T_H1 and T_H2 cells respectively in a calcineurin-dependent manner as evidenced by utilization of Calcineurin inhibitor Cyclosporin A, suggesting that NFAT transcription factors might be responsible for this recruitment.[91]

Several studies have highlighted the role of PRC1 components in CD4 T cell differentiation and function. Mel-18, Bmi-1, and Ring1b are required for expression of T_H2-related cytokines, such as IL-4, IL-5, and IL-13,[91,93–95] as well as the T_H2 fate-determining transcription factor GATA3.[93–95] Additionally, both Bmi-1 and Ring1b were also important for T_H2 cell maintenance through the regulation of genes related to apoptosis (e.g., *Cdkn2a*, Bcl-2 protein family genes) and survival (e.g., *Klf2*, *Foxo1*).[95–97] PRC1 component Cbx7 was also reported to regulate apoptosis-related gene FasL in CD4 T cells upon antigen activation.[98] Another report also showed that Delta-like (Dll) 4-dependent Notch signaling up-regulates Bmi-1 expression in naïve CD4 T lymphocytes upon TCR-mediated activation, increasing cell proliferation.[99] In conflict with the above-mentioned reports, it was demonstrated that the long-term maintenance of GATA3 expression in T_H2 cells is dependent not only on the displacement of PRC2 (Ezh2 and Suz12) components, but also of PRC1 (Bmi-1) from the upstream promoter region of the *Gata3* gene locus by Trithorax complex in association with TrxG protein Menin.[88]

3.2.2 | PcG function in T_{FH} differentiation

Ezh2 has also been associated to the induction of genes related to T_{FH} phenotype in response to viral infection, including the key transcription factor *Bcl6* and the surface proteins *Cxcr5* and *Icos*[100,101] (Figure 3). Ezh2 binding to regulatory region of those genes were detected and

FIGURE 3 The role of PRC2 on CD4 T cell differentiation. In naïve CD4 T cells, Ezh2 has been shown to repress expression of master regulators and cytokines from the indicated T_H subsets. In T_H1 and T_H2 CD4 T cells, Ezh2 operates in the promotion of cell fate stability by repressing the master regulator and main cytokine of the opposed subset (*Gata3*, *Il4* and *Il5* in Th1; *Tbx21* and *Ifng* in T_H2). STAT6-dependent displacement of Ezh2 repression and subsequent substitution for Menin-recruited TrxG binding and activation function (H3K9Ac deposition) at *Gata3* locus is essential for the maintenance of *Gata3* expression. In T_{REG}s, Ezh2 also promote transcriptional program stability working in partnership with FoxP3, which recruits the repressive epigenetic modulator to pro-inflammatory genes. In T_{FH} cells, Ser21-phosphorylated Ezh2 is recruited by Tcf1, and binds to and positively regulates transcription of several genes associated with T_{FH} phenotype, which are marked with H3K27Ac. Independently from Tcf1, Ezh2 also performs its classical function as a repressor of apoptosis-related and Bcl6 antagonist gene *Cdkn2a*. In T_H17 cells, mir155, which suppresses Jarid2 and therefore Ezh2 activity, is required for the proper activation of T_H17-related genes such as *Il22*, *Il17a*, and *Atf3*. Dashed lines indicate protein binding to other protein or protein binding to chromatin. Dp, distal promoter. Pp, proximal promoter

correlated with high levels of activation mark H3K27ac deposition and low levels of H3K27me3.[101] Furthermore, the recruitment of Ezh2 to these sites was found to be dependent on Tcf1, and Ezh2 phosphorylation at serine residue 21 was required for induction of *Bcl6* transcription and the establishment of T_{FH} transcriptional program. Ezh2 further enforces T_{FH} commitment and survival through H3K27me3-mediated repression of *Cdkn2a locus* reducing the levels of one of its products, the $p19^{Arf}$ protein, that triggers T_{FH} cell apoptosis and antagonizes Bcl-6 function[101] (Figure 3). However, in contrast to the reports describing Ezh2 as a positive regulator of *Bcl6*, another group showed that adenovirus E4 promoter-binding protein (E4BP4) can inhibit T_{FH} cell differentiation through recruitment of Ezh2, along with HDAC1 (histone deacetylase 1), to *Bcl6 locus*, promoting the deposition of H3K27me3 and removal of H3 acetylation and leading to *Bcl6* repression. This study also showed that the disruption of this mechanism give rise to accumulated T_{FH} and uncontrolled autoimmune reaction in systemic lupus erythematosus (SLE).[102] Besides Ezh2, the ncPRC1.1 complex component BCOR was shown to contribute to the formation of germinal center follicular helper T cells (GC-T_{FH}), as seen by the decreased GC-T_{FH} upon BCOR deficiency, with further impact in germinal center B cell formation and reduced numbers of plasma cells.[103]

3.2.3 | PcG function in T_H17 differentiation

In the context of T_H17 differentiation, Escobar et al.[104] demonstrated that miR-155 negative regulates PRC2 accessory partner Jarid2, allowing proper differentiation of T_H17 cells. In the absence of miR-155, Jarid2 recruits PRC2 to *Il22*, *Il10*, *Il9*, and *Atf3* (important positive regulator of IL-17A cytokine) gene *loci* and induces repression through deposition of H3K27me3 marks (Figure 3). Additionally, *Il17a* and *Il17f* gene expression were also found to be indirectly affected by Jarid2-PRC2 cooperative function.[104] Furthermore, ncPRC1.1 subunits KDM2B and BCOR were also reported to be required for T_H17 cell differentiation, with observed direct binding of BCOR to several T_H17 cell fate repressors, including *Runx2*, *Lef1*, and *Dusp4*, promoting their repression.[105]

3.2.4 | PcG function in T_{REG} differentiation

PRC2 components, including Ezh2, have also been shown to play a prominent role in FOXP3 regulation, and therefore in regulatory T cell biology. In activated T_{REG} cells, FOXP3 directly binds to Ezh2 and recruits it to distinct *loci* to repress the expression of those target genes through trimethylation of H3K27 residues in response to inflammatory conditions[106] (Figure 3). Mice with Ezh2-deficiency in the T lymphocyte compartment ($Ezh2^{fl/fl}$ $CD4^{Cre}$) showed increase in activated T cells and reduced percentage of $FOXP3^+$ CD4 T cells in secondary lymphoid organs. However, the observed defective induction of FOXP3 in Ezh2-deficient cells was not due to cell-intrinsic mechanisms, but rather attributable to aberrant production of IFN-γ and IL-4.[107] Although specific deletion of Ezh2 in regulatory T cells does not seem to impact their generation in young mice, old mice show signs of disrupted immune homeostasis with decreased T_{REG} numbers in nonlymphoid tissues.[108] Activated Ezh2-deficient Tregs also showed altered gene expression patterns, destabilized FOXP3-driven program and impaired function during the resolution of autoimmunity, highlighting Ezh2 role in stabilizing $FOXP3^+$ T_{REG} cells identity by repressing pro-inflammatory genes[108] (Figure 3). In agreement to this, Ezh2 expression is shown to be decreased in the T_{REG} compartment of rheumatoid arthritis patients, leading to abnormal functionality, and FOXP3-Ezh2 partnership is found to be disrupted in inflammatory bowel disease.[109–111] In fact, Ezh2-deficient T_{REG}s presented a shift from immunosuppressive to immunostimulatory functionality, which contributes to the aggravation of autoimmune disease setting.[86,108,110] This characteristic can be used as therapeutic strategy for pathologies where T_{REG} immunosuppressive function is deleterious. In a cancer mouse model, intratumoral T_{REG}s exhibited higher Ezh2 expression than other $Treg_{REG}$ populations or other infiltrating CD4 T cells and Ezh2 pharmacologic ablation or gene deletion promoted the acquisition of proinflammatory phenotype and enhancement of tumor elimination.[112]

Although PRC2 expression in regulatory T cells is indispensable for their generation and function, this complex has also been shown to repress FOXP3 expression in naïve CD4 T lymphocytes. Using the reporter mouse lineage expressing $Foxp3^{EGFP}$, FACS-isolated naïve ($CD62L^+$) or activated ($CD62L^-$) non-T_{REG} (GFP^-) CD4 lymphocytes showed increased H3K27me3 deposition on *Foxp3* promoter in comparison to T_{REG} cells (GFP^+). Furthermore, chromatin immunoprecipitation assay revealed binding of Ezh2 to *Foxp3* gene, with increased occupancy seen on $Foxp3^-$ CD4 T lymphocytes in comparison to $Foxp3^+$ cells.[113]

Follicular regulatory T cells (T_{FR}), a subset from effector T_{REG} population specialized in inhibiting T_{FH}-mediated B cell responses,[114,115] have also been shown to depend on Ezh2 expression to acquire T_{FR} transcriptional program and function. Mice with Ezh2 deletion in T_{REG}s ($Ezh2^{fl/fl}$ $Foxp3^{Cre/Cre}$) showed alteration in the transcriptional profile of T_{FR} cells and subsequent impaired suppressive activity.[116] Interestingly, only a small fraction of the genes altered by Ezh2 deficiency were also altered in Foxp3 KO T_{FR} cells, suggesting that Ezh2 performs a role in the modulation of T_{FR} transcriptional program that partially overlaps with Foxp3. Like Ezh2-deficient T_{REG}s, mice with EED deficiency in T cells showed defective response to TGFβ in vitro, decreasing the induction of FOXP3 expression and up-regulating molecules related to non-T_{REG} differentiation DP-IEL cells ($CD4^+CD8\alpha\alpha^+$ intraepithelial lymphocytes) profile, such as CD8α and CD103. In addition, in vitro cultured EED-deficient CD4 T cells treated with TGFβ also showed lineage instability, marked by the down-regulation of CD4-related transcription factor ThPOK and up-regulation of CD8-related Runx3. These alterations are most likely associated to loss of H3K27me3 caused by malfunction of PRC2 due to EED deficiency.[117]

3.2.5 | Other PcG-regulated CD4 T cell functions

Ezh2 has also proven to be an important regulator of effector differentiation, continuous proliferation, and expansion of allogeneic T cells in graft-versus-host disease (GVHD). Deficiency in Ezh2 in donor T cells resulted in reduced death of the host by GVHD and these cells still retained antileukemic response.[118] In another study using GVHD model, Ezh2-deficient CD4 T cells failed to properly activate and differentiate in T_{FH} subset, disrupting T cell-dependent autoantibody response.[119]

A common feature of Ezh2-deficient T cells in the mouse models examined was their failure to expand in vivo. In murine model, the absence of Ezh2 caused a decrease in the proliferation of CD4 and CD8 T lymphocytes during acute infection by *Toxoplasma gondii* and resulted in a reduction of CD4 T cells in the S/G2 phase when stimulated in vitro. Consistently, these cells showed increased expression of endogenous cell cycle inhibitors *CDKn1a*, *CDKn2a*, and *CDKn2b* and the proapoptotic factors *Pmaip1* and *Perp*.[107]

Finally, in a recent report, Maqbool et al.[120] found that H3K27me3 plays a role in alternative enhancer usage and promoter choice in CD4 T lymphocytes development and differentiation. This additional and dynamic level of transcription regulation coordinates expression of different gene isoforms and could be influenced by PRC2.[120] Yet, it remains to be addressed if PRC2 interacts directly with transcription initiation and elongation factors or whether its impacts in transcriptional processes relies solely on H3K27me3 modification of chromatin accessibility.

Even though Ezh2 acts primarily at the chromatin level, it has also been reported to have a cytoplasmic function by controlling actin polymerization and signaling in T cells.[68] Ezh2 is also necessary for the activation of MEK and ERK kinases downstream of TCR signaling.[121] A cytoplasmic role for Ezh2 has been observed to regulate the post-translational levels of T-bet.[89] Moreover, Ezh2 was shown to contribute to the activation of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling, essential for the acquisition of metabolic fitness that fuels post-activation cell expansion and differentiation, thus connecting metabolic alterations driven by T cell activation with the cell fate commitment process.[122] Future studies dissecting the cytoplasmic versus nuclear function of Ezh2 are needed to uncover its role during T cell differentiation and function.

There is still a major gap in the knowledge of how the distinct PcG complexes regulate T_H cell fate determination and function. Specifically, future research identifying the complexes composition as well as the temporal requirement of each during CD4 T cell differentiation can uncover novel potential therapeutics to be utilized in disease settings.

3.3 | Contribution of PRC to CD8 T cell differentiation and function

Upon antigen activation, naïve CD8 T cells give rise to a heterogeneous pool of effector cells. Within this pool, short-lived effector cells (SLECs) characterized by KLRG-1 expression will die in the contraction phase upon antigen clearance, whereas memory precursor (MP) cells have the potential to give rise to memory CD8 T cells, as reviewed elsewhere.[1,2,123] Based on homing markers and effector function, memory cells can be classified in distinct functional subsets, including central memory cells, that expresses CD62L, CCR7, and low levels of cytotoxic proteins, and effector memory cells that do no express lymph node homing molecules but migrate to inflammatory sites. The discussion of CD8 T cell heterogeneity, consisting of distinct identities or states of differentiation, as well as the transcriptional regulation of CTL differentiation is beyond the scope of this review and has been recently reviewed.[124,125] During chronic infections and diverse cancer types, antigen-specific CD8 T cells show a gradual decrease in effector function, a phenomenon termed CD8 T cell exhaustion, characterized by the expression of inhibitor receptors, including PD-1, LAG-3, and TIM-3, and a reduced effector response, which ensures some level of antiviral or antitumoral response while avoiding immunopathology.[2]

We will discuss in the next sections the recent advances in understanding the function of PcG proteins in the fate decision of CD8 T cells during acute infections, as well as their role in the regulation of CD8 T cell functionality during chronic settings.

3.3.1 | Role of PcG proteins in CD8 T cells during infection

Initial investigations of the CD8 T cell epigenetic landscape from resting naïve, central memory, and effector memory CD8 T cell populations isolated from human blood showed that H3K27me3 levels negatively correlated with mRNA levels, whereas H3K4me3 marks displayed a general positive correlation in all cell types. Interestingly, bivalent *loci* have been found in both memory populations with little overlap between them, as well as in naïve cells.[126] Concordantly, a following work showed that naïve CD8 T cells present bivalent histone methylation marks in key transcription factor genes, such as *Tbx21* (T-bet), *Eomes* (Eomes), and *Irf4* (IRF-4), and upon activation, these poised *loci* rapidly lose H3K27me3, whereas increase H3K4me3 deposition.[127] Additionally, the majority of loci identified to undergo chromatin dynamic regulation through acquisition of H3K4me3 or removal of H3K27me3 were related to T cell immune function and regulation, and were validated as genes up-regulated shortly after cell activation.[127] Consistently, a recent study employing Hi-C analysis showed that H1 compaction promotes H3K27me3 deposition, whereas inhibits permissive H3K36me2, in genes that are de-repressed upon CD8 T cell activation.[128] All these evidences highlight the importance in regulation of H3K27me3 levels leading to epigenetic reprogramming of CD8 T cells upon activation.

The essential role of Ezh2 in driving the commitment to effector CD8 T cell differentiation has been demonstrated[129-131] (Figure 4). Single cell RNA sequencing analysis identified increased expression of PRC2 components as early as the first cell division post-activation in effector cell fate-committed CD8 T cells.[130] In addition, terminal effector CD8 T cells generated in response to acute viral infections showed

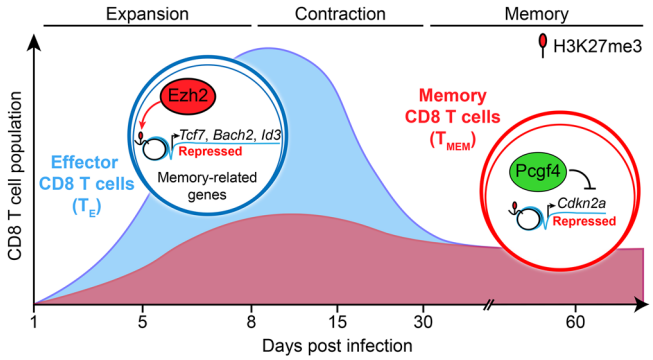


FIGURE 4 The role of PcG proteins on CD8 T cells. In early time points during a response to acute viral infection, effector CD8 T cells (blue curve) up-regulate PRC2 core components and PRC2-dependent H3K27me3 is deposited on memory-related genes, promoting the commitment to effector cell fate. In memory CD8 T cells (red curve), on the other hand, PRC1 component Pcgf4 (Bmi-1) assists on the maintenance of proliferative capacity by inhibiting the apoptosis-related gene *Cdkn2a*

higher levels of H3K27me3 in comparison with MP cells, suggesting this feature as key for effector cell fate commitment.[129,130] Within the loci that contained H3K27me3 marks in effector CD8 T cells, several memory-related genes, such as *Tcf7*, *Bcl6*, *Bach2*, and *Id3*, as well as the pro-survival gene *Bcl2* were identified.[129] Ezh2 was shown to directly bind to some of those genes (*Tcf7*, *Id3*), as well as other genes associated to memory phenotype. Consistently, Ezh2-deficient CD8 T cells showed a preferential decrease in effector differentiation and favored polarization to a memory fate instead, evidenced by the increased expression of memory-related surface markers (CD62L, CD27) and transcription factors (Tcf1).[129,130] Furthermore, deletion of Ezh2 in CD8 T cells resulted in decreased cell numbers and impaired response to acute viral infection with worse pathogen control.[129,130] Similarly, using a *Listeria monocytogenes*-OVA (LM-OVA) infection model, Chen et al.[131] also observed decreased Ezh2-deficient CD8 T cell numbers post-infection. However, analysis of Ezh2-deficient CD8 T cells at day 12 post LM-OVA infection revealed that the majority of CD8 T cells were SLECs ($KLRG1^+CD127^-$). These divergent results could be explained by the usage of different infection models that support distinct inflammatory environments.

Ezh2 was also observed to regulate proliferation and survival of CD8 T cells and different results emerged depending on the temporal deletion of Ezh2 ($CD4^{Cre}$ versus $Gzmb^{Cre}$ models). During acute LCMV infection, Ezh2-deficient CD8 T cell exhibited no defect in proliferation (both $Ezh2^{fl/fl}CD4^{Cre}$ or $Ezh2^{fl/fl}Gzmb^{Cre}$ mouse models), but higher rate of apoptosis was observed in CD8 T cells from $Ezh2^{fl/fl}CD4^{Cre}$ mice, although assessment of apoptosis was not reported for $Ezh2^{fl/fl}Gzmb^{Cre}$ mice during viral infection.[129,130] On the other hand, in vitro activation of CD8 T cells showed impaired proliferation and increased expression of cell cycle checkpoint gene *Cdkn2a*, whereas increased apoptosis was observed only for CD8 T cells from $Ezh2^{fl/fl}CD4^{Cre}$ but not for $Ezh2^{fl/fl}Gzmb^{Cre}$ mice.[131] Other reports have also provided evidence for a role of Ezh2 in cell cycle and DNA damage response in T cells. EZH2 from human T cells coprecipitated with the DNA damage response protein Ku80 and EZH2 inhibition increased DNA damage and apoptosis in CD4 and CD8 T cells.[132]

Besides Ezh2, other PcG proteins have also been reported to participate in the regulation of CD8 T cell differentiation. Using *L. monocytogenes* infection model and in similarity to what was shown for Ezh2 in acute viral infection models, the PcG protein YY1 promoted the differentiation toward the effector phenotype.[133] Additionally, in in vitro chronic-stimulated human T cells, YY1 was found to interact and recruit Ezh2 to repress IL-2 expression, whereas it positively induced expression of inhibitory receptors PD-1, LAG-3, and TIM-3, suggesting a positive interaction between PRC2 function and the acquisition of cellular dysfunction through dysregulation of IL-2.[134]

PRC1 member Bmi-1 has also been involved in the regulation of proliferation, cell cycle, and senescence of mature CD8 T lymphocytes. Resting naïve and memory CD8 T lymphocytes displayed Bmi-1-dependent *Cdkn2a* down-regulation, whereas effector cells ($KLRG1^+$ CD8 T cells) displayed decreased Bmi-1 expression, which correlated with higher expression of *Cdkn2a*.[135] Moreover, mature T cells showed a mutually exclusive expression of Bmi-1 and Ezh2, which is also linked to the proliferation status of the cells.[80] The specific relationship of PRC1 and PRC2 complexes in terms of cell cycle gene expression regulation still remains unclear.

Recent advances highlighted the importance of Ezh2 in the differentiation and function of CD8 T cells in effector or memory cell fate. However, conflicting evidences resulting from different infection models and temporal deletion of Ezh2 in CD8 T cells underscore the importance to uncover how distinct inflammatory environments modulate PcG protein expression and function. Another unanswered question relates to the role of PRC1 complexes in the context of CD8 T cell differentiation, despite their reported function in cell proliferation and survival. Finally, while Ezh2 has been recently implied in the regulation of T cell exhaustion in antitumor immunity[136] (see below), if and how other PcG proteins regulate CD8 T cell exhaustion in other context such as infection remains to be elucidated.

3.3.2 | Role of PcG proteins in CD8 T cells during cancer

Recent studies provided evidence that Ezh2 activity correlated with a better antitumor response.[136–138] In vitro activated CD8 T cells treated with Ezh2 inhibitor expressed more inhibitory receptors (PD-1, LAG-3, CTLA4, TIGIT) and exhaustion-related transcription factors Nr4a (Nr4a1-3) and Tox (Tox1, Tox2), whereas had decreased expression of memory-related proteins IL-7rα, CD62L, and CXCR3.[137] Metabolic exhaustion was also observed in Ezh2-inhibited cells, characterized by intensified shift toward glycolytic metabolism, rendering an increased sensitivity to glucose withdrawal, with concomitant decrease of mitochondrial metabolism and mass. This metabolic exhaustion was found to be partially dependent of the

activity of $p19^{Arf}$, which H3K27me3-mediated epigenetic repression was lost by Ezh2 inhibition. Moreover, Ezh2 pharmacologic inhibition also provoked inferior CD8 T cell antitumor responses in mice, although rendering increased TNF, Granzyme A, and Granzyme B production.[137] In line with these findings, exogenous expression of Ezh2 mutant ($Ezh2^{Y641F}$) with enhanced histone methyltransferase (HMT) activity increased antitumor response, suggesting altogether that Ezh2 is essential to avoid an exhaustion cell fate.[137] Consistently, recent reports using pharmacologic inhibition of Ezh2 in human CAR-T cells suggested that Ezh2 activity is required for the epigenetic modifications that leads to the restoration of CAR-T cell functionality upon transient rest.[136]

Ezh2 deficiency was shown to reduce CD8 T cell antitumor activity, decreasing functionality (IFN-γ production), cell persistence (associated with increased apoptosis-related genes *Bim* and *Cdkn2a*), and MP formation.[138] In addition, tumor-specific Ezh2-deficient CD8 T cells (Pmel-1) up-regulated the expression of effector-related transcription factor genes *Prdm1* (Blimp-1) and *Id2*, as well as Eomes, whereas memory-related transcription factor *Id3* was decreased. In fact, direct binding of Ezh2, and H3K27me3 deposition to the regulatory *loci* of *Prdm1*, *Id2*, and *Eomes* was detected in naïve Pmel-1, but this repressive mechanism is diminished after T cell activation through Akt-mediated Ezh2 phosphorylation. Disruption of this Ezh2 phosphorylation augmented memory formation and antitumor capacity. Interestingly, Ezh2 also occupied *Id3* regulatory *loci*; however, Akt-unphosphorylated Ezh2 activity increased Id3 expression, whereas TCR activation (with subsequent Ezh2 phosphorylation) decreased H3K4me3 deposition on *Id3* regulatory *loci*, which implies that Ezh2 could participate in Id3 activation through the regulation of other HMT involved with H3K4me3 mark.

PRC2 activity can be positively or negatively regulated by microRNAs in tumor microenvironment. miR-101 and miR-26a were shown to restrain expression of Ezh2 in T cells during ovarian cancer, resulting in impaired effector function including defective cytokine production and reduced expression of the antiapoptotic protein Bcl-2.[139] Ezh2, through H3K27me3 deposition, repressed the Notch repressors *Numb* and *Fbxw7* and disinhibition of these proteins could be accounted for the loss of polyfunctionality and apoptosis resistance in Ezh2-deficient CD8 T cells.[139,140] Considering that glucose restriction in the tumor environment induces up-regulation of miR-101 and miR-26a and that Akt, a key regulator of the CD8 T cell metabolism, phosphorylates Ezh2 leading to its repression, it becomes apparent that the energetic metabolism of CD8 T cells and the associated signaling are important factors in the molecular mechanism behind PRC2 regulation in CD8 T cells.[138,139] On the other hand, overexpression of miR-155 in CD8 T cells led to increased expression of Ezh2, Suz12, and Pcl3, a protein involved in the recruitment of PRC2 to genomic targets. This was associated with increased deposition of H3K27me3 on *Id2*, *Prmd1*, and *Zeb2* gene *loci* in a Pcl3-dependent manner. Deficiency in Pcl3 resulted in increased commitment of CD8 T cells into $KLRG1^{hi}$ terminal effector cells, whereas overexpression of Pcl3 conferred better cytokine production capacity and higher antitumor function of CD8 T lymphocytes.[141]

Although the studies described above have shown a prominent role of Ezh2 in enhancing CD8 T cell effector function in tumor settings through several mechanisms, a recent study suggested that enzymatic inhibition of Ezh2 can restore the impaired effector function of $CD38^{hi}$ CD8 T cell population that is expanded in patients with SLE.[142]

Understanding the molecular mechanisms behind CD8 T cell dysfunctionality in exhaustion phenotype is crucial for the design of novel strategies to overcome this challenge. The role of PcG proteins, specially Ezh2, has been appreciated in several recent studies focusing on antitumor responses mediated by CD8 T cells; however, the multiple roles that those proteins can perform are far from been completely understood. Ezh2 PTMs or different partnership with other proteins were described to be fundamental for the regulation of its function. It is still yet to be understood which other players or interactions would be involved in the regulation of Ezh2 (and other PcG proteins) in the context of CD8 T cell activation and differentiation, as well as the time-course of which those regulatory events occur. Finally, as in the context of CD8 T cells response against infections, the role of PRC1 proteins in CD8 T cell antitumor response remains poorly understood.

4 | CONCLUDING REMARKS

Over the past decade, several major advances in our understanding of the epigenetic regulation of T cell biology has been made possible thanks to the generation of novel next-generation sequencing approaches to assess chromatin accessibility, combined with novel mice strains lacking distinct epigenetic regulators. It has become evident that regulation of activation and differentiation of CD4 and CD8 T cells widely relies on the proper epigenetic regulation of gene *loci* that results in repression or activation of gene expression. In particular, deficiency of PRC1 or PRC2 members results in dysregulated gene expression, as described throughout this article. Further studies should focus on comprehending how formation of distinct complexes regulate specific gene *loci*. Moreover, with novel single cell sequencing approaches becoming more widely available, upcoming studies can benefit from cell-specific contributions of these complexes to the overall epigenetic landscape. Exciting times are ahead of us.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by American Cancer Society Research Scholar Grant 131049-RSG-17-185-01-LIB, and the Rosalind Franklin University of Medicine and Science start-up fund (to G. J. M.), and International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology Research Grant CRP/BRA16-05_EC, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientıfico e Tecnologico (CNPq) (to R. M. P.).

AUTHORSHIP

G. A. M., R. M. P., and G. J. M. conceptualized the work. G. A. M., G. B., T. O. P., C. C., R. M. P., and G. J. M. wrote the manuscript. G. A. M. made the figures.

DISCLOSURE

The authors have no financial conflicts of interest.

REFERENCES

1. Diao H, Pipkin M. Stability and flexibility in chromatin structure and transcription underlies memory CD8 T-cell differentiation. *F1000 Research*;8. 10.12688/f1000research.18211.1. Epub ahead of print 2019.
2. Pereira RM, Hogan PG, Rao A, et al. Transcriptional and epigenetic regulation of T cell hyporesponsiveness. *J Leukoc Biol*. 2017;102:601-615.
3. Wilson CB, Rowell E, Sekimata M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:91-105.
4. Helper ZhuJT. Cell differentiation, heterogeneity, and plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*;10. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030338. Epub ahead of print October 1, 2018.
5. Hosokawa H, Rothenberg EV. How transcription factors drive choice of the T cell fate. *Nat Rev Immunol*. 2021;21:162-176.
6. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128:693-705.
7. Bell O, Tiwari VK, Thomä NH, et al. Determinants and dynamics of genome accessibility. *Nat Rev Genet*. 2011;12:554-564.
8. Busturia A, Wightman CD, Sakonju S. A silencer is required for maintenance of transcriptional repression throughout Drosophila development. *Dev Camb Engl*. 1997;124:4343-4350.
9. Müller J. Transcriptional silencing by the Polycomb protein in Drosophila embryos. *EMBO J*. 1995;14:1209-1220.
10. Lewis EB. A gene complex controlling segmentation in Drosophila. *Nature*. 1978;276:565-570.
11. Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*. 2011;469:343-349.
12. Piunti A, Shilatifard A. The roles of Polycomb repressive complexes in mammalian development and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22:326-345.
13. Whitcomb SJ, Basu A, Allis CD, et al. Polycomb Group proteins: an evolutionary perspective. *Trends Genet TIG*. 2007;23:494-502.
14. Aranda S, Mas G, Di Croce L. Regulation of gene transcription by Polycomb proteins. *Sci Adv*. 2015;1:e1500737.
15. Schuettengruber B, Bourbon H-M, Di Croce L, et al. Genome regulation by Polycomb and Trithorax: 70 years and counting. *Cell*. 2017;171:34-57.
16. Scheuermann JC, deAyala Alonso AG, Oktaba K, et al. Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature*. 2010;465:243-247.
17. Schuettengruber B, Cavalli G. The DUBle life of polycomb complexes. *Dev Cell*. 2010;18:878-880.
18. Chittock EC, Latwiel S, Miller TCR, et al. Molecular architecture of polycomb repressive complexes. *Biochem Soc Trans*. 2017;45:193-205.
19. Gil J, O'Loghlen A. PRC1 complex diversity: where is it taking us?. *Trends Cell Biol*. 2014;24:632-641.
20. Schwartz YB, Pirrotta V. A new world of Polycombs: unexpected partnerships and emerging functions. *Nat Rev Genet*. 2013;14:853-864.
21. Gao Z, Zhang J, Bonasio R, et al. PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes. *Mol Cell*. 2012;45:344-356.
22. Blackledge NP, Klose RJ. The molecular principles of gene regulation by Polycomb repressive complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22:815-833.
23. Kuzmichev A, Nishioka K, Erdjument-Bromage H, et al. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the enhancer of Zeste protein. *Genes Dev*. 2002;16:2893-2905.
24. Laugesen A, Højfeldt JW, Helin K. Molecular mechanisms directing PRC2 recruitment and H3K27 methylation. *Mol Cell*. 2019;74:8-18.
25. vanMierlo G, Veenstra GJC, Vermeulen M, et al. The complexity of PRC2 subcomplexes. *Trends Cell Biol*. 2019;29:660-671.
26. Zee BM, Levin RS, Xu B, et al. In vivo residue-specific histone methylation dynamics. *J Biol Chem*. 2010;285:3341-3350.
27. Ferrari KJ, Scelfo A, Jammula S, et al. Polycomb-dependent H3K27me1 and H3K27me2 regulate active transcription and enhancer fidelity. *Mol Cell*. 2014;53:49-62.
28. Lavarone E, Barbieri CM, Pasini D. Dissecting the role of H3K27 acetylation and methylation in PRC2 mediated control of cellular identity. *Nat Commun*. 2019;10:1679.
29. Lee H-G, Kahn TG, Simcox A, et al. Genome-wide activities of Polycomb complexes control pervasive transcription. *Genome Res*. 2015;25:1170-1181.
30. Pasini D, Malatesta M, Jung HR, et al. Characterization of an antagonistic switch between histone H3 lysine 27 methylation and acetylation in the transcriptional regulation of Polycomb group target genes. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:4958-4969.
31. Nakagawa T, Kajitani T, Togo S, et al. Deubiquitylation of histone H2A activates transcriptional initiation via trans-histone cross-talk with H3K4 di- and trimethylation. *Genes Dev*. 2008;22:37-49.
32. Eskeland R, Leeb M, Grimes GR, et al. Ring1B compacts chromatin structure and represses gene expression independent of histone ubiquitination. *Mol Cell*. 2010;38:452-464.
33. Illingworth RS, Moffat M, Mann AR, et al. The E3 ubiquitin ligase activity of RING1B is not essential for early mouse development. *Genes Dev*. 2015;29:1897-1902.
34. Pengelly AR, Kalb R, Finkl K, et al. Transcriptional repression by PRC1 in the absence of H2A monoubiquitylation. *Genes Dev*. 2015;29:1487-1492.
35. Cohen I, Zhao D, Bar C, et al. PRC1 fine-tunes gene repression and activation to safeguard skin development and stem cell specification. *Cell Stem Cell*. 2018;22:726-739.
36. Endoh M, Endo TA, Endoh T, et al. Histone H2A mono-ubiquitination is a crucial step to mediate PRC1-dependent repression of developmental genes to maintain ES cell identity. *PLoS Genet*. 2012;8:e1002774.
37. Tsuboi M, Kishi Y, Yokozeki W, et al. Ubiquitination-independent repression of PRC1 targets during neuronal fate restriction in the developing mouse neocortex. *Dev Cell*. 2018;47:758-772.e5.
38. Simon J, Chiang A, Bender W, et al. Elements of the Drosophila bithorax complex that mediate repression by Polycomb group products. *Dev Biol*. 1993;158:131-144.
39. Chan CS, Rastelli L, Pirrotta V. A Polycomb response element in the Ubx gene that determines an epigenetically inherited state of repression. *EMBO J*. 1994;13:2553-2564.
40. Wang L, Brown JL, Cao R, et al. Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Mol Cell*. 2004;14:637-646.
41. Fischle W, Wang Y, Jacobs SA, et al. Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev*. 2003;17:1870-1881.
42. Bernstein E, Duncan EM, Masui O, et al. Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. *Mol Cell Biol*. 2006;26:2560-2569.
43. Kaustov L, Ouyang H, Amaya M, et al. Recognition and specificity determinants of the human cbx chromodomains. *J Biol Chem*. 2011;286:521-529.
44. Vella P, Barozzi I, Cuomo A, et al. Yin Yang 1 extends the Myc-related transcription factors network in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:3403-3418.
45. Almeida M, Pintacuda G, Masui O, et al. PCGF3/5–PRC1 initiates Polycomb recruitment in X chromosome inactivation. *Science*. 2017;356:1081-1084.

46. Pintacuda G, Wei G, Roustan C, et al. hnRNPK recruits PCGF3/5-PRC1 to the Xist RNA B-repeat to establish polycomb-mediated chromosomal silencing. *Mol Cell*. 2017;68:955-969.e10.
47. Bonasio R, Lecona E, Narendra V, et al. Interactions with RNA direct the Polycomb group protein SCML2 to chromatin where it represses target genes. *eLife*. 2014;3:e02637.
48. Ku M, Koche RP, Rheinbay E, et al. Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet*. 2008;4:e1000242.
49. Farcas AM, Blackledge NP, Sudbery I, et al. KDM2B links the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) to recognition of CpG islands. *eLife*. 2012;1:e00205.
50. He J, Shen L, Wan M, et al. Kdm2b maintains murine embryonic stem cell status by recruiting PRC1 complex to CpG islands of developmental genes. *Nat Cell Biol*. 2013;15:373-384.
51. Blackledge NP, Farcas AM, Kondo T, et al. Variant PRC1 complex-dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and polycomb domain formation. *Cell*. 2014;157:1445-1459.
52. Cooper S, Dienstbier M, Hassan R, et al. Targeting polycomb to pericentric heterochromatin in embryonic stem cells reveals a role for H2AK119u1 in PRC2 recruitment. *Cell Rep*. 2014;7:1456-1470.
53. Schoeftner S, Sengupta AK, Kubicek S, et al. Recruitment of PRC1 function at the initiation of X inactivation independent of PRC2 and silencing. *EMBO J*. 2006;25:3110-3122.
54. Tavares L, Dimitrova E, Oxley D, et al. RYBP-PRC1 complexes mediate H2A ubiquitylation at polycomb target sites independently of PRC2 and H3K27me3. *Cell*. 2012;148:664-678.
55. Blackledge NP, Fursova NA, Kelley JR, et al. PRC1 Catalytic Activity Is Central to Polycomb System Function. *Mol Cell*. 2020;77:857-874.e9.
56. Healy E, Bracken AP. If You Like It Then You Shoulda Put Two "RINGs" on It: delineating the Roles of vPRC1 and cPRC1. *Mol Cell*. 2020;77:685-687.
57. Tamburri S, Lavarone E, Fernández-Pérez D, et al. Histone H2AK119 mono-ubiquitination is essential for polycomb-mediated transcriptional repression. *Mol Cell*. 2020;77:840-856.e5.
58. Schoenfelder S, Sugar R, Dimond A, et al. Polycomb repressive complex PRC1 spatially constrains the mouse embryonic stem cell genome. *Nat Genet*. 2015;47:1179-1186.
59. Bonev B, Mendelson Cohen N, Szabo Q, et al. Multiscale 3D genome rewiring during mouse neural development. *Cell*. 2017;171:557-572.e24.
60. Du Z, Zheng H, Kawamura YK, et al. Polycomb group proteins regulate chromatin architecture in mouse oocytes and early embryos. *Mol Cell*. 2020;77:825-839.e7.
61. Saurin AJ, Shiels C, Williamson J, et al. The human polycomb group complex associates with pericentromeric heterochromatin to form a novel nuclear domain. *J Cell Biol*. 1998;142:887-898.
62. Ren X, Vincenz C, Kerppola TK. Changes in the distributions and dynamics of polycomb repressive complexes during embryonic stem cell differentiation. *Mol Cell Biol*. 2008;28:2884-2895.
63. Plys AJ, Davis CP, Kim J, et al. Phase separation of Polycomb-repressive complex 1 is governed by a charged disordered region of CBX2. *Genes Dev*. 2019;33:799-813.
64. Tatavosian R, Kent S, Brown K, et al. Nuclear condensates of the Polycomb protein chromobox 2 (CBX2) assemble through phase separation. *J Biol Chem*. 2019;294:1451-1463.
65. Jacobsen JA, Woodard J, Mandal M, et al. EZH2 regulates the developmental timing of effectors of the pre-antigen receptor checkpoints. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2017;198:4682-4691.
66. Lee SCW, Miller S, Hyland C, et al. Polycomb repressive complex 2 component Suz12 is required for hematopoietic stem cell function and lymphopoiesis. *Blood*. 2015;126:167-175.
67. Oravecz A, Apostolov A, Polak K, et al. Ikaros mediates gene silencing in T cells through Polycomb repressive complex 2. *Nat Commun*. 2015;6:8823.
68. -hsin SuI, M-W Dobenecker, Dickinson E, et al. Polycomb group protein ezh2 controls actin polymerization and cell signaling. *Cell*. 2005;121:425-436.
69. Vasanthakumar A, Xu D, Lun AT, et al. A non-canonical function of Ezh2 preserves immune homeostasis. *EMBO Rep*. 2017;18:619-631.
70. Ikawa T, Masuda K, Endo TA, et al. Conversion of T cells to B cells by inactivation of polycomb-mediated epigenetic suppression of the B-lineage program. *Genes Dev*. 2016;30:2475-2485.
71. Oguro H, Yuan J, Ichikawa H, et al. Poised lineage specification in multipotential hematopoietic stem and progenitor cells by the polycomb protein Bmi1. *Cell Stem Cell*. 2010;6:279-286.
72. Onodera A, Nakayama T. Epigenetics of T cells regulated by Polycomb/Trithorax molecules. *Trends Mol Med*. 2015;21:330-340.
73. Raaphorst FM, Otte AP, Meijer CJ. Polycomb-group genes as regulators of mammalian lymphopoiesis. *Trends Immunol*. 2001;22:682-690.
74. van derLugt NM, Domen J, Linders K, et al. Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene. *Genes Dev*. 1994;8:757-769.
75. Coré N, Bel S, Gaunt SJ, et al. Altered cellular proliferation and mesoderm patterning in Polycomb-M33-deficient mice. *Dev Camb Engl*. 1997;124:721-729.
76. Akasaka T, Tsuji K, Kawahira H, et al. The role of mel-18, a mammalian Polycomb group gene, during IL-7-dependent proliferation of lymphocyte precursors. *Immunity*. 1997;7:135-146.
77. Miyazaki M, Miyazaki K, Itoi M, et al. Thymocyte proliferation induced by pre-T cell receptor signaling is maintained through polycomb gene product Bmi-1-mediated Cdkn2a repression. *Immunity*. 2008;28:231-245.
78. Liu J, Cao L, Chen J, et al. Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. *Nature*. 2009;459:387-392.
79. Assumpção ALFV, Fu G, Singh DK, et al. A lineage-specific requirement for YY1 Polycomb Group protein function in early T cell development. *Development*. 2021;148:dev197319.
80. Raaphorst FM, Otte AP, vanKemenade FJ, et al. Distinct BMI-1 and EZH2 expression patterns in thymocytes and mature T cells suggest a role for Polycomb genes in human T cell differentiation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2001;166:5925-5934.
81. Saravia J, Chapman NM, Chi H. Helper T cell differentiation. *Cell Mol Immunol*. 2019;16:634-643.
82. Dong C. Cytokine regulation and function in T cells. *Annu Rev Immunol*. 2021;39:51-76.
83. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science*. 2010;327:1098-1102.
84. Wei G, Wei L, Zhu J, et al. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity*. 2009;30:155-167.
85. Tumes DJ, Onodera A, Suzuki A, et al. The polycomb protein Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4(+) T helper type 1 and type 2 cells. *Immunity*. 2013;39:819-832.
86. Zhang Y, Kinkel S, Maksimovic J, et al. The polycomb repressive complex 2 governs life and death of peripheral T cells. *Blood*. 2014;124:737-749.
87. Nagarsheth N, Peng D, Kryczek I, et al. PRC2 epigenetically silences Th1-type chemokines to suppress effector T-cell trafficking in colon cancer. *Cancer Res*. 2016;76:275-282.
88. Onodera A, Yamashita M, Endo Y, et al. STAT6-mediated displacement of polycomb by trithorax complex establishes long-term maintenance of GATA3 expression in T helper type 2 cells. *J Exp Med*. 2010;207:2493-2506.
89. Tong Q, He S, Xie F, et al. Ezh2 regulates transcriptional and post-translational expression of T-bet and promotes Th1 cell responses mediating aplastic anemia in mice. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2014;192:5012-5022.

90. Chang S, Aune TM. Dynamic changes in histone-methylation "marks" across the locus encoding interferon-gamma during the differentiation of T helper type 2 cells. *Nat Immunol*. 2007;8:723-731.
91. Jacob E, Hod-Dvorai R, Schif-Zuck S, et al. Unconventional association of the polycomb group proteins with cytokine genes in differentiated T helper cells. *J Biol Chem*. 2008;283:13471-13481.
92. Jacob E, Hod-Dvorai R, Ben-Mordechai OL, et al. Dual function of polycomb group proteins in differentiated murine T helper (CD4+) cells. *J Mol Signal*. 2011;6:5.
93. Hosokawa H, Kimura MY, Shinnakasu R, et al. Regulation of Th2 cell development by Polycomb group gene bmi-1 through the stabilization of GATA3. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006;177:7656-7664.
94. Kimura M, Koseki Y, Yamashita M, et al. Regulation of Th2 cell differentiation by mel-18, a mammalian polycomb group gene. *Immunity*. 2001;15:275-287.
95. Suzuki A, Iwamura C, Shinoda K, et al. Polycomb group gene product Ring1B regulates Th2-driven airway inflammation through the inhibition of Bim-mediated apoptosis of effector Th2 cells in the lung. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010;184:4510-4520.
96. Frangini A, Sjöberg M, Roman-Trufero M, et al. The aurora B kinase and the polycomb protein ring1B combine to regulate active promoters in quiescent lymphocytes. *Mol Cell*. 2013;51:647-661.
97. Yamashita M, Kuwahara M, Suzuki A, et al. Bmi1 regulates memory CD4 T cell survival via repression of the Noxa gene. *J Exp Med*. 2008;205:1109-1120.
98. Li J, Li Y, Cao Y, et al. Polycomb chromobox (Cbx) 7 modulates activation-induced CD4+ T cell apoptosis. *Arch Biochem Biophys*. 2014;564:184-188.
99. Schaller MA, Logue H, Mukherjee S, et al. Delta-like 4 differentially regulates murine CD4 T cell expansion via BMI1. *PLoS One*. 2010;5:e12172.
100. Chen X, Cao G, Wu J, et al. The histone methyltransferase EZH2 primes the early differentiation of follicular helper T cells during acute viral infection. *Cell Mol Immunol*. 2020;17:247-260.
101. Li F, Zeng Z, Xing S, et al. Ezh2 programs TFH differentiation by integrating phosphorylation-dependent activation of Bcl6 and polycomb-dependent repression of p19Arf. *Nat Commun*. 2018;9:5452.
102. Wang Z, Zhao M, Yin J, et al. E4BP4-mediated inhibition of T follicular helper cell differentiation is compromised in autoimmune diseases. *J Clin Invest*. 2020;130:3717-3733.
103. Yang JA, Tubo NJ, Gearhart MD, et al. Cutting edge: bcl6-interacting corepressor contributes to germinal center T follicular helper cell formation and B cell helper function. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2015;194:5604-5608.
104. Escobar TM, Kanellopoulou C, Kugler DG, et al. miR-155 activates cytokine gene expression in Th17 cells by regulating the DNA-binding protein Jarid2 to relieve polycomb-mediated repression. *Immunity*. 2014;40:865-879.
105. Kotov JA, Kotov DI, Linehan JL, et al. BCL6 corepressor contributes to Th17 cell formation by inhibiting Th17 fate suppressors. *J Exp Med*. 2019;216:1450-1464.
106. Arvey A, van derVeeken J, Samstein RM, et al. Inflammation-induced repression of chromatin bound by the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2014;15:580-587.
107. Yang X-P, Jiang K, Hirahara K, et al. EZH2 is crucial for both differentiation of regulatory T cells and T effector cell expansion. *Sci Rep*. 2015;5:10643.
108. DuPage M, Chopra G, Quiros J, et al. The chromatin-modifying enzyme Ezh2 is critical for the maintenance of regulatory T cell identity after activation. *Immunity*. 2015;42:227-238.
109. Xiao X-Y, Li Y-T, Jiang X, et al. EZH2 deficiency attenuates Treg differentiation in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*. 2020;108:102404.
110. Sarmento OF, Svingen PA, Xiong Y, et al. The role of the histone methyltransferase enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) in the pathobiological mechanisms underlying inflammatory bowel disease (IBD). *J Biol Chem*. 2017;292:706-722.
111. Bamidele AO, Svingen PA, Sagstetter MR, et al. Disruption of FOXP3-EZH2 interaction represents a pathobiological mechanism in intestinal inflammation. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2019;7:55-71.
112. Wang D, Quiros J, Mahuron K, et al. Targeting EZH2 reprograms intratumoral regulatory T cells to enhance cancer immunity. *Cell Rep*. 2018;23:3262-3274.
113. Xiong Y, Khanna S, Grzenda AL, et al. Polycomb antagonizes p300/CREB-binding protein-associated factor to silence FOXP3 in a Kruppel-like factor-dependent manner. *J Biol Chem*. 2012;287:34372-34385.
114. Sage PT, Sharpe AH. T follicular regulatory cells in the regulation of B cell responses. *Trends Immunol*. 2015;36:410-418.
115. Sage PT, Sharpe AH. T follicular regulatory cells. *Immunol Rev*. 2016;271:246-259.
116. Hou S, Clement RL, Diallo A, et al. FoxP3 and Ezh2 regulate Tfr cell suppressive function and transcriptional program. *J Exp Med*. 2019;216:605-620.
117. Naito T, Muroi S, Taniuchi I, et al. Loss of Eed leads to lineage instability and increased CD8 expression of mouse CD4+ T cells upon TGFβ signaling. *Mol Immunol*. 2018;94:140-152.
118. He S, Xie F, Liu Y, et al. The histone methyltransferase Ezh2 is a crucial epigenetic regulator of allogeneic T-cell responses mediating graft-versus-host disease. *Blood*. 2013;122:4119-4128.
119. Zhen Y, Smith RD, Finkelman FD, et al. Ezh2-mediated epigenetic modification is required for allogeneic T cell-induced lupus disease. *Arthritis Res Ther*. 2020;22:133.
120. Maqbool MA, Pioger L, El Aabidine AZ, et al. Alternative enhancer usage and targeted polycomb marking hallmark promoter choice during T cell differentiation. *Cell Rep*. 2020;32:108048.
121. Dobenecker M-W, Park JS, Marcello J, et al. Signaling function of PRC2 is essential for TCR-driven T cell responses. *J Exp Med*. 2018;215:1101-1113.
122. Li R, Pan Z, Wu J, et al. The epigenetic regulator EZH2 Instructs CD4 T cell response to acute viral infection via coupling of cell expansion and metabolic fitness. *J Virol*;94. https://doi.org/10.1128/JVI.01627-20. Epub ahead of print November 23, 2020.
123. Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:749-761.
124. Muroyama Y, Wherry EJ. Memory T-cell heterogeneity and terminology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2021:a037929.
125. Xu T, Pereira RM, Martinez GJ. An updated model for the epigenetic regulation of effector and memory CD8 $^{+}$ T cell differentiation. *J Immunol*. 2021;207:1497-1505.
126. Araki Y, Wang Z, Zang C, et al. Genome-wide analysis of histone methylation reveals chromatin state-based regulation of gene transcription and function of memory CD8+ T cells. *Immunity*. 2009;30:912-925.
127. Russ BE, Olshanksy M, Smallwood HS, et al. Distinct epigenetic signatures delineate transcriptional programs during virus-specific CD8(+) T cell differentiation. *Immunity*. 2014;41:853-865.
128. Willcockson MA, Healton SE, Weiss CN, et al. H1 histones control the epigenetic landscape by local chromatin compaction. *Nature*. 2021;589:293-298.
129. Gray SM, Amezquita RA, Guan T, et al. Polycomb repressive complex 2-mediated chromatin repression guides effector CD8+ T cell terminal differentiation and loss of multipotency. *Immunity*. 2017;46:596-608.
130. Kakaradov B, Arsenio J, Widjaja CE, et al. Early transcriptional and epigenetic regulation of CD8+ T cell differentiation revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat Immunol*. 2017;18:422-432.
131. Chen G, Subedi K, Chakraborty S, et al. Ezh2 regulates activation-induced CD8+ T cell cycle progression via repressing Cdkn2a and Cdkn1c expression. *Front Immunol*. 2018;9:549.

132. Wang Y, Sun H, Wang J, et al. DNA-PK-mediated phosphorylation of EZH2 regulates the DNA damage-induced apoptosis to maintain T-cell genomic integrity. *Cell Death Dis*. 2016;7:e2316-e2316.
133. Yu B, Zhang K, Milner JJ, et al. Epigenetic landscapes reveal transcription factors that regulate CD8+ T cell differentiation. *Nat Immunol*. 2017;18:573-582.
134. Balkhi MY, Wittmann G, Xiong F, et al. YY1 upregulates checkpoint receptors and downregulates type I cytokines in exhausted, chronically stimulated human T cells. *iScience*. 2018;2:105-122.
135. Heffner M, Fearon DT. Loss of T cell receptor-induced Bmi-1 in the KLRG1(+) senescent CD8(+) T lymphocyte. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:13414-13419.
136. Weber EW, Parker KR, Sotillo E, et al. Transient rest restores functionality in exhausted CAR-T cells through epigenetic remodeling. *Science*. 2021;372:eaba1786.
137. Koss B, Shields BD, Taylor EM, et al. Epigenetic control of *Cdkn2a.Arf* protects tumor-infiltrating lymphocytes from metabolic exhaustion. *Cancer Res*. 2020;80:4707-4719.
138. He S, Liu Y, Meng L, et al. Ezh2 phosphorylation state determines its capacity to maintain CD8+ T memory precursors for antitumor immunity. *Nat Commun*. 2017;8:2125.
139. Zhao E, Maj T, Kryczek I, et al. Cancer mediates effector T cell dysfunction by targeting microRNAs and EZH2 via glycolysis restriction. *Nat Immunol*. 2016;17:95-103.
140. Backer RA, Helbig C, Gentek R, et al. A central role for Notch in effector CD8+ T cell differentiation. *Nat Immunol*. 2014;15:1143-1151.
141. Ji Y, Fioravanti J, Zhu W, et al. miR-155 harnesses Phf19 to potentiate cancer immunotherapy through epigenetic reprogramming of CD8+ T cell fate. *Nat Commun*. 2019;10:2157.
142. Katsuyama E, Suarez-Fueyo A, Bradley SJ, et al. The CD38/NAD/SIRTUIN1/EZH2 axis mitigates cytotoxic CD8 T cell function and identifies patients with SLE prone to infections. *Cell Rep*. 2020;30:112-123.e4.

How to cite this article: Melo GA, Calôba C, Brum G, Passos TO, Martinez GJ, Pereira RM. Epigenetic regulation of T cells by Polycomb group proteins. *J Leukoc Biol*. 2022;1–15.
https://doi.org/10.1002/JLB.2RI0122-039R

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Polycomb Repressive Complex 1 subunit Cbx4 positively regulates effector responses in CD8 T cells

Melo G.A.[1], Xu, T.[2], Calôba C.[1,5], Schutte, A.[2], Brum G.[1], Passos T.O.[1], Higa L.[7], Gonçalves A.[8], Tanuri A.[7], Viola J.P.B.[6], Werneck M.B.F.[5], Nakaya H.I.[4], Pipkin M.E.[3], Martinez G.J.[2,*], Pereira R.M[1,*]

Affiliations

[1] Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

[2] Center for Cancer Cell Biology, Immunology, and Infection; Discipline of Microbiology and Immunology. Rosalind Franklin University of Medicine and Science, 3333 Green Bay Road, North Chicago, IL 60064, USA.

[3] Department of Immunology and Microbiology, UF Scripps Biomedical Research, University of Florida, Jupiter, FL 33458, USA.

[4] Hospital Israelita Albert Einstein, 05652-900, São Paulo, SP, Brazil.

[5] Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

[6] Programa de Imunologia e Biologia Tumoral, Instituto Nacional do Câncer, 20231-050, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

[7] Departamento de Genética. Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

[8] Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 05508-000, São Paulo, SP, Brazil.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

*Correspondence:

Renata M. Pereira, Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes – IMPG, Centro de Ciências da Saúde – CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Avenida Carlos Chagas Filho, 373, sala D1-035 CEP: 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. renata.pereira@micro.ufrj.br

ORCID# 0000-0002-7719-8356

Gustavo J. Martinez, Center for Cancer Cell Biology, Immunology and Infection, Discipline of Microbiology and Immunology, Rosalind Franklin University of Medicine and Science, Chicago Medical School, 3333 Green Bay Road, North Chicago, IL 60064, USA. gjmartinez@gmail.com.

ORCID# 0000-0003-0178-3329

Key words: Epigenetics, Polycomb, Cbx4, PRC1, T cell differentiation, CD8 T cell

Summary: Understanding the epigenetic control of CTL differentiation is critical for the manipulation of these cells in immunotherapy protocols. This article demonstrates a novel role for Cbx4, a Polycomb-group protein, in supporting CD8 T cell commitment to an effector cell phenotype.

Abstract: CD8 T cell differentiation is controlled by the crosstalk of various transcription factors and epigenetic modulators. Uncovering the different players in regulating this process is fundamental to improving immunotherapy and designing novel therapeutic approaches. Here, we

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

show that Polycomb Repressive Complex (PRC)1 subunit Chromobox (Cbx)4 favors differentiation to effector CD8 T cells. Cbx4 deficiency in CD8 T cells induced transcriptional signature and phenotype of memory cells, increasing the formation of memory population during acute viral infection. It has been previously shown that besides chromodomain-mediated binding to H3K27me3, Cbx4 function as a SUMO E3 ligase in a SUMO interacting motifs (SIM)-dependent way. The overexpression of Cbx4 mutants in distinct domains showed that this protein regulates CTL differentiation primarily in a SIM-dependent way and partially through its chromodomain. Our data revealed a novel role of a Polycomb group protein Cbx4 controlling CD8 T lymphocyte differentiation and indicates the SUMOylation process as a key molecular mechanism connected to chromatin modification in this process.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Introduction

CD8 T cells are an essential component of adaptive immunity, working as key players in the elimination of intracellular pathogens and tumor cells (1). Upon activation, CD8 T cells undergo intense expansion and differentiate into a heterogeneous population composed of pro-inflammatory and cytotoxic terminal effector cells (TE), characterized by expression of the killer cell lectin-like receptor G1 ($KLRG1^{+}$) and low expression of IL-7Ra ($CD127^{-}$), and memory precursor (MP) cells that are responsible for the generation of long-term immunity, that express CD127 and low levels of KLRG1 ($KLRG1^{-}CD127^{+}$). Complex transcriptional programs that are regulated dynamically control gene expression that specifies the differentiation of these distinct CD8 T cell states. The identification of the key players that participate in this process is critical for the understanding of these molecular processes and for advancing novel therapeutic strategies (1, 2). Several transcription factors have been described to drive CD8 T cell differentiation, including T-bet (3, 4), Blimp1 (5, 6), Zeb-2 (7, 8), Id2 (9–11), and NFAT1 (12) which promote generation of TE cells, and Tcf-1 (13, 14), Eomes (3, 15), Bcl-6 (16, 17), Id3 (18, 19), Foxo1 (20–22) and Runx3 (23) for memory cell differentiation. Transcription factors cooperate with epigenetic regulators, including chromatin modifiers that add, remove or recognize post-translational modifications in histones, adding a new level of complexity to this differentiation process that remains to be completely uncovered (24–26).

The Polycomb Repressor Complex (PRC)2, responsible for tri-methylating lysine 27 of histone 3 (H3K27me3), which is considered a repressive mark, was described as having an essential role in commitment to effector cell differentiation through the deposition of this mark in memory-related genes, leading to transcriptional repression during acute viral infection (25, 27, 28). In addition, members of this complex were upregulated right after activation in cells that later

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

differentiated into terminal effector CD8 T cells (28). Furthermore, it was demonstrated that H3K27me3 removal by lysine demethylase Kdm6 promotes effector differentiation through de-repression of effector genes (29–31). These evidences underscore the importance of H3K27me3 methylation/demethylation dynamic regulation to CD8 T cell differentiation. H3K27me3 can recruit another epigenetic complex from the Polycomb group (PcG), the PRC1, that also works as a repressor through the ubiquitylation of lysine 119 of histone H2A (H2AK119ub) by its catalytic subunit Ring1, as well as through chromatin remodeling mechanisms mediated by other subunits that can integrate the complex (32). PRC1 composition is highly heterogeneous, and its distinct configurations are divided in canonical (cPRC1) or noncanonical PRC1 (ncPRC1) (33, 34). While ncPRC1 complexes can be recruited to genome sites independently of PRC2 function (35, 36), cPRC1 are known to be recruited to H3K27me3-tagged *loci*. This process is thought to be mediated by recognition and binding of Chromobox (Cbx) family proteins (Cbx2, Cbx4, Cbx6, Cbx7, and Cbx8) to this repressive epigenetic mark through its conserved chromodomain (32, 37). Cbx4 is reported to function additionally as a small ubiquitin-like modifier (SUMO) E3 ligase through its two SUMO interacting motifs (SIM) (38, 39). SUMO conjugation is a dynamic post-translational modification that can alter the molecular interactions, stability and activity of targeted proteins and mediates the regulation of several critical cellular processes, such as control of gene expression and chromatin structure (40, 41). Besides, Cbx4 E3 SUMO ligase activity has been reported to regulate essential transcriptional regulators, such as Dnmt3a and Hif-1α (42, 43).

Here we show that Cbx4 induces effector cell commitment primarily through its SIM domain-related mechanisms. Cbx4-deficient CD8 T cells showed increased expression of memory-related surface markers CD127 and CD62L for both *in vitro* differentiation and during acute viral infection. Consistent with our phenotyping results, RNA-Seq of *in vivo*-differentiated

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Cbx4-deficient cells showed skewing towards memory precursor transcriptional signature. Furthermore, Cbx4 deficiency led to increased memory generation at acute lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) viral infection memory time point. To rescue the Cbx4 deficient phenotype, we overexpressed Cbx4 or Cbx4 functional domain mutants in CD8 T cells. We found that the overexpression restored the effector population in a SIM domain-dependent manner and only partially depended on its chromodomain. Our data, suggest that Cbx4 promotes CD8 T cell effector differentiation, which is mainly driven by SUMOylation mechanisms and less so by its capacity to bind to methylated histones.

Methodology

Mice

All mice were on a C57BL/6 background. The experimental mice were 6- to 8-wk-old and sex- and age-matched. P14 (LCMV gp33-41-H2-Db–specific) Thy1.1 and CD4-Cre mice have been previously described (12). $Cbx4^{fl/fl}$ mice (obtained from Dr. Guo-Liang Xu, Institute of Biochemistry and Cell Biology, China (44)) were bred to create the following genotypes: $Cbx4^{fl/fl}Cd4^{Cre}$ and P14 $Thy1.1^{+}$ $Cbx4^{fl/fl}Cd4^{Cre}$. Mice were housed in specific pathogen-free barrier facilities and used according to protocols approved by the Rosalind Franklin University of Medicine and Science Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). Mice housed in the Mouse facility of Departamento de Imunologia (UFRJ) were used according to the rules established by CONCEA (Conselho Nacional de Experimentação Animal) and UFRJ CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) approval (Protocol 054/20).

T cell isolation and culture

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

126 Naive $CD8^+$ T cells were purified from spleen and lymph nodes using the Mouse Naive
127 $CD8^+$ T Cell Isolation Kit (StemCell Technologies) or through negative selection using Dynabeads
128 Untouched Mouse CD8 cells Kit (Thermo Fisher Scientific) followed by Fluorescence-Activated
129 Cell Sorting (FACS). Naïve CD8 T cells were cultured on Dulbecco's modified Eagle's Medium
130 (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin-
131 streptomycin, 50 ng/ml gentamicin, 1X MEM non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate,
132 1X MEM Vitamin Solution, 10 mM HEPES, and 50 μM β-Mercaptoethanol (45). Naïve CD8 T
133 cells were activated with 1 μg/ml (effector-like polarization) or 50 ng/mL (memory-like
134 polarization) of anti-CD3 (clone 2C11) and 1 μg/mL of anti-CD28 (clone 37.51) (Thermo Fisher
135 Scientific) at 1 million cells per mL on a 12- or 24-well plate that had been precoated with 300
136 μg/ml goat anti-hamster IgG (Pierce Protein Biology, Life Technologies) (45). Cells were removed
137 from the initial stimulus 48 h after activation and were cultured at 0.5 million/mL in the presence
138 of 100 U/ml of recombinant human (rh)IL-2 for effector-like or 10 U/mL of rhIL-2, 10 ng/mL of
139 rhIL-7 and 10 ng/mL of rhIL-15 for memory-like phenotype polarization. In indicated
140 experiments, 200 U/mL of recombinant murine (rm)IL-2 were used to generate effector-like cells
141 and 20 U/mL of rhIL-2, 10 ng/mL of rmIL-7 and 10 ng/mL of rmIL-15 for memory-like cells (46).
142
143 *Retroviral plasmids and transduction*
144 For Cbx4 knockdown experiments, retroviral particles were generated by transfecting
145 Phoenix-Eco cells with Ametrine-expressing murine retroviral vectors containing shRNAs
146 targeting CD4 (shCD4) or Cbx4 (shCbx4) mRNA (47). For Cbx4 over-expression, Plat-E cells
147 were transfected with GFP-expressing murine retroviral vectors containing unaltered Cbx4 coding
148 sequence (Cbx4-OE), Cbx4 mutants carrying two point mutations (F11A/W35L) at Cbx4

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

149 chromodomain (ΔChromo), deletion of the two SUMO interacting motifs (SIM) domains (ΔSIM1-
150 2) or GFP-expressing empty vector (Mock), kindly donated by Dr. Wang (48). Virus supernatant
151 was filtered through 0.45-mm filters and used fresh for transduction in Cbx4 knockdown
152 experiments or concentrated by centrifugation at 6000 x g (F14-14 x 50cy rotor) at 4ºC overnight
153 for Cbx4 over-expression experiments. *In vitro*-activated CD8 T cells (as described above) were
154 transduced with retroviral particles 18-20h after activation. T cell culture medium was carefully
155 replaced with media containing fresh or concentrated retrovirus supplied with 8 μg/ml polybrene
156 and centrifuged at 800 x g for 1 h at 37ºC and then put into a 37ºC 10% CO2 incubator for 4h. For
157 the adoptive transfer of transduced P14 cells, T cell cultures were immediately harvested after
158 incubation. For *in vitro* culture experiments, the conditioned T cell media was replaced, and cells
159 were then expanded until day 6 or day 14 for effector- or memory-like polarization, respectively.
160
161 *LCMV infection and adoptive cell transfer*
162 Mice were infected i.p. with 2 x 10^5 PFUs of LCMV Armstrong (LCMV Arm) and
163 analyzed on day 45 (d45) post-infection (p.i.). For adoptive transfer experiments with transduced
164 CD8 T cells, congenic C57BL/6 (Thy1.2) mice received intravenously 5x10^5 *in vitro*-transduced
165 P14 Thy1.1 cells (expressing shCD4 or shCbx4) and were subsequently infected i.p. with 1.5 x
166 10^5 PFUs of LCMV clone13, as previously described (47). LCMV strains were initially provided
167 by Dr. Shane Crotty, La Jolla Institute, CA and expanded with BHK cells as described before (49).
168
169 *Flow Cytometry analysis*
170 Spleens and lymph nodes were used for isolating single-cell suspension. RBCs were lysed
171 from spleens with ACK lysis buffer. For LCMV tetramer staining, H2Db-gp33-41

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

(KAVYNFATC) Alexa Fluor 647 or APC was incubated at room temperature before staining for cell surface molecules and intracellular staining. Cytokine production was measured by FACS from *ex vivo* splenic cells or *in vitro* cultured cells upon restimulation with 10 nM PMA and 1 μM Ionomycin for 4 h in the presence of brefeldin A. Samples were run on FACSAria IIu or LSRII (BD Biosciences), and data were analyzed with FlowJo (Version 9.9.4 and Version 10.7.1).

Cytotoxicity assay

For cytotoxicity assay, naïve P14 CD8 T cells were activated *in vitro*, transduced with shCD4 or shCbx4, and cultured with 10 U/ml rhIL-2 as described above. On day 6, Ametrine^{+} cells were purified by FACS and co-cultured at different ratios with GFP-expressing parental mammary carcinoma cell line EO771 (negative control to determine nonspecific target lysis) or EO771 cells expressing the cognate Ag gp33-41 (EO771-GFP-gp33-41). After overnight incubation (12 h), the remaining live GFP-expressing EO771 cells were determined by flow cytometry as a measure of the cytotoxic activity. EO771 cells cultured in the absence of CTLs were used as a baseline for cell death.

RNA sequencing

FACS-purified cells from *in vivo* experiment were washed twice with PBS and used for RNA sequencing. RNA-seq libraries were prepared using SMARTer Stranded RNA-Seq Kit (Clontech) according to the manufacturer's instructions. RNA-Seq libraries were sequenced with the rapid run protocol with a HiSeq 2500 instrument (Illumina). The paired-end reads that passed Illumina filters were filtered for reads aligning to tRNA, rRNA, adapter sequences, and spike-in controls. The reads were then aligned to the UCSC mm9 reference genome using TopHat (v1.4.1).

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

DUST scores were calculated with PRINSEQ Lite (v 0.20.3), and low complexity reads (DUST > 4) were removed from the BAM files. Read counts to each genomic feature were obtained with htseq-count (v 0.6.0) using the default "union" option. After removing absent features (zero counts in all samples), the raw counts were imported to R/Bioconductor package DESeq2 (v1.24.0) to identify differentially expressed genes among samples. We considered genes differentially expressed between two groups of samples when the DESeq2 analysis resulted in a p-value < 0.05. Gene set enrichment analysis (GSEA), that considers the gene expression ranking to calculate enrichment, was performed by comparing the differentially expressed genes between shCD4 and shCbx4-treated samples (pre-ranked gene list) to published SLEC and MPEC datasets (gene set) (23).

Quantitative real-time RT-PCR

Total RNA was isolated from FACS-purified CD8 T cells using TRIzol reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Superscript reverse transcriptase (Invitrogen) and oligonucleotide primers were used to synthesize cDNA. Gene expression was examined with 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using Power SYBR green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Gene expression was normalized to *Rpl22* (encodes L22 ribosomal protein) gene expression. The following primers were used: *Rpl22* forward, 5'-ACCCTGGACTGCACTCACCCTG-3'; *Rpl22* reverse, 5'-CCGCCGAGGTTGCCAGCTTT-3'; Sell forward, 5'-CATTCCTGTAGCCGTCATGG-3'; Sell reverse, 5'-AGGAGGAGCTGTTGGTCATG-3'; Il7r forward, 5'-GCGGACGATCACTCCTTCTG-3'; Il7r reverse, 5'-AGCCCCACATATTTGAAATTCCA-3'; *Cbx4* forward, 5'-AGTGGAGTATCTGGTGAAATGGA-3'; *Cbx4* reverse, 5'- TCCTGCCTTTCCCTGTTCTG-3'.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Statistics and analysis

Graphs were plotted using Prism 7 or 8 (GraphPad). Statistical analysis was performed using nonpaired one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons, two-tail paired or nonpaired Student t test, or two-way ANOVA followed by Tukey, Sidak or Dunnet multiple comparisons, as indicated.

Results and Discussion

Cbx4 deficiency skews CD8 T cell differentiation to a memory phenotype and impacts CD8 T cell cytotoxicity

To assess the role of Cbx4 in CD8 T cell differentiation, we employed LCMV acute infection model using adoptive transfer of CD8 T cells from P14 mice. Naïve CD8 T cells from P14 Thy1.1$^+$ mice were activated *in vitro* and transduced with retroviral vectors (RV) expressing shRNA targeting Cbx4 mRNA (shCbx4) or CD4 mRNA as a control (shCD4). Transduced cells were then adoptively transferred to WT Thy1.2$^+$ congenic mice that were infected on the same day with LCMV, as previously described (47) (Fig.1.A). The efficiency of shRNA-mediated silencing of Cbx4 was confirmed by RT-qPCR (Suppl.Fig1. A).

The differentiation of P14 cells to effector or memory phenotype was analyzed 8 days post-infection by measuring KLRG1 and CD127 expression (Fig.1.B-D). Transferred LCMV-specific Cbx4-deficient CD8 T (P14 shCbx4) cells had lower frequency and number of TEs (KLRG1$^+$CD127$^-$) and, accordingly, higher frequency and cell number of populations expressing the memory-associated marker CD127, both in MP (KLRG1$^-$CD127$^+$) and in KLRG1$^+$CD127$^+$ double positive population. The frequency of transferred Thy1.1$^+$ P14 cells and transduced

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Ametrine^{hi} Thy1.1^{+} P14 cells were lower in mice receiving P14 shCbx4 cells in comparison to mice receiving control cells; however, no significant difference was observed in the cell numbers, which is consistent with the increase in total CD8^{+} T cell population numbers in mice receiving P14 shCbx4 cells (Suppl.Fig.1. B).

To further investigate the contribution of Cbx4 to the regulation of CD8 T cell transcriptional profile, P14 CD8 T cells from the LCMV acute infection model described above were sort-purified on d8 post-infection, and total RNA was extracted for RNA-Seq. Data analysis showed 836 differentially expressed genes (DEGs) when comparing P14 shCbx4 CD8 T cells to P14 shCD4 CD8 T cells (Fig.1.E). Among those genes, several surface markers that positively correlate with the memory cells were upregulated on Cbx4 deficient cells, including *Il7r* (CD127) and *Slamf6* (2, 50). In addition, genes encoding key transcription factors *Eomes* and *Tcf7* (Tcf-1), which promote the generation and persistence of central memory CD8 T cells, were also upregulated in comparison to control cells (3, 13–15). Concordantly, genes positively correlated with the effector phenotype and function, such as *Klrg1*, *Prf1* and *Cx3cr1*, were downregulated in P14 shCbx4 compared to shCD4 CD8 T cells. These gene expression alterations, such as the upregulation of *Tcf7* and *Il7r*, were not just due to a higher frequency of memory cells in our Cbx4-deficient population, as sorted Cbx4-deficient KLRG1^{hi} CD8 T cells also showed an enrichment of memory-associated genes (Suppl.Fig.1. D). To test whether these gene expression alterations lead to a global shift towards memory transcriptional programs, we performed Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) using previously published memory precursor (KLRG1^{lo}CD127^{hi}) transcriptional signature from day 8 acute LCMV infection model (23). We found that genes upregulated in P14 shCbx4 cells showed enrichment in memory precursor transcriptional signature (Fig.1.F), indicating that Cbx4 could directly regulate memory-associated genes. It is also

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

plausible that Cbx4 could indirectly impact the expression of transcription factors related to CD8 T cell differentiation by controlling other transcriptional regulators. For example, our RNA-Seq showed that *c-Myb*, a transcriptional activator of *Tcf7* (51), is upregulated in P14 shCbx4 cells. Similarly, Cbx4 was reported to activate the Wnt/β-catenin pathway, a pathway upstream of TCF-1 activation, in human lung adenocarcinoma cells (52). Future studies will be focused on determining which transcriptional regulators involved in CD8 T cell differentiation are directly regulated by Cbx4.

As we observed the downregulation of genes related to effector function (i.e.: *Prf1*), we explored if Cbx4 deficiency could impact CD8 T cell cytotoxic function. P14 cells were analyzed in an *in vitro* cytotoxicity assay, co-culturing activated and retrovirally transduced P14 cells with GP33-expressing GFP^+ EO771 tumor cells (EO771) (Fig.1.G). We observed that P14 shCbx4 cells had diminished cytotoxicity compared to P14 shCD4, which further supports the observation of defective effector differentiation with concomitant skewing to memory phenotype in the absence of Cbx4 protein.

Collectively, our findings shows that Cbx4 deficiency upregulates memory precursor transcriptional signature and expression of memory surface markers (CD127, CD62L), and decreases effector cytotoxic function, revealing a skewing of CD8 T cells towards a memory phenotype and a role for the Polycomb protein Cbx4 in the control of CD8 T cell differentiation.

Cbx4 deficiency leads to increased memory CD8 T cell formation

To confirm if Cbx4 could control memory CD8 T cell formation, we used the acute LCMV infection in T cell-specific Cbx4 deficient mice ($Cbx4^{fl/fl}Cd4^{Cre}$, herein referred to as Cbx4 TKO mice), analyzing polyclonal Cbx4 deficient CD8 T cells 60 days post-infection (Fig.2.A). Analysis

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

of lymphocyte populations on thymus, lymph nodes and spleens of Cbx4 T KO mice at steady state showed no alteration in T cell development or abnormal phenotype of lymphocytes in secondary lymphoid organs (data not shown). On day 60 post-infection, Cbx4 TKO mice showed a slight increase in the frequency and number of CD8 T cells, as well as higher number of LCMV-specific H2Db-gp33-41^{+} (GP33^{+}) cells (Fig.2.B, C). In addition, Cbx4 TKO mice had higher frequency and cell number of KLRG1^{+}CD127^{+} population in GP33^{+} CD8 T cells (Fig.2. D-F). We also observed higher number of memory KLRG1^{-}CD127^{+} population, although this was not reflected in population frequency. Accordingly, we found decreased frequency and cell number of terminal effector (KLRG1^{+}CD127^{-}) GP33^{+} CD8 T cells (Fig.2.D-F). The expression of CXCR3, which is associated with memory population formation and rapid recall response (53), was upregulated on GP33^{+} CD8 T cells of Cbx4 TKO mice, as seen by the increased cell numbers of KLRG1^{+}CXCR3^{+} and KLRG1^{-}CXCR3^{+} populations (Suppl.Fig.2.A, B). To further validate the enrichment of memory-associated genes in Cbx4 deficient CD8 T cells, we performed intracellular staining to examine expression of transcription factor T-bet and Eomes from our *ex vivo* samples. We observed that T-bet/Eomes ratio was significantly lower in Cbx4 TKO mice, regardless of KLRG1 expression, in line with a global increased memory profile upon Cbx4 deficiency (Fig.2.G).

To recapitulate this phenotype in an *in vitro* model system, we differentiate CD8 T cells to either effector- or memory-like cells using a previously established protocol (46). Consistently, we observed increased levels of the memory markers CD127 and CD62L in Cbx4-deficient cells, regardless of the polarized phenotypes (Suppl.Fig. 3). In summary, deficiency in Cbx4 leads to increased expression of memory-associated surface markers and transcription factors in CTLs, both *in vivo* and *in vitro*.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Repression of memory phenotype by Cbx4 is primarily dependent on SIM1-2 domains

We next investigated the mechanism through which Cbx4 impacts CD8 T cell differentiation. As Cbx4 protein can mediate PcG-dependent repression and function in parallel as an E3 ligase enzyme (32, 37–39), we enforced the expression, in either wild-type or Cbx4-deficient P14 cells, of wild type or mutant Cbx4 cDNAs lacking key functional domains: (1) ΔChromo, with an amino acid substitution at chromodomain that prevents its binding to H3K27me3 residues; (2) ΔSIM1-2, that lacks both SUMO-interacting motifs (Fig. 3A).

Cbx4 KO CD8 T cells activated and differentiated *in vitro* to a memory-like phenotype displayed accentuated expression of CD62L and CD127 during cell culture, and complementation of Cbx4-deficient cells with wildtype Cbx4 counteracted this phenotype (Fig. 3B, C). Overexpression of ΔChromo mutant reproduces to a lesser degree the effect seen upon wild-type isoform overexpression, indicating that the Cbx4 H3K27me3 binding function has a partial contribution to its role in the commitment to effector cell differentiation. On the other hand, deletion of SIM sequences not only reversed wild-type isoform Cbx4 overexpression impact but induced the opposite effect, promoting memory phenotype in both P14 WT and P14 Cbx4 T KO cells. Overexpression of ΔSIM1-2 mutant in P14 WT CD8 T cells raised the frequency of $CD62L^{+}CD127^{+}$ population to levels observed in Mock-transduced P14 Cbx4 KO cells, suggesting that overexpression of SIM-deficient Cbx4 isoform might be competing with endogenous Cbx4 function, and potentially acting as a dominant negative version of the protein (Fig.3.C). The same patterns were observed for the expression of memory-related markers CD62L and CD127 at protein (Fig.3.D, E) and transcriptional (Fig.3.F, G) levels. Expression of markers related to the effector phenotype, CD25, and recall response, CXCR3, corroborated these data,

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

333 showing an increase of both proteins upon wild-type Cbx4 overexpression while ΔChromo mutant
334 overexpression partially reproduced wild type Cbx4 effect and ΔSIM1-2 mutant reversed the effect
335 (Fig.3.H, I).

336 The fact that we observed that both chromodomain and SIM domains are required for
337 effector CD8 T cell differentiation is consistent with the fact that it has been shown in mouse
338 embryonic fibroblast that conjugation of SUMO at the Cbx4 SIM domain is essential for
339 recruitment of cPRC1 to H3K27me3 in genome *loci* and control of PRC1 repressive activity (54).
340 Moreover, it was reported that Cbx4-mediated SUMOylation of Ezh2 promoted its recruitment
341 and enhanced Ezh2 methyltransferase activity, demonstrating that Cbx4 regulates PRC2 (55).
342 Therefore, our results indicate that Cbx4 SIM domains might regulate cPRC1 and PRC2-
343 dependent repressive mechanisms in CD8 T cells. Further studies investigating Cbx4
344 SUMOylation and targets for Cbx4 SUMO E3 ligase function in CD8 T cells are needed to fully
345 define its role in CD8 T cell differentiation. In addition, looking into the crosstalk between Cbx4
346 and other PcG proteins in CD8 T cells, especially Ezh2, and its potential interaction with
347 H3K27me3 residues through the chromodomain is needed to understand how this protein controls
348 Polycomb-mediated repressive mechanisms during CD8 T cell differentiation. Finally, the ability
349 of Cbx4 to also bind to H3K9me3 adds another potential layer of complexity to the epigenetic
350 regulation of T cells by this protein (37).

351 Taken together, our data demonstrates that Cbx4, a Polycomb-group protein, participates
352 in the control of CD8 T cell differentiation. We observed that both Cbx4 SIM1-2 domains and
353 chromodomain are required for the repression of memory phenotype, however SIM1-2 might play
354 a more dominant role in this process. Further studies better characterizing the role of Cbx4 to CD8
355 T cell functionality and clarifying the mechanisms by which Cbx4 perform its role as regulator,

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

identifying its targets and partners, will help clarify how the Polycomb-dependent complex molecular network regulates CD8 T cell differentiation.

References

1. Kaech, S. M., and W. Cui. 2012. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 12: 749–761.

2. Chang, J. T., E. J. Wherry, and A. W. Goldrath. 2014. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat Immunol* 15: 1104–1115.

3. Intlekofer, A. M., N. Takemoto, E. J. Wherry, S. A. Longworth, J. T. Northrup, V. R. Palanivel, A. C. Mullen, C. R. Gasink, S. M. Kaech, J. D. Miller, L. Gapin, K. Ryan, A. P. Russ, T. Lindsten, J. S. Orange, A. W. Goldrath, R. Ahmed, and S. L. Reiner. 2005. Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol* 6: 1236–1244.

4. Joshi, N. S., W. Cui, A. Chandele, H. K. Lee, D. R. Urso, J. Hagman, L. Gapin, and S. M. Kaech. 2007. Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8+ T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. *Immunity* 27: 281–295.

5. Kallies, A., A. Xin, G. T. Belz, and S. L. Nutt. 2009. Blimp-1 Transcription Factor Is Required for the Differentiation of Effector CD8+ T Cells and Memory Responses. *Immunity* 31: 283–295.

6. Rutishauser, R. L., G. A. Martins, S. Kalachikov, A. Chandele, I. A. Parish, E. Meffre, J. Jacob, K. Calame, and S. M. Kaech. 2009. Transcriptional Repressor Blimp-1 Promotes CD8+ T Cell Terminal Differentiation and Represses the Acquisition of Central Memory T Cell Properties. *Immunity* 31: 296–308.

7. Omilusik, K. D., J. A. Best, B. Yu, S. Goossens, A. Weidemann, J. V. Nguyen, E. Seuntjens, A. Stryjewska, C. Zweier, R. Roychoudhuri, L. Gattinoni, L. M. Bird, Y. Higashi, H. Kondoh, D. Huylebroeck, J. Haigh, and A. W. Goldrath. 2015. Transcriptional repressor ZEB2 promotes terminal differentiation of CD8+ effector and memory T cell populations during infection. *Journal of Experimental Medicine* 212: 2027–2039.

8. Dominguez, C. X., R. A. Amezquita, T. Guan, H. D. Marshall, N. S. Joshi, S. H. Kleinstein, and S. M. Kaech. 2015. The transcription factors ZEB2 and T-bet cooperate to program cytotoxic T cell terminal differentiation in response to LCMV viral infection. *Journal of Experimental Medicine* 212: 2041–2056.

9. Cannarile, M. A., N. A. Lind, R. Rivera, A. D. Sheridan, K. A. Camfield, B. B. Wu, K. P. Cheung, Z. Ding, and A. W. Goldrath. 2006. Transcriptional regulator Id2 mediates CD8+ T cell immunity. *Nat Immunol* 7: 1317–1325.

10. Knell, J., J. A. Best, N. A. Lind, E. Yang, L. M. D'Cruz, and A. W. Goldrath. 2013. Id2 Influences Differentiation of Killer Cell Lectin-like Receptor G1 ^{hi} Short-Lived CD8 $^{+}$ Effector T Cells. *J.I.* 190: 1501–1509.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

392 11. Masson, F., M. Minnich, M. Olshansky, I. Bilic, A. M. Mount, A. Kallies, T. P. Speed, M.
393 Busslinger, S. L. Nutt, and G. T. Belz. 2013. Id2-Mediated Inhibition of E2A Represses Memory
394 CD8 $^{+}$ T Cell Differentiation. *J.I.* 190: 4585–4594.

395 12. Xu, T., A. Keller, and G. J. Martinez. 2019. NFAT1 and NFAT2 Differentially Regulate CTL
396 Differentiation Upon Acute Viral Infection. *Front. Immunol.* 10: 184.

397 13. Zhou, X., S. Yu, D.-M. Zhao, J. T. Harty, V. P. Badovinac, and H.-H. Xue. 2010.
398 Differentiation and Persistence of Memory CD8+ T Cells Depend on T Cell Factor 1. *Immunity*
399 33: 229–240.

400 14. Jeannet, G., C. Boudousquié, N. Gardiol, J. Kang, J. Huelsken, and W. Held. 2010.
401 Essential role of the Wnt pathway effector Tcf-1 for the establishment of functional CD8 T cell
402 memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 9777–9782.

403 15. Banerjee, A., S. M. Gordon, A. M. Intlekofer, M. A. Paley, E. C. Mooney, T. Lindsten, E. J.
404 Wherry, and S. L. Reiner. 2010. Cutting Edge: The Transcription Factor Eomesodermin Enables
405 CD8 $^{+}$ T Cells To Compete for the Memory Cell Niche. *J.I.* 185: 4988–4992.

406 16. Ichii, H., A. Sakamoto, M. Hatano, S. Okada, H. Toyama, S. Taki, M. Arima, Y. Kuroda, and
407 T. Tokuhisa. 2002. Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8+ T cells.
408 *Nat Immunol* 3: 558–563.

409 17. Liu, Z., Y. Guo, S. Tang, L. Zhou, C. Huang, Y. Cao, H. Huang, X. Wu, D. Meng, L. Ye, H.
410 He, Z. Xie, Y. Wu, X. Liu, and X. Zhou. 2019. Cutting Edge: Transcription Factor BCL6 Is
411 Required for the Generation, but Not Maintenance, of Memory CD8 $^{+}$ T Cells in Acute Viral
412 Infection. *J.I.* 203: 323–327.

413 18. Ji, Y., Z. Pos, M. Rao, C. A. Klebanoff, Z. Yu, M. Sukumar, R. N. Reger, D. C. Palmer, Z. A.
414 Borman, P. Muranski, E. Wang, D. S. Schrump, F. M. Marincola, N. P. Restifo, and L. Gattinoni.
415 2011. Repression of the DNA-binding inhibitor Id3 by Blimp-1 limits the formation of memory
416 CD8+ T cells. *Nat Immunol* 12: 1230–1237.

417 19. Yang, C. Y., J. A. Best, J. Knell, E. Yang, A. D. Sheridan, A. K. Jesionek, H. S. Li, R. R.
418 Rivera, K. C. Lind, L. M. D'Cruz, S. S. Watowich, C. Murre, and A. W. Goldrath. 2011. The
419 transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8+ T cell
420 subsets. *Nat Immunol* 12: 1221–1229.

421 20. Kim, M. V., W. Ouyang, W. Liao, M. Q. Zhang, and M. O. Li. 2013. The Transcription Factor
422 Foxo1 Controls Central-Memory CD8+ T Cell Responses to Infection. *Immunity* 39: 286–297.

423 21. Michelini, R. H., A. L. Doedens, A. W. Goldrath, and S. M. Hedrick. 2013. Differentiation of
424 CD8 memory T cells depends on Foxo1. *Journal of Experimental Medicine* 210: 1189–1200.

425 22. Utzschneider, D. T., A. Delpoux, D. Wieland, X. Huang, C.-Y. Lai, M. Hofmann, R. Thimme,
426 and S. M. Hedrick. 2018. Active Maintenance of T Cell Memory in Acute and Chronic Viral
427 Infection Depends on Continuous Expression of FOXO1. *Cell Reports* 22: 3454–3467.

428 23. Wang, D., H. Diao, A. J. Getzler, W. Rogal, M. A. Frederick, J. Milner, B. Yu, S. Crotty, A.
429 W. Goldrath, and M. E. Pipkin. 2018. The Transcription Factor Runx3 Establishes Chromatin
430 Accessibility of cis-Regulatory Landscapes that Drive Memory Cytotoxic T Lymphocyte
431 Formation. *Immunity* 48: 659-674.e6.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

24. Henning, A. N., R. Roychoudhuri, and N. P. Restifo. 2018. Epigenetic control of CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 18: 340–356.

25. Xu, T., R. M. Pereira, and G. J. Martinez. 2021. An Updated Model for the Epigenetic Regulation of Effector and Memory CD8 $^{+}$ T Cell Differentiation. *J.I.* 207: 1497–1505.

26. Diao, H., and M. Pipkin. 2019. Stability and flexibility in chromatin structure and transcription underlies memory CD8 T-cell differentiation. *F1000Res* 8.

27. Gray, S. M., R. A. Amezquita, T. Guan, S. H. Kleinstein, and S. M. Kaech. 2017. Polycomb Repressive Complex 2-Mediated Chromatin Repression Guides Effector CD8+ T Cell Terminal Differentiation and Loss of Multipotency. *Immunity* 46: 596–608.

28. Kakaradov, B., J. Arsenio, C. E. Widjaja, Z. He, S. Aigner, P. J. Metz, B. Yu, E. J. Wehrens, J. Lopez, S. H. Kim, E. I. Zuniga, A. W. Goldrath, J. T. Chang, and G. W. Yeo. 2017. Early transcriptional and epigenetic regulation of CD8+ T cell differentiation revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat Immunol* 18: 422–432.

29. Li, J., K. Hardy, M. Olshansky, A. Barugahare, L. J. Gearing, J. E. Prier, X. Y. X. Sng, M. L. T. Nguyen, D. Piovesan, B. E. Russ, N. L. La Gruta, P. J. Hertzog, S. Rao, and S. J. Turner. 2021. KDM6B-dependent chromatin remodeling underpins effective virus-specific CD8+ T cell differentiation. *Cell Reports* 34: 108839.

30. Xu, T., A. Schutte, L. Jimenez, A. N. A. Gonçalves, A. Keller, M. E. Pipkin, H. I. Nakaya, R. M. Pereira, and G. J. Martinez. 2021. Kdm6b Regulates the Generation of Effector CD8 $^{+}$ T Cells by Inducing Chromatin Accessibility in Effector-Associated Genes. *J.I.* 206: 2170–2183.

31. Yamada, T., S. Nabe, K. Toriyama, J. Suzuki, K. Inoue, Y. Imai, A. Shiraishi, K. Takenaka, M. Yasukawa, and M. Yamashita. 2019. Histone H3K27 Demethylase Negatively Controls the Memory Formation of Antigen-Stimulated CD8 $^{+}$ T Cells. *J.I.* 202: 1088–1098.

32. Aranda, S., G. Mas, and L. Di Croce. 2015. Regulation of gene transcription by Polycomb proteins. *Sci. Adv.* 1: e1500737.

33. Melo, G. A., C. Calôba, G. Brum, T. O. Passos, G. J. Martinez, and R. M. Pereira. 2022. Epigenetic regulation of T cells by Polycomb group proteins. *J Leukocyte Bio* 111: 1253–1267.

34. Blackledge, N. P., and R. J. Klose. 2021. The molecular principles of gene regulation by Polycomb repressive complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22: 815–833.

35. Tavares, L., E. Dimitrova, D. Oxley, J. Webster, R. Poot, J. Demmers, K. Bezstarosti, S. Taylor, H. Ura, H. Koide, A. Wutz, M. Vidal, S. Elderkin, and N. Brockdorff. 2012. RYBP-PRC1 complexes mediate H2A ubiquitylation at polycomb target sites independently of PRC2 and H3K27me3. *Cell* 148: 664–678.

36. Schoeftner, S., A. K. Sengupta, S. Kubicek, K. Mechtler, L. Spahn, H. Koseki, T. Jenuwein, and A. Wutz. 2006. Recruitment of PRC1 function at the initiation of X inactivation independent of PRC2 and silencing. *EMBO J* 25: 3110–3122.

37. Bernstein, E., E. M. Duncan, O. Masui, J. Gil, E. Heard, and C. D. Allis. 2006. Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. *Mol Cell Biol* 26: 2560–2569.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

471 38. Kagey, M. H., T. A. Melhuish, and D. Wotton. 2003. The Polycomb Protein Pc2 Is a SUMO
472 E3. *Cell* 113: 127–137.

473 39. Merrill, J. C., T. A. Melhuish, M. H. Kagey, S.-H. Yang, A. D. Sharrocks, and D. Wotton.
474 2010. A Role for Non-Covalent SUMO Interaction Motifs in Pc2/CBX4 E3 Activity. *PLoS ONE* 5:
475 e8794.

476 40. Geiss-Friedlander, R., and F. Melchior. 2007. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat*
477 *Rev Mol Cell Biol* 8: 947–956.

478 41. Zhao, X. 2018. SUMO-Mediated Regulation of Nuclear Functions and Signaling Processes.
479 *Molecular Cell* 71: 409–418.

480 42. Li, B., J. Zhou, P. Liu, J. Hu, H. Jin, Y. Shimono, M. Takahashi, and G. Xu. 2007. Polycomb
481 protein Cbx4 promotes SUMO modification of *de novo* DNA methyltransferase Dnmt3a.
482 *Biochemical Journal* 405: 369–378.

483 43. Li, J., Y. Xu, X.-D. Long, W. Wang, H.-K. Jiao, Z. Mei, Q.-Q. Yin, L.-N. Ma, A.-W. Zhou, L.-S.
484 Wang, M. Yao, Q. Xia, and G.-Q. Chen. 2014. Cbx4 Governs HIF-1α to Potentiate Angiogenesis
485 of Hepatocellular Carcinoma by Its SUMO E3 Ligase Activity. *Cancer Cell* 25: 118–131.

486 44. Liu, B., Y.-F. Liu, Y.-R. Du, A. N. Mardaryev, W. Yang, H. Chen, Z.-M. Xu, C.-Q. Xu, X.-R.
487 Zhang, V. A. Botchkarev, Y. Zhang, and G.-L. Xu. 2013. Cbx4 regulates the proliferation of
488 thymic epithelial cells and thymus function. *Development* 140: 780–788.

489 45. Martinez, G. J., R. M. Pereira, T. Äijö, E. Y. Kim, F. Marangoni, M. E. Pipkin, S. Togher, V.
490 Heissmeyer, Y. C. Zhang, S. Crotty, E. D. Lamperti, K. M. Ansel, T. R. Mempel, H. Lähdesmäki,
491 P. G. Hogan, and A. Rao. 2015. The Transcription Factor NFAT Promotes Exhaustion of
492 Activated CD8 + T Cells. *Immunity* 42: 265–278.

493 46. Neitzke-Montinelli, V., C. Calôba, G. Melo, B. B. Frade, E. Caramez, L. Mazzoccoli, A. N. A.
494 Gonçalves, H. I. Nakaya, R. M. Pereira, M. B. F. Werneck, and J. P. B. Viola. 2022.
495 Differentiation of Memory CD8 T Cells Unravel Gene Expression Pattern Common to Effector
496 and Memory Precursors. *Front Immunol* 13: 840203.

497 47. Chen, R., S. Bélanger, M. A. Frederick, B. Li, R. J. Johnston, N. Xiao, Y.-C. Liu, S. Sharma,
498 B. Peters, A. Rao, S. Crotty, and M. E. Pipkin. 2014. In Vivo RNA Interference Screens Identify
499 Regulators of Antiviral CD4+ and CD8+ T Cell Differentiation. *Immunity* 41: 325–338.

500 48. Chen, Q., L. Huang, D. Pan, L. J. Zhu, and Y.-X. Wang. 2018. Cbx4 Sumoylates Prdm16 to
501 Regulate Adipose Tissue Thermogenesis. *Cell Reports* 22: 2860–2872.

502 49. Crotty, S., M. M. McCausland, R. D. Aubert, E. J. Wherry, and R. Ahmed. 2006.
503 Hypogammaglobulinemia and exacerbated CD8 T-cell–mediated immunopathology in SAP-
504 deficient mice with chronic LCMV infection mimics human XLP disease. *Blood* 108: 3085–3093.

505 50. Beltra, J.-C., S. Manne, M. S. Abdel-Hakeem, M. Kurachi, J. R. Giles, Z. Chen, V. Casella,
506 S. F. Ngiow, O. Khan, Y. J. Huang, P. Yan, K. Nzingha, W. Xu, R. K. Amaravadi, X. Xu, G. C.
507 Karakousis, T. C. Mitchell, L. M. Schuchter, A. C. Huang, and E. J. Wherry. 2020.
508 Developmental Relationships of Four Exhausted CD8+ T Cell Subsets Reveals Underlying
509 Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms. *Immunity* 52: 825-841.e8.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

51. Gautam, S., J. Fioravanti, W. Zhu, J. B. Le Gall, P. Brohawn, N. E. Lacey, J. Hu, J. D. Hocker, N. V. Hawk, V. Kapoor, W. G. Telford, D. Gurusamy, Z. Yu, A. Bhandoola, H.-H. Xue, R. Roychoudhuri, B. W. Higgs, N. P. Restifo, T. P. Bender, Y. Ji, and L. Gattinoni. 2019. The transcription factor c-Myb regulates CD8+ T cell stemness and antitumor immunity. *Nat Immunol* 20: 337–349.

52. Wang, Z., Z. Fang, G. Chen, B. Liu, J. Xu, F. Li, F. Li, H. Liu, H. Zhang, Y. Sun, G. Tian, H. Chen, G. Xu, L. Zhang, L. Hu, and H. Ji. 2021. Chromobox 4 facilitates tumorigenesis of lung adenocarcinoma through the Wnt/β-catenin pathway. *Neoplasia* 23: 222–233.

53. Hu, J. K., T. Kagari, J. M. Clingan, and M. Matloubian. 2011. Expression of chemokine receptor CXCR3 on T cells affects the balance between effector and memory CD8 T-cell generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: E118-127.

54. Kang, X., Y. Qi, Y. Zuo, Q. Wang, Y. Zou, R. J. Schwartz, J. Cheng, and E. T. H. Yeh. 2010. SUMO-Specific Protease 2 Is Essential for Suppression of Polycomb Group Protein-Mediated Gene Silencing during Embryonic Development. *Molecular Cell* 38: 191–201.

55. Wu, L., T. Pan, M. Zhou, T. Chen, S. Wu, X. Lv, J. Liu, F. Yu, Y. Guan, B. Liu, W. Zhang, X. Deng, Q. Chen, A. Liang, Y. Lin, L. Wang, X. Tang, W. Cai, L. Li, X. He, H. Zhang, and X. Ma. 2022. CBX4 contributes to HIV-1 latency by forming phase-separated nuclear bodies and SUMOylating EZH2. *EMBO Reports* .

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Figures Legends

Figure 1. Cbx4 deficiency skews CD8 T cell differentiation to a memory phenotype. (A) *In vitro*-activated P14 Thy1.1$^+$ cells transduced with retrovirus (RV) expressing control shRNA (shCD4, black) or shRNA targeting Cbx4 (shCbx4, red) were transferred to congenic receptor mice subsequently infected with LCMV and analyzed by flow cytometry for KLRG1 and CD127 expression in Ametrine$^+$ Thy1.1$^+$ CD8$^+$ T cells at 8 dpi (B) or Ametrine$^+$-sorted for RNA-Seq. Summary of frequency (C) and total cell numbers (D) of populations analyzed in KLRG1 x CD127 gate. RNA-Seq results showed 836 differentially expressed genes (DEGs) that were visualized in a heatmap of Z-score values clustered by hierarchical clustering (E). DEGs were tested by GSEA for enrichment of transcription signature from memory precursor (KLRG1^{lo}CD127^{hi}) population from day 8 of acute LCMV infection (23) (F). P14 shCD4 and shCbx4 cells were also assessed for *in vitro* specific cytotoxicity (dashed line indicates baseline tumor cell survival) (G). Representative contour plots for KLRG1 and CD127 expression are shown (B). Data are representative of two independent experiments ($n \geq 3$). *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$, ****$p < 0.0001$ by unpaired two-tailed Student *t* test (C, D).

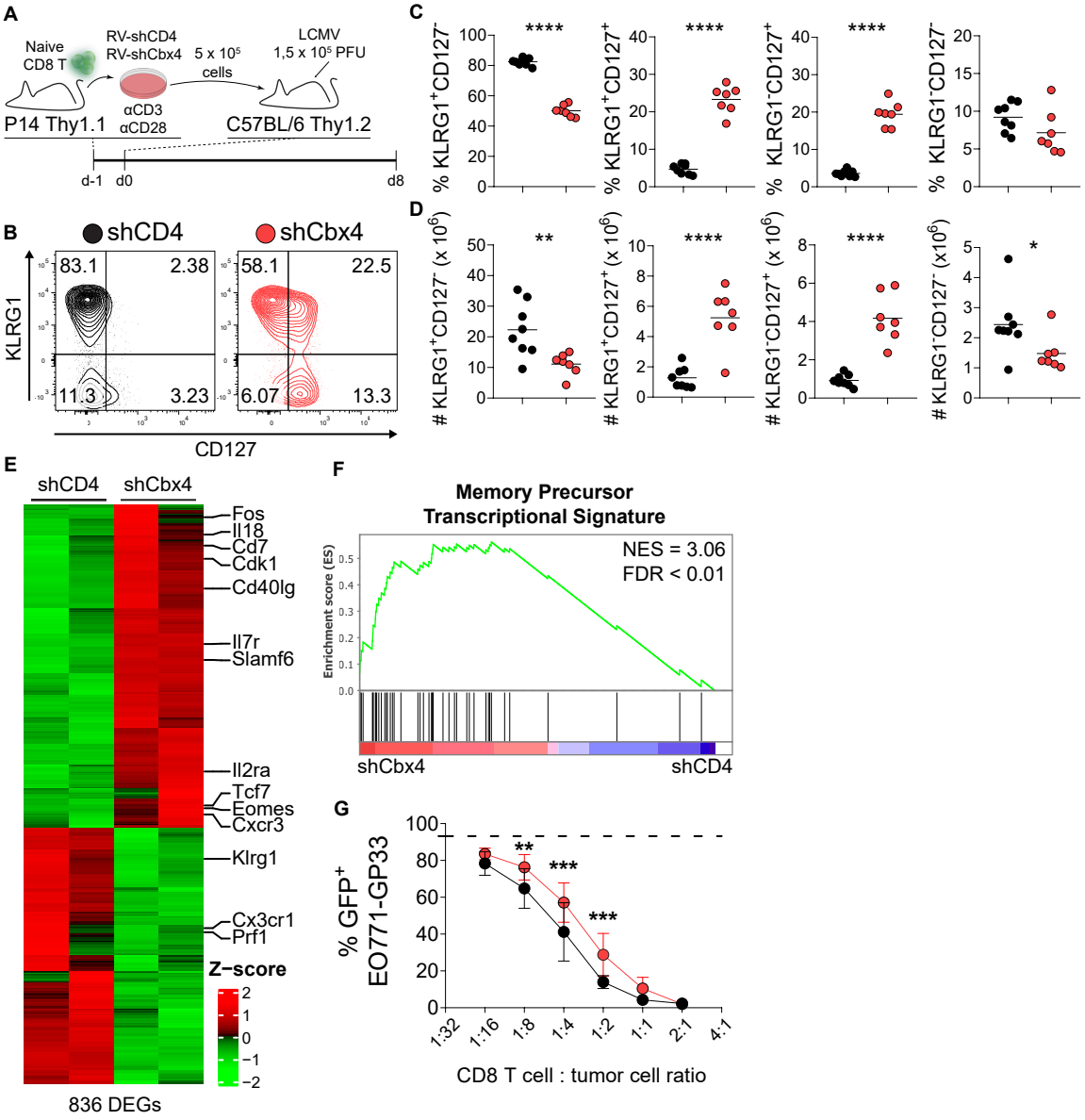
Figure 2. Cbx4 deficiency increases CD8 T cell memory formation. (A) Polyclonal Cbx4$^{fl/fl}$ (black) or Cbx4$^{fl/fl}$Cd4^{Cre} (red) mice were infected with acute infection LCMV and analyzed at 60 dpi. Frequency and total cell numbers of total CD8 T cell population (B) or LCMV-specific CD8 T cells (C) were measured by flow cytometry. The expression of KLRG1 and CD127 was analyzed by flow cytometry at 60 dpi (D), and frequency (E) and cell numbers (F) of each subpopulation were calculated. The expression of T-bet and Eomes was measured by gMFI in flow cytometry and T-bet/Eomes ratio was calculated using those values in both KLRG1$^+$ and KLRG1$^-$

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

564 populations (G). Representative contour plots for KLRG1 and CD127 expression are shown (D).
565 Data are representative of two independent experiments (n ≥ 3). *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p <$
566 0.001, ****$p < 0.0001$ by unpaired two-tailed Student *t* test (B, C, E-G).
567
568 **Figure 3. Differential requirement of Chromo and SIM1-2 Cbx4 domains for CTL**
569 **differentiation.** (A) *In vitro*-activated P14 Thy1.1$^+$ WT (black) or P14 Thy1.1$^+$ Cbx4$^{fl/fl}$CD4^{Cre}
570 (red) cells were transduced with either of Mock (control), wild type Cbx4 mRNA, Cbx4 ΔChromo
571 mutant or Cbx4 ΔSIM1-2 mutant, and then polarized *in vitro* to memory-like phenotype (10U/mL
572 of rhIL-2, 10 ng/mL of rhIL-7 and 10 ng/mL of rhIL-15) until day 14 of culture. The frequency of
573 CD8 T cells expressing both CD62L and CD127 (C), as well as the expression of each marker
574 measured by gMFI (D, E) was analyzed by flow cytometry. Gene expression for *Sell* (CD62L) and
575 *Il7r* (CD127) was quantified by RT-qPCR using reporter GFP$^+$-sorted cells (F, G). Expression of
576 effector-related markers CD25 and CXCR3 (H, I). All gMFI and mRNA expression data are
577 normalized to P14 Thy1.1$^+$ WT transduced with Mock. Representative contour plots for CD62L
578 and CD127 cytometry are shown (B). Data are representative of four (C-I) independent
579 experiments. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$, ****$p < 0.0001$ by two-way ANOVA with
580 Tukey's test for multiple comparisons.

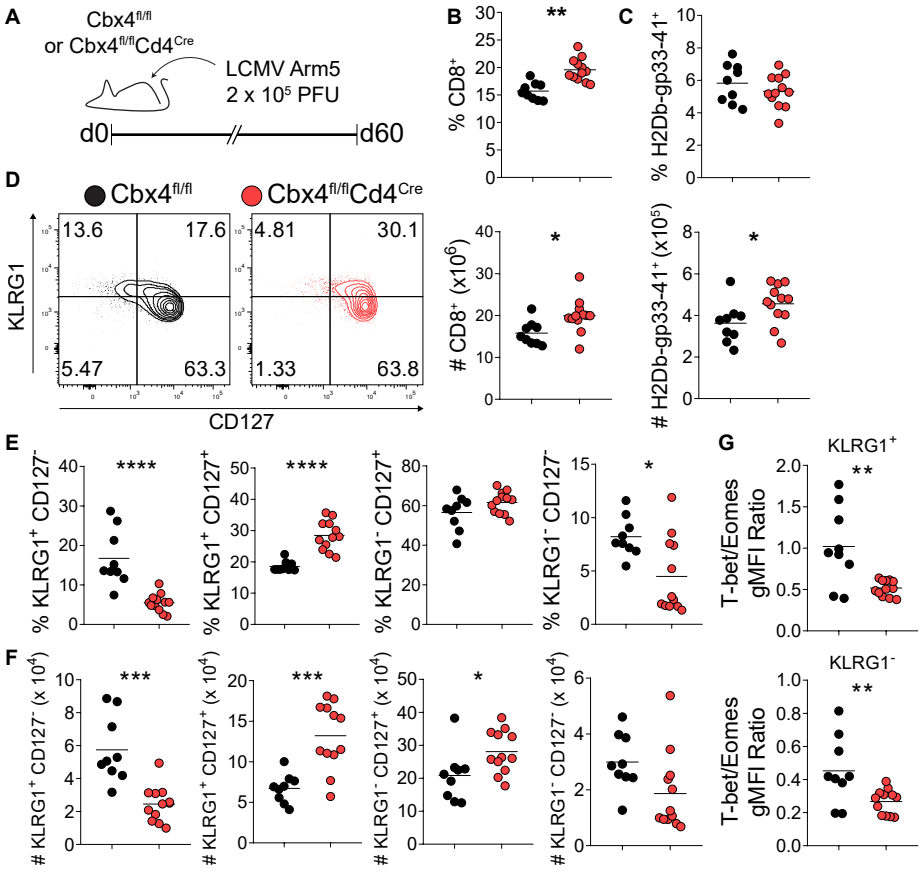
bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Figure 1



bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Figure 2



bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510675; this version posted October 7, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

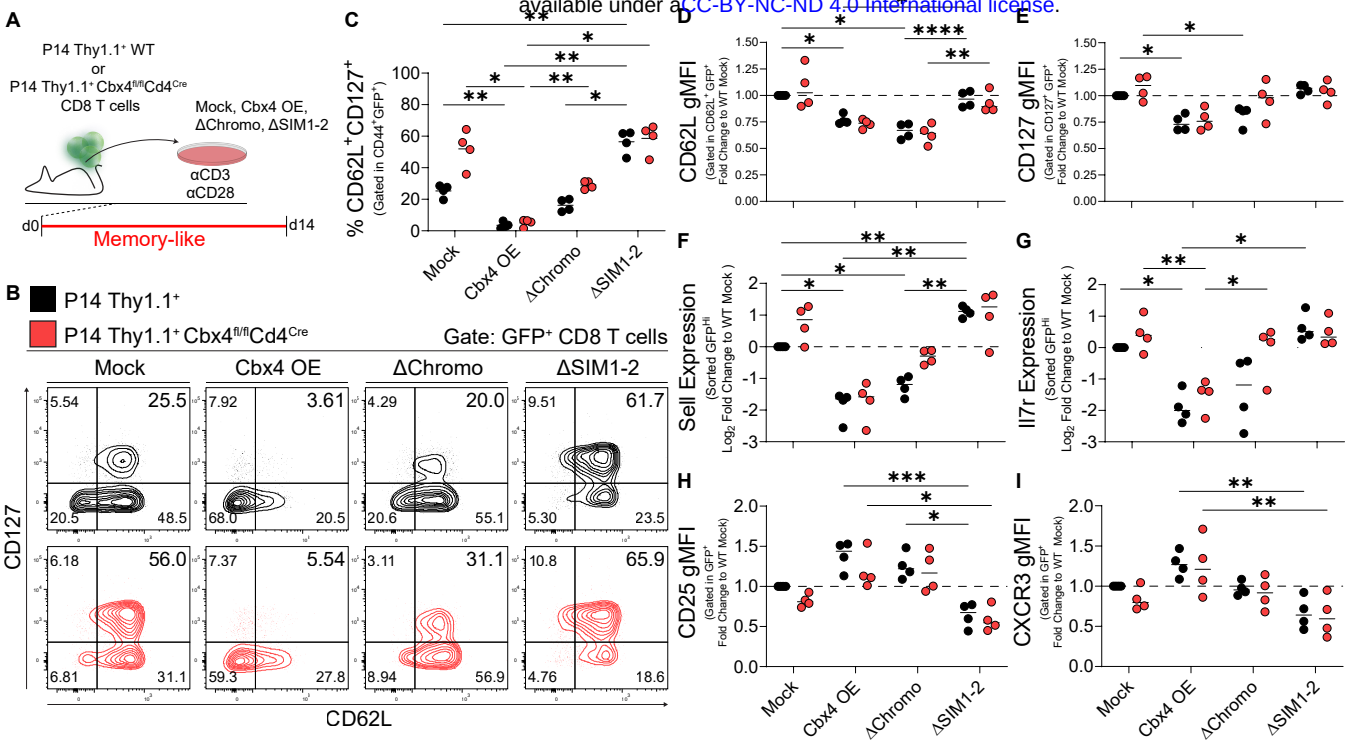



Figure 3