

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Thais Haline Vaz

**“ANÁLISE FUNCIONAL DA PROTEÍNA HUMANA
CODIFICADA PELO NOVO GENE DE RESPOSTA A
INTERFERON ISG95”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
THAIS HALINE VAZ
Nilson J. V. Zanchin
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética
Animal e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin

Campinas, 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

V477a	<p>Vaz, Thais Haline Análise funcional da proteína humana codificada pelo novo gene de resposta a interferon ISG95 / Thais Haline Vaz. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p>Orientador: Nilson Ivo Tonin Zanchin. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Interferon. 2. RNA polimerase II. 3. Duplo-híbrido de levedura. 4. Proteínas – Análise. I. Zanchin, Nilson Ivo Tonin. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(rcdt/ib)</p>
--------------	---

Título em inglês: Functional analysis of the human protein encoded by the new interferon stimulated gene ISG95.

Palavras-chave em inglês: Interferon; RNA polymerase II; Yeast two-hybrid; Proteins – Analysis.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Nilson Ivo Tonin Zanchin, Maria Silvia Viccari Gatti, Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro, Marcelo Damario Gomes, Aparecida Sadae Tanaka.

Data da defesa: 14/08/2008.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

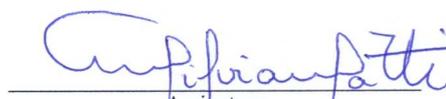
Campinas, 14 de agosto de 2008.

BANCA EXAMINADORA

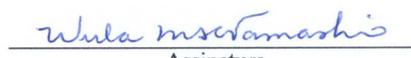
Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti


Assinatura

Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Damario Gomes


Assinatura

Profa. Dra. Aparecida Sadae Tanaka


Assinatura

Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad

Assinatura

Profa. Dra. Lucia Elvira Álvares

Assinatura

Prof. Dr. Claudio Miguel da Costa Neto

Assinatura

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Interferons	1
1.1.1. Indução da Expressão de IFNs	3
1.1.2. Vias de Sinalização em Resposta a IFN Tipo I	5
1.1.3. Determinação do Estado Antiviral	8
1.1.4. Mecanismos de Evasão da Resposta Antiviral	12
1.2. KIAA0082/ISG95	16
1.3. Capping de pré-mRNA	22
1.4. Splicing de pré-mRNA	26
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1. Cepas de Bactérias, Levedura e Linhagens de Células Eucarióticas	36
3.1.1 Cepas de <i>Escherichia coli</i>	36
3.1.2 Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
3.1.3 Linhagens Celulares Eucarióticas	36
3.2. Cultura de Cepas de <i>Escherichia coli</i>, Levedura e Linhagens Celulares Eucarióticas	37
3.2.1. Meios de Cultura e Manutenção de Cepas de <i>E. coli</i>	37
3.2.2. Meios de Cultura e Manutenção de Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
3.2.3. Meio de Cultura e Manutenção de Células de Inseto Sf9	37
3.2.4. Meio de Cultura e Manutenção de Células de Mamíferos	37
3.3. Oligodesoxirribonucleotídeos	38
3.4. Plasmídeos	39
3.4.1. Plasmídeos para <i>Escherichia coli</i>	39
3.4.2 Plasmídeos para Levedura	40

3.4.3. Plasmídeos para Cultura de Células Eucarióticas	40
3.5. Descrição das Construções de Plasmídeos	41
3.5.1. Construções de Plasmídeos para Expressão de Proteínas em <i>Escherichia coli</i>	41
3.5.2. Construção de Plasmídeo para Expressão de Proteína em Sf9.....	41
3.5.3. Construções de Plasmídeos para Células de Mamíferos	43
3.5.4. Construções de Plasmídeos para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
3.6. Transformação/Transfecção	47
3.6.1. Transformação de <i>E. coli</i>	47
3.6.2. Transformação de Levedura.....	47
3.6.3. Transfecção de Células Eucarióticas	47
3.6.3.1. Transfecção de Células HeLa	47
3.6.3.2. Transfecção de Células Vero	48
3.6.3.3. Transfecção de Células Sf9 e Geração do Vírus Recombinante.....	48
3.7. Análise da Atividade do Promotor do gene <i>ISG95</i>	49
3.7.1. Tratamento com IFN- α	49
3.7.2. Teste de Atividade do Repórter SEAP	50
3.8. Análise da Localização Sub-Celular de <i>ISG95</i>	50
3.8.1. Fusão a GFP (<i>green fluorescent protein</i>)	50
3.8.2. Fracionamento Celular e <i>Western Blot</i>	51
3.9. Expressão de Proteínas Recombinantes	53
3.9.1. Expressão de Proteínas Recombinantes em <i>Escherichia coli</i>	53
3.9.2. Expressão de Proteínas Recombinantes em Células de Inseto Sf9	54
3.9.2.1. Teste de Concentração Viral	54
3.9.2.2. Teste de Período Ótimo de Indução após Infecção.....	55
3.9.2.3. Infecção de Sf9 em Larga Escala.....	55
3.10. Purificação de Proteínas Recombinantes.....	56
3.10.1. Purificação a partir de Extratos de <i>E. coli</i>	56
3.10.1.1. Preparação dos Extratos para os Testes de Purificação	56
3.10.1.2. Teste de Purificação por Afinidade à Metal Imobilizado das Proteínas de Fusão à Hexa-Histidina	56

3.10.1.3. Testes de Purificação das Proteínas de Fusão à MBP.....	57
3.10.1.3.1. Cromatografias de Afinidade.....	57
3.10.1.3.1.1. Afinidade à Amilose.....	57
3.10.1.3.1.2. Afinidade à Níquel	57
3.10.1.3.2. Cromatografias de Troca Iônica	57
3.10.1.3.2.1. Cromatografia em DEAE-Sepharose	57
3.10.1.3.2.2. Cromatografia em Q-Sepharose	57
3.10.1.3.2.3. Cromatografia em SP-Sepharose	58
3.10.1.3.3. Cromatografia de Exclusão Molecular	58
3.10.1.3.4. Digestão com a Protease TEV	58
3.10.1.4 Testes de Renaturação de Proteínas <i>in vitro</i>	58
3.10.2. Purificação de Proteínas Recombinantes de Células de Inseto	59
3.10.2.1. Tratamento dos Extratos de Células Sf9	59
3.10.2.2. Purificação de ISG95 dos Extratos de Sf9	60
3.10.2.2.1. Cromatografia de Afinidade à Metal Imobilizado.....	60
3.10.2.2.2. Cromatografia de Troca Iônica	60
3.11. Caracterização Bioquímica da ISG95 Recombinante	61
3.11.1. Ensaio de Atividade Trifosfatase	61
3.11.2. Ensaio de Atividade Guanililtransferase	61
3.11.3. Ensaio de Interação com RNA.....	62
3.11.3.1. Transcrição <i>in vitro</i>	62
3.11.3.2. Extração de RNA	63
3.11.3.3. Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética de RNA (EMSA) e RNA <i>crosslinking</i>	63
3.11.3.4. Ensaio de Interação com RNA biotilado	64
3.11.3.5. Análise da Interação de ISG95 com snRNA U2.....	64
3.11.3.5.1. Co-Imunoprecipitação	64
3.11.3.5.2. <i>Northern Blot</i>	65
3.11.4. Ensaio de Atividade de Metiltransferase	66
3.11.4.1. Análise da Interação de ISG95 a SAM (S-adenosilmetionina)	66

3.11.4.2. Ensaio de Metilação <i>in vitro</i>	66
3.12. Teste de Complementação em <i>S. cerevisiae</i>	67
3.12.1. Construção das Cepas Condicionais para os Genes <i>ABD1</i> , <i>CET1</i> e <i>CEG1</i>	67
3.12.2. Confirmação do Genótipo das Cepas Condicionais	70
3.12.3. Teste de Complementação das Atividades de <i>ABD1</i> , <i>CET1</i> e <i>CEG1</i> por <i>ISG95</i> nas Cepas Condicionais de <i>S. cerevisiae</i>	71
3.13. Duplo-Híbrido de Levedura	72
3.13.1 Teste de Auto-Ativação da Isca.....	73
3.13.2. Rastreamento em Larga Escala pelo Sistema Duplo-Híbrido de Levedura	74
3.13.3. Teste de Atividade do Gene Repórter <i>lacZ</i>	75
3.13.4. Mapeamento da Região de <i>ISG95</i> Responsável pelas Interações Identificadas no Rastreamento de Duplo-Híbrido.....	75
3.13.4.1. Duplo-Híbrido com Clones Truncados de <i>ISG95</i>	75
3.13.4.2. Co-Imunoprecipitação.....	76
3.14. Ensaios de <i>Splicing in vitro</i>	76
4. RESULTADOS	78
4.1. Teste da Atividade do Promotor do gene <i>ISG95</i>	78
4.2. Análise da Localização Sub-Celular de <i>ISG95</i>	81
4.3. Expressão e purificação de <i>ISG95</i> e de seus domínios em <i>Escherichia coli</i>	83
4.3.1. Cromatografia de Afinidade de Proteínas de Fusão a Hexa-Histidina.....	83
4.3.2. Testes de Purificação de <i>ISG95</i> e seus Domínios em Fusão a MBP (<i>Maltose</i> <i>Binding Protein</i>)	84
4.3.2.1. Cromatografia de Afinidade à Amilose	84
4.3.2.2. Cromatografia de Afinidade à Níquel da Proteína de Fusão MBP- <i>ISG95</i> .	86
4.3.2.3. Testes de Renaturação e Cromatografia de Exclusão Molecular	88
4.4. Expressão de <i>ISG95</i> em Células de Inseto Sf9	89
4.4.1. Determinação das Condições Ótimas de Expressão.....	89
4.4.2. Infecção de Células Sf9 em Larga Escala e Purificação de <i>ISG95</i>	91
4.5. Caracterização Bioquímica de <i>ISG95</i> recombinante.....	93
4.5.1. Ensaios de Atividade Guanililtransferase.....	93

4.5.2. Ensaio de Atividade de Trifosfatase.....	94
4.5.3. Ensaio de Interação com RNA.....	97
4.5.3.1. Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética (EMSA) e RNA <i>crosslinking</i>	97
4.5.3.2. Ensaio de Interação com RNA biotilado	97
4.5.3.3. Ensaio de Interação com snRNA U2	98
4.5.4. Ensaio de Atividade de Metiltransferase	98
4.6.4.1. Ensaio de Ligação a SAM (S-adenosilmetionina) <i>in vitro</i>	98
4.6.4.2. Ensaio de Atividade de Metiltransferase	99
4.6. Teste de Complementação em Levedura.....	100
4.6.1. Construção das cepas para Teste de Complementação	100
4.6.2. Ensaio de Complementação das Atividades Formadoras de <i>cap</i> de pré-mRNA ..	105
4.7. Ensaio de Duplo-Híbrido de Levedura.....	107
4.7.1. Teste de Auto-Ativação da Isca.....	107
4.7.2. Rastreamento em Larga Escala pelo Sistema Duplo-Híbrido de Levedura	107
4.7.3. Mapeamento das Interações Identificadas no rastreamento de Duplo-Híbrido e Teste de Auto-Ativação das Iscas e Presas.....	108
4.7.4. Confirmação da Interação com RNA polimerase II por Co-Imunoprecipitação...	113
4.8. Ensaio de Splicing de pré-mRNA <i>in vitro</i>	114
5. DISCUSSÃO	116
6. CONCLUSÕES.....	130
7. REFERÊNCIAS	132
8. ANEXO.....	148

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin pela orientação e paciência.

À Profa. Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro, ao Prof. Dr. Marcelo Damario Gomes e à Profa. Dra. Aparecida Sadae Tanaka pela participação na banca.

À Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad, Profa. Dra. Lucia Elvira Álvares e Prof. Dr. Claudio Miguel da Costa Neto pelo aceite do convite para participação como suplentes na banca.

Às técnicas Tereza Cristina Lima Silva, Adriana Cristina Alves Pinto, Elaine Cristina Teixeira, Maria Eugênia Ribeiro de Camargo pela assistência no laboratório.

Ao colega Daniel Maragno Trindade e ao Prof. Dr. Jörg Kobarg pelo sobrenadante de infecção da proteína staniocalcina 1.

À Prof. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti pela linhagem celular Vero.

À todos os amigos do LNLS, em especial à Sandra, Beatriz, Juliana, Patrícia, Daniela e Flávia pelo apoio e ótimo convívio.

Às minhas grandes amigas, Michelle e Lucila, por toda atenção e amor que me dedicam há tanto tempo, incondicionalmente.

À minha família pelo estímulo, cuidado e apoio. Em especial à minha mãe, companheira em todos os momentos, por seu amor e paciência infinitos.

Ao curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pelo excelente corpo docente, infra-estrutura e funcionários.

Ao LNLS pela excelente infra-estrutura.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

RESUMO

A resposta individual das células está na base da resistência do organismo à infecção viral. O principal mecanismo de resistência envolve a participação de inúmeros genes da via de sinalização dos interferons. Vários estudos vêm sendo conduzidos em larga escala para identificar genes que respondem aos mais variados tratamentos, assim como *clusters* gênicos relacionados a determinadas enfermidades, como a leucemia. A função do produto de muitos destes genes ainda não foi caracterizada. Numa ampla revisão destes artigos identificamos a proteína KIAA0082/ISG95 respondendo a interferon, à infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), ao tratamento celular com oligodeoxinucleotídeos CpG, fazendo parte de um *cluster* de genes relacionados à leucemia e sendo super-expressa em linfócitos T ativados. Embora não possua função conhecida, esta proteína apresenta quatro domínios que indicam uma possível atividade relacionada ao metabolismo de RNA.

Neste trabalho demonstramos que o promotor do gene *ISG95* responde à estimulação por interferon num sistema repórter em células Vero. As atividades bioquímicas de ISG95 foram determinadas usando a proteína recombinante expressa em células de inseto Sf9. ISG95 interage com RNA e com S-adenosilmetionina, possuindo também atividade de metiltransferase *in vitro*. Ensaio de localização sub-celular demonstraram sua distribuição nuclear. Além disso, através do método duplo-híbrido de levedura e de ensaio de co-imunoprecipitação, foi possível identificar sua interação com o domínio C-terminal (CTD) da RNA polimerase II, o que é consistente com sua localização nuclear e com a função predita para o domínio WW localizado na extremidade C-terminal de ISG95. Os resultados indicam que ISG95 é parte da via de resposta a interferon e tem função associada possivelmente a eventos de processamento de pré-mRNA mediados pelo domínio CTD da RNA polimerase II.

ABSTRACT

A major mechanism of cellular resistance to viral invasion involves genes from the interferon signaling pathway, called ISGs (interferon stimulated genes). Global transcriptional profiling studies have linked increased expression of ISG95 (KIAA0082) to response to interferon treatment and to viral infection, suggesting that it may be part of the cellular defense against viral replication. In this work, we shown that the *ISG95* promoter can drive interferon-induced transcription of a reporter gene in Vero cell cultures. The biochemical functions of ISG95 were assessed using recombinant protein. ISG95 shows RNA- and S-adenosyl-methionine binding and protein methyltransferase activity *in vitro*. ISG95 interacts with the C-terminal domain of RNA polymerase II, which is consistent with its nuclear localization and with the predicted function of the WW domain found in the C-terminal region of ISG95. The results presented in this work indicate that ISG95 is part of the interferon response pathway and functions in the pre-mRNA processing events mediated by the C-terminal domain of the RNA polymerase II.

LISTA DE ABREVIATURAS

2'-5' OAS	2'-5' oligoadenilato sintase
3-AT	3-aminotriazol
5-FOA	ácido 5-fluororótico
AAF	dímero de STAT1
<i>ABD1</i>	gene que codifica a RNA-metiltransferase de <i>S. cerevisiae</i>
AD	domínio de ativação da transcrição
AdV	adenovírus
ALL	leucemia linfoblástica aguda
APC	célula apresentadora de antígenos
BSA	albumina de soro bovino
BUNV	vírus <i>bunyamwera</i>
BVDV	vírus da diarreia bovina
CBP/p300	proteína de ligação a CREB
CBP	proteína de ligação à <i>cap</i>
cDNA	DNA complementar
<i>CEG1</i>	gene que codifica a RNA-guanililtransferase de <i>S. cerevisiae</i>
<i>CET1</i>	gene que codifica a RNA-trifosfatase de <i>S. cerevisiae</i>
CpG ODN	oligodeoxinucleotídeo CpG
cpm	contagem por minuto
CREB	proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico
CSFV	vírus da febre suína clássica
CTD	domínio C-terminal da RNA polimerase II
CTL	linfócito T citotóxico
pDC	célula dendrítica plasmocitóide
DO _{600nm}	densidade ótica a 600nm
dsDNA	DNA de dupla-fita
dsRNA	RNA de dupla-fita
DTT	1,4-ditiotreitól

EBOV	vírus Ebola
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
eIF2 α	subunidade alfa do fator 2 de iniciação da tradução
EMSA	ensaio de modificação da mobilidade eletroforética
GAS	seqüência ativada por IFN- γ
GFP	proteína fluorescente verde
HCMV	citomegalovírus humano
HCV	vírus da hepatite C
HEV	vírus da hepatite E
HHV	vírus da herpes humana
<i>HIS3</i>	gene que codifica a enzima <i>imidazoleglycerol-phosphate dehydratase</i> da via de síntese de histidinas em <i>S. cerevisiae</i>
HIV	vírus da imunodeficiência adquirida humana (AIDS)
HPV	papilomavírus humano
HSV	vírus da herpes
IFNGR	receptor de interferon tipo II (IFN- γ)
IFN	interferon
IFNAR	receptor de interferon tipo I (α/β)
IL	interleucina
IPTG	isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo
IRF	fator regulatório de interferon
ISGs	genes induzidos por interferon
ISG95	gene induzido por interferon de 95 kDa
ISGF3	fator 3 de indução de genes por IFN
ISRE	elemento de resposta estimulado por IFN
JAK	Janus quinase
JEV	vírus da encefalite japonesa
kDa	kiloDaltons
<i>lacZ</i>	gene que codifica a enzima β -galactosidase de <i>E. coli</i>
L _T	linfócitos T

MARE	seqüência nucleotídica reconhecida por fatores de transcrição da família MafB
MBP	proteína de ligação à maltose
MeV	vírus do sarampo
MHC	complexo maior de histocompatibilidade
MyBP	proteína de ligação à mielina
NK	<i>natural killer</i>
NS	proteína não estrutural
ORF	janela de leitura aberta
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PBMCs	células mononucleadas de sangue periférico
PCR	reação em cadeia da polimerase
PI3K	fosfatidil inositol 3-quinase
PKC	proteína quinase C
PKR	proteína quinase ativada por RNA de fita-dupla
PML	leucemia promielocítica
RABV	vírus da raiva
RSV	vírus respiratório sincicial
S	coeficiente de sedimentação
SAH	S-adenosil-L-homocisteína
SAM	S-adenosil-L-metionina
SC	meio mínimo sintético de levedura
SEAP	fosfatase alcalina secretada
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de duodecil-sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
snRNA	pequeno RNA nuclear
snRNP	pequena ribonucleoproteína nuclear
ss	sítio de <i>splicing</i>
STAT	transdutor de sinal e ativador de transcrição
STC1	staniocalcina 1
T CD4 ⁺	linfócitos T helper

T CD8 ⁺	linfócitos T citotóxicos
TEV	<i>Tobacco Echt Vírus</i>
Th1	linfócito T <i>helper</i> 1
TLR	receptor <i>Toll-like</i>
TMV	vírus do mosaico do tabaco
U	unidades de enzima
UTR	região não traduzida do RNA
UV	ultravioleta
VACV	vírus vaccinia
VSV	vírus da estomatite vesicular
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoli- β -D-galactopiranosídeo

1. INTRODUÇÃO

1.1. Interferons

Os interferons (IFNs) são uma família de citocinas estruturalmente relacionadas encontrada apenas em vertebrados. Possuem atividade autócrina e parácrina, estimulando redes de sinalização intracelular e intercelular que regulam a resposta a infecções virais, estimulam as respostas imunes inatas e adaptativas e regulam a sobrevivência e morte de células normais e tumorais (Borden et al., 2007). O pleiotropismo das respostas estimuladas por IFN se deve à regulação transcricional de centenas de genes efetores, chamados ISGs (*interferon stimulated genes*) (Takaoka e Yanai, 2006).

Com base em propriedades estruturais e funcionais os IFNs são classificados em três tipos. A família de IFNs do tipo I, também chamados IFNs virais, é constituída principalmente por proteínas não glicosiladas, possuindo entre 165 e 200 aminoácidos e com homologia de 30 a 85% entre as espécies. Em humanos há 13 genes codificando para IFN- α e apenas um para os IFN- β , - ω , - ϵ , - κ . Dentre os mamíferos o número de genes codificando para IFNs tipo I é variável, sendo que algumas espécies possuem genes exclusivos (como o IFN- δ em porcos, o - τ em ruminantes e o - ζ em camundongos) enquanto em outras se observa a ausência de um dos genes (como o IFN- ω em camundongos) (Takaoka et al., 2006). Os IFN- α e - β são produzidos por qualquer tipo celular diretamente em resposta à infecção viral. Os demais desempenham papéis menos definidos, como o reconhecimento materno durante a gravidez (Randall e Goodbourn, 2008). Embora a natureza multigênica do IFN- α já seja conhecida há bastante tempo, seu significado ainda é bastante debatido. Discute-se se esses genes seriam expressos diferencialmente em diferentes tipos celulares, se seriam induzidos por diferentes vírus ou se seriam funcionalmente especializados (Randall e Goodbourn, 2008). Sabe-se, porém, que embora utilizem os mesmos receptores, os diferentes subtipos de IFN- α apresentam atividades biológicas relativas distintas. Um exemplo é a diferença marcante (de mais de mil vezes) na capacidade dos diferentes subtipos em aumentar a atividade das células NK (*natural killer*). As diferenças no padrão de atividade biológica entre os subtipos de IFN- α podem ser causadas por diferentes propriedades de

interação e afinidades com o receptor, que podem resultar na ativação de vias de sinalização intracelular que variam em qualidade, intensidade e duração (Takaoka e Yanai, 2006).

O IFN- γ , uma proteína glicosilada de 140 aminoácidos, constitui o único representante da família dos IFN tipo II. Isso se deve à sua baixa homologia aos IFNs tipo I e ao fato de ser produzido especificamente por células NK e L_T (linfócitos T) ativados, e não em resposta direta à infecção, sendo por isso também conhecido como interferon imune (Borden et al., 2007; Randall e Goodbourn, 2008). Também possui atividade antiviral, porém têm papel essencial na ativação da atividade microbicida de macrófagos, que constituem os efetores da imunidade inata e adaptativa. Além disso, o IFN- γ também contribui para o desenvolvimento de células Th1 (*T helper 1*) $CD4^+$ e de células citotóxicas T $CD8^+$ (Takaoka e Yanai, 2006).

Os IFNs tipo III foram identificados recentemente e em humanos este grupo inclui três proteínas homólogas, o IFN- $\lambda 1$ (IL-28A), $\lambda 2$ (IL-28B) e $\lambda 3$ (IL-29). Assim como os IFNs tipo I, os IFNs tipo III são expressos por diversos tipos celulares infectados por vírus e induzem a expressão de ISGs. Porém os IFNs tipo III são estruturalmente distintos do tipo I, utilizam receptores específicos, cuja distribuição é limitada a alguns tecidos e, além disso, as vias de sinalização iniciadas por sua ligação a esses receptores ainda não foram esclarecidas (Takaoka e Yanai, 2006; Randall e Goodbourn, 2008). O papel dessa família de IFNs ainda não foi estabelecido, mas há poucas evidências que demonstrem um papel essencial na sobrevivência do hospedeiro em resposta a infecção viral (Randall e Goodbourn, 2008).

Embora os vírus sejam parasitas intracelulares obrigatórios e dependam inteiramente da maquinaria metabólica dos hospedeiros, estes não são indefesos e fazem uso de diversas medidas para manter os vírus sob controle. Os IFNs tipo I são os principais responsáveis pela defesa a todos os tipos de vírus, e uma vez secretados por células por eles infectadas levam à indução de um estado antiviral pela indução de ISGs, o que limita o crescimento e dispersão dos vírus (Haller et al., 2006).

O papel essencial dos IFNs tipo I para o controle de infecções virais em vertebrados fica claro em camundongos com deleções nos receptores de IFN tipo I. Estes animais deixam de responder ao tratamento com IFN- α/β e sucumbem rapidamente à infecção viral, embora possuam o sistema imune adaptativo intacto (Müller et al., 1994; Hwang et al., 1995; van den Broek et al., 1995; Grieder e Vogel, 1999; Ryman et al., 2000; Bouloy et al., 2001; Bray, 2001).

Além disso, deleções de apenas uma ISG podem causar a completa perda da imunidade inata a um tipo de vírus em particular. Um bom exemplo é o aumento da susceptibilidade à infecção por influenzavírus em algumas linhagens de camundongos devido a um defeito na ISG Mx. Embora possuam o sistema imune inato e adaptativo em funcionamento (com excessão do gene Mx) esses animais não resistem especificamente à infecção por orthomyxovírus, porém a expressão transgênica do gene Mx de camundongo, ou mesmo o humano nesses animais, é suficiente para torná-los resistentes (Lindenmann, 1964; Haller, 1981; Haller et al., 1998; Staeheli et al., 1998).

1.1.1. Indução da expressão de IFNs

A síntese de IFNs é transitória e requer estimulação. RNAs duplo-fita (dsRNA) foram identificados como potentes indutores da expressão de IFNs. Essas moléculas seriam geradas durante a transcrição de vírus com material genético constituído por RNA de polaridade negativa, durante a replicação de vírus com RNA de polaridade positiva, e como resultado de transcrição convergente em vírus cujo material genético é DNA. Porém, embora essa molécula seja realmente um indutor bastante eficiente, não é o único (Randall e Goodbourn, 2008).

Há diversas rotas iniciadas pelo reconhecimento de PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) pelas quais o hospedeiro percebe a presença de vírus e sinaliza a indução da expressão de IFNs via ativação dos fatores de transcrição IRF-3 (*interferon regulatory factor 3*) e NF- κ B. Esses fatores, juntamente com o heterodímero c-jun/ATF-2, se associam ao promotor de IFN- β formando o chamado *enhanceossomo*. A formação de complexo recruta CBP/p300, que por sua vez promove a montagem da maquinaria basal de transcrição. A importância de cada rota individualmente depende do vírus ao qual está sendo montada a resposta, do tipo de célula que está sendo infectada e do estágio da infecção (Randall e Goodbourn, 2008). No início, as células infectadas secretam, principalmente, IFN- β , porém alteram para a secreção de IFN- α durante a fase subsequente de amplificação da resposta. Isso ocorre porque a primeira onda de produção de IFN- β leva à expressão de IRF-7, um fator de transcrição com importante atividade reguladora na expressão de IFNs e que não é expresso em células não estimuladas. Esse fator é ativado da mesma maneira que IRF-3 e é responsável pela alça de *feedback* positivo que leva à expressão de diversos subtipos de IFN- α na segunda onda de síntese de IFNs (Haller et al., 2006).

Uma das rotas de ativação da síntese de IFNs se dá através do reconhecimento de dsRNA extracelular ou contido em endossomos pelo receptor TLR3. Esse receptor apresenta uma distribuição histológica bastante ampla. Em células dendríticas mielóides observa-se sua relocalização do retículo endoplasmático para os endossomos, para os lisossomos em macrófagos e para os endossomos e superfície celular em fibroblastos. Essa distribuição permite a detecção de dsRNA presente no ambiente extracelular e daquele produzido pelo desnudamento viral ou pela degradação de partículas virais, o que permite o desenvolvimento de uma resposta sem a necessidade de replicação viral. A ativação de TLR3 através de sua interação com dsRNA dá início a uma complexa via de sinalização que resulta na liberação de NF- κ B para migrar para o núcleo, onde pode desempenhar sua atividade como fator de transcrição. Paralelamente ocorre a fosforilação de IRF-3, resultando em sua ativação (Randall e Goodbourn, 2008).

Outra via de indução de IFN- β ocorre após o reconhecimento de ssRNA (*single-stranded RNA*) por TLR7 nos endossomos. Essa via é particularmente efetiva em pDCs (*plasmocitoid dendritic cells*), devido a seu padrão de expressão gênica, já que este é um dos poucos tipos celulares que expressam TLR7. O receptor TLR7 ativado desencadeia uma sequência de interações que também acaba resultando na ativação de IRF-3 e NF- κ B (Randall e Goodbourn, 2008).

Algumas células PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) reconhecem DNAs fagocitados e ativam a produção de IFN. Nesses casos o DNA estranho é reconhecido por TLR9 devido a presença de CpGs não metilados e leva à ativação de NF- κ B e diferentes IRFs (IRF-7 em células dendríticas plasmocitóides e IRF-1 em mielóides).

Há também vias de indução de IFN independentes de TLRs, que respondem a dsRNA virais presentes no citoplasma. Nesse caso a cadeia de sinalização é iniciada por duas RNA helicases, RIG-I e MDA-5. Essas helicases são expressas na maioria dos tecidos, são aparentemente não-redundantes e apresentam certo grau de especificidade com relação ao agente infeccioso reconhecido por elas. A sinalização iniciada pelo reconhecimento de dsRNA por estas helicases também resulta na ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e IRF-3. Além dos ácidos nucleicos virais, algumas proteínas do envelope também podem induzir a expressão de IFNs, embora esta não seja uma característica generalizada entre os vírus. Um exemplo é a proteína F de RSV

(*respiratory syncytial virus*) e a proteína gG de VSV (*vesicular stomatitis virus*), que induzem a expressão de IFN de forma dependente de TLR4 (Randall e Goodbourn, 2008).

1.1.2. Vias de sinalização em resposta a IFN tipo I

Os IFNs tipo I exercem sua atividade através de sua ligação a receptores na superfície celular compostos de duas proteínas transmembrana expressas ubiquamente, chamadas IFNAR1 e IFNAR2. A formação do complexo ternário receptor-IFN é um processo composto de dois passos. Inicialmente o IFN interage com um dos IFNAR e em seguida recruta o segundo, não havendo interações identificadas entre as duas subunidades do receptor. Geralmente a afinidade dos IFNs tipo I é muito maior ao IFNAR2 com relação ao IFNAR1, o que sugere que a ligação ao receptor ocorra primeiramente com a subunidade 2. Porém, o subtipo IFN- α 1 tem menor afinidade para a subunidade IFNAR2 e demonstrou-se que a ligação reversa com os receptores tem importância na determinação de diferentes efeitos celulares (Gavutis et al., 2006). Assim, embora não haja diferenças na estrutura dos complexos receptor-IFN, é possível que diferentes afinidades às subunidades do receptor, e dessa forma na estabilidade do complexo, governem as diferentes atividades biológicas dos subtipos de IFN tipo I (Borden et al., 2007).

A via de sinalização ativada pelos IFNs (Figura 1) envolve a família de Janus quinases (JAKs) e a família de sinalizadores e ativadores da transcrição (STATs) (Randall e Goodbourn, 2008). No caso dos IFNs do tipo I, antes da ativação dos receptores, a cauda citoplasmática de IFNAR1 encontra-se associada à quinase Tyk2 e a subunidade IFNAR2 se associa à quinase JAK1 e à STAT2. STAT2, por sua vez, se associa de maneira fraca à STAT1. A dimerização do receptor induzida pela ligação do IFN causa uma mudança conformacional de forma que Tyk2 fosforila IFNAR1, criando um forte sítio de ligação para STAT2 que, após sua associação ao receptor, também é fosforilada por Tyk2. STAT1 é fosforilada por JAK1 e em seguida as STATs fosforiladas formam um heterodímero estável. O complexo STAT1-STAT2 se associa com IRF-9 dando origem ao heterotrímero ISGF3. Esse complexo se liga ao elemento de resposta a IFN (ISRE, *interferon-stimulated response element*) presente nos promotores da maior parte dos genes induzidos por IFN (ISGs). Acreditava-se que a formação de ISGF3 ocorresse no núcleo, porém estudos sugerem que isto possa ser coordenado no receptor. Nesse caso, em resposta à ativação do receptor, o fator co-transcricional CBP/p300 seria recrutado para a subunidade IFNAR2 e a acetilaria. A acetilação de IFNAR2 criaria um sítio de ligação para IRF-9 que, por

sua vez, também seria acetilado, assim como as STAT1 e STAT2 associadas ao receptor. A acetilação de IRF-9 é necessária para sua ligação ao DNA, e a acetilação das STATs favoreceria a formação do complexo ISGF3 (Tang et al., 2007). Embora não seja o componente principal da sinalização iniciada por IFNs tipo I, homodímeros de STAT1 também podem se formar (dando origem ao chamado complexo AAF) e ativar a transcrição de alguns genes (Decker et al., 1991).

O receptor para IFN- γ é composto pelas subunidades IFNGR1 e IFNGR2. Embora a subunidade 1 seja expressa constitutivamente em todas as células, a expressão de IFNGR2 é altamente regulada e muito mais restrita. Para uma resposta efetiva a IFN- γ são necessárias apenas as quinases JAK1 e JAK2 e a STAT1. STAT3 também pode se associar ao receptor e participar da sinalização, competindo com STAT1 pelo mesmo sítio de ligação, porém a associação de STAT1 é favorecida (Qing e Stark, 2004). Após a ativação de STAT1 por fosforilação, forma-se um homodímero que, após sua translocação para o núcleo se liga ao elemento GAS (*gamma-activation sequence*) presente no promotor de algumas ISGs estimulando a expressão das mesmas. No caso dos IFNs tipo III, as vias de sinalização iniciadas são as mesmas iniciadas pelos IFNs tipo I, porém utilizam um complexo receptor totalmente distinto (Uzé e Monneron, 2007; Zhou et al., 2007).

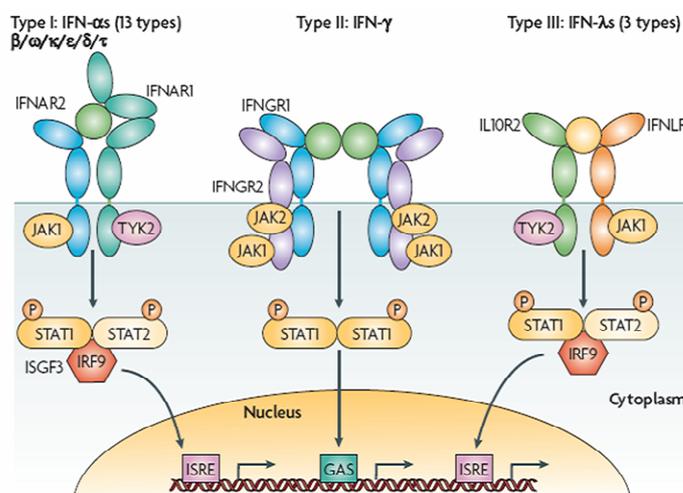


Figura 1: Complexos ligante-receptor gerados pela ligação de IFNs tipo I, II e III. Estão esquematizadas na figura as quinases (JAK1, JAK2 e Tyk2) associadas a cada cadeia de receptores (IFNAR1, IFNAR2, IFNGR1, IFNGR2, IL10R2 e IFNLR1), os principais complexos de ativação da transcrição (o heterotrímero composto de STA1/STAT2/IRF9, chamado ISGF3 e o homodímero de STAT1, chamado AAF) gerados pela sinalização em resposta a cada tipo de IFN e os elementos *cis* nos promotores de ISGs aos quais eles se ligam (ISRE e GAS) (Borden et al., 2007).

Vias de sinalização adicionais, capazes de influenciar o resultado da ativação transcricional induzida por IFN, também são ativadas. A atividade das JAKs não é suficiente para explicar todas as nuances da sinalização iniciada pelos IFNs. Diferenças tecido-específicas na ativação de proteínas quinases adicionais provavelmente contribuem para as diferentes respostas dos diversos tipos celulares ao tratamento com o mesmo IFN. Em alguns tipos celulares, a subunidade p85 de PI3K se encontra associada a IFNAR1. A ativação desta quinase leva a fosforilação do fator AKT e à expressão de CXCL1, uma importante quimiocina (Rani et al., 2002). PKC- δ também é ativada pela via PI3K (Kaur et al., 2005) e fosforila STAT1 em um resíduo serina (Uddin et al., 2002), o que facilita sua interação com a maquinaria de transcrição basal. A MAP quinase p38 também é ativada por IFNs tipo I e possui importante função na determinação do estado antiviral, embora a base molecular de seu efeito ainda não seja conhecida (Katsoulidis et al., 2005). Uma importante função da ativação de serina quinases como p38 e PKC em resposta a IFN é a fosforilação, direta ou indireta, de diversos fatores de transcrição (Platanias, 2005). Esses fatores, uma vez ativados, podem dirigir a ativação da expressão gênica de maneira independente de STATs, ou ainda de maneira cooperativa com esses fatores em determinados promotores. Assim, embora o heterotrímero STAT1-STAT2-IRF-9 seja o complexo clássico de ativação de ISGs através de sua ligação a ISRE, existem outros arranjos de fatores de transcrição capazes de desempenhar o mesmo papel, possivelmente apresentando função promotor-específica e com cinéticas de indução específicas (van Boxel-Dezaire et al., 2006) (Figura 2). Além disso, a exposição a diferentes citocinas, previamente à exposição a IFN, também desempenha papel na determinação da resposta gerada e, da mesma maneira, a exposição prévia a IFN altera a resposta gerada pela exposição a citocinas. Um bom exemplo é a exposição de macrófagos a IFN- γ , que altera a resposta à posterior exposição a IL-10 da ativação de STAT-3 para a ativação de STAT-1 (Hu et al., 2002).

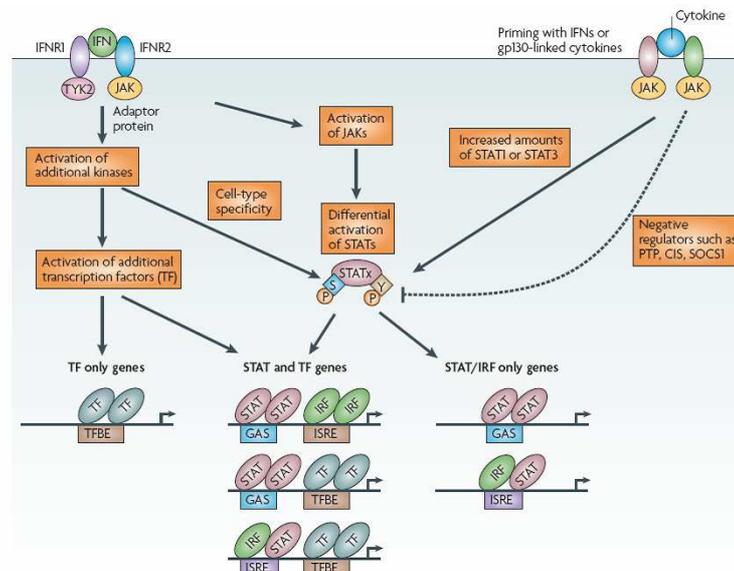


Figura 2: Esquema representando a complexidade da resposta a IFN. Em resposta a IFN, diferentes tipos celulares ativam diferentes JAKs, STATs e fatores de transcrição adicionais, levando à expressão de diferentes conjuntos de genes. O mesmo pode ocorrer dependendo da composição de citocinas presente no ambiente previamente a exposição à IFN (Borden et al., 2007).

1.1.3. Determinação do estado antiviral

Em resposta à via de sinalização iniciada pela ligação de IFNs tipo I aos seus receptores ocorre a expressão de um conjunto de centenas de genes (ISGs) que medeiam os efeitos biológicos dos IFNs, e dessa forma são os responsáveis pela geração do estado antiviral, sendo que para cada vírus um subgrupo de genes é, provavelmente, necessário para limitar a replicação (Randall e Goodbourn, 2008).

Algumas ISGs têm sido extensivamente estudadas e, nesses casos, já há uma quantidade considerável de informação a respeito de sua atividade e de como contribuem para a determinação do estado antiviral. Por outro lado, muitas ISGs ainda têm atividade completamente desconhecida. Um conhecimento mais profundo das ISGs envolvidas na determinação do estado antiviral é importante para tentar entender a interação entre os diferentes vírus e a resposta celular a IFN e, dessa forma, desenvolver novas estratégias para prevenção e terapia das infecções virais. No futuro, com a identificação de ISGs expressas consistentemente após a infecção com diferentes vírus e a determinação de suas atividades antivirais, pode ser possível manipular essa resposta influenciando o resultado de maneira favorável ao hospedeiro,

criando assim antivirais de ampla ação, efetivos contra diversos vírus, da mesma maneira que os antibióticos são efetivos contra diferentes espécies de bactérias (Katze et al., 2002; Weber e Haller, 2007).

Uma das ISGs mais estudadas é a proteína quinase dependente de dsRNA (PKR) (Roberts et al., 1976). Essa proteína é normalmente sintetizada em sua forma inativa e em resposta a dsRNA, produzido durante infecção viral, é ativada. Uma vez ativada, a PKR fosforila o fator de iniciação da tradução eIF2 α , o que resulta na formação de um complexo inativo composto de eIF2 α , GDP e o fator de reciclagem eIF2B. Isso causa uma inibição global da síntese proteica, o que bloqueia a replicação viral (Garcia et al., 2006). Além disso, a fosforilação de eIF2 α pode levar à ativação da autofagia, processo pelo qual todo conteúdo celular é degradado (Tallóczy et al., 2002). O envolvimento de PKR também tem sido identificado em outros mecanismos antivirais, incluindo a indução de apoptose (Gaddy e Lyles, 2007; Zhang e Samuel, 2007). Nesse sentido, a presença de dsRNA pode levar à formação de um complexo contendo FADD e procaspase-8, com a subsequente ativação desta última. PKR pode estar envolvida na formação desse complexo (Balachandran et al., 1998). Além disso, p53, que também é uma ISG, pode ser ativada indiretamente em resposta à infecção viral (Takaoka et al., 2003). O mecanismo que leva à ativação de p53 ainda é desconhecido, mas sabe-se que p53 pode ser fosforilada diretamente em resposta a PKR (Cuddihy et al., 1999).

Outra ISG bastante estudada é a 2'-5' oligoadenilato sintase (2'-5' OAS), que também é sintetizada em sua forma inativa e se torna ativada através da interação com dsRNA (Silverman, 2007). Essa enzima cataliza a síntese de oligoadenilatos a partir de ATP, sendo estas moléculas as responsáveis pela ativação de RNaseL, uma potente RNase que cliva regiões simples fita de RNAs virais e celulares, inibindo assim a replicação de diversos vírus (Floyd-Smith et al., 1981). A degradação de mRNAs e rRNAs celulares causa forte dano e pode levar também à apoptose (Castelli et al., 1997). Além disso, os produtos de degradação celulares ativam as helicases RIG-I e Mda5, dessa forma amplificando o sinal que leva à síntese de IFN- β (Malathi et al., 2007).

A família de genes Mx codifica para grandes GTPases com atividade antiviral contra uma grande variedade de vírus com material genético composto de RNA. Embora o mecanismo de ação exato ainda não seja conhecido, as proteínas dessa família agem através do reconhecimento

de estruturas de nucleocapsídeo, o que limita sua ação no interior da célula, restringindo a replicação viral (Pavlovic et al., 1995; Kochs et al., 2002; Haller et al., 2007).

Os corpos nucleares PML (*promyelocytic leukaemia*) são bastante heterogêneos em tamanho e composição, e conseqüentemente pouco caracterizados funcionalmente. Sabe-se que eles têm atividade nas repostas transcricionais ao *stress* e possivelmente regulam a estrutura da cromatina e, assim, a acessibilidade de promotores à maquinaria de transcrição. Esses corpos contêm, entre outras, as proteínas PML e Sp100, cuja expressão é induzida em resposta a IFN. A superexpressão de algumas isoformas da proteína PML impede a replicação de alguns vírus o que indica que esses corpos nucleares têm papel na resposta antiviral, embora os detalhes desse envolvimento ainda sejam desconhecidos (Everett e Chelbi-Alix, 2007).

Muitas das proteínas que fazem parte da via de indução de IFNs são elas mesmas ISGs, o que acaba criando dessa forma uma alça de *feedback* positivo. É o caso de IRF-7. Esse fator é fortemente induzido em resposta a IFN- β na primeira onda de induções de ISGs e é responsável pela indução de IFN- α na segunda onda de indução (Marié et al, 1998; Sato et al, 1998).

As proteínas APOBEC3F e APOBEC3G, assim como a proteína não relacionada TRIM5 α , têm sua expressão aumentada consistentemente em resposta a IFN (Asaoka et al., 2005; Bonvin et al., 2006; Sarkis et al., 2006; Sakuma et al., 2007; Ying et al., 2007) e demonstraram ter atividade antiviral para diversos retrovírus (Malim, 2006). No caso das APOBECs, o mecanismo de ação envolve a desaminação de citidinas, com conseqüente mutação do *template* além da inibição da reação de transcrição reversa, essencial para estes vírus. TRIM interage com os nucleocapsídeos dos vírus que entram na célula de forma que os torna não-infecciosos, em parte devido ao fato de serem encaminhados à destruição pelo proteassomo (Towers, 2007). ADAR1 (adenosina deaminase de RNA) faz parte de outra classe de enzimas responsáveis pela edição de RNA, também apresenta efeito antiviral e é superexpressa em resposta a IFN. Ela exerce sua atividade através da catálise da desaminação de adenosinas, gerando inosina, o que acaba gerando mutações no genoma de diversos retrovírus (Patterson et al., 1995).

O papel imunomodulatório dos IFNs tipo I se deve principalmente à expressão induzida por IFN das moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe I (MHC I), além de outros componentes da maquinaria de apresentação de antígenos (Epperson et al., 1992; Le Bon e Tough, 2002). Além disso, IFNs tipo I também auxiliam na ativação de células NK através da

estimulação da produção de perforinas e granzimas (Bolitho et al., 2007). Outras funções imunomodulatórias menos óbvias incluem a promoção da maturação de células dendríticas (Le Bon et al., 2003) e a estimulação da proliferação de células T CD8⁺ antígeno-específicas (Tough et al., 1996; Marrack et al., 1999; Kolumam et al., 2005; Le Bon et al., 2006). Eles também induzem a expressão de IL-15 por células apresentadoras de antígenos (APCs) e esta tem importante papel na estimulação da divisão das células T citotóxicas de memória (Surh et al., 2006; Boyman et al., 2007) e na manutenção da população de células NK (Nguyen et al., 2002).

O conhecimento do número de genes de expressão regulada por IFN tem aumentado muito recentemente, devido à contribuição de diversos estudos de alterações no padrão de expressão gênica em larga-escala. Esses genes foram sendo nomeados de acordo com a massa molecular da proteína identificada. Um dos genes cuja indução por IFN é mais significativa é o que codifica para a ISG15 (Kerscher et al., 2006). Essa proteína tem relação com a ubiquitina e, assim como ela, se torna ligada covalentemente a diversas proteínas, muitas delas com funções importantes na imunidade inata (JAK1, STAT1, PKR, MxA, RIG-I e IRF-3) (Malakhov et al., 2003; Zhao et al., 2005; Lu et al., 2006). A conjugação à ISG15 torna as proteínas mais estáveis contra degradação (Lu et al., 2006) e inibe a transcrição dependente de *cap* (Okumura et al., 2007). É provável que a função de ISG15 seja a de aumentar globalmente a resposta a IFN. Macrófagos com deleção no gene Ubp43, enzima responsável por desconjugar ISG15 dos substratos, apresentam maior intensidade e duração da resposta induzida por IFN (Zou et al., 2007). Outros genes também têm atraído atenção. É o caso da ISG54 e ISG56, proteínas relacionadas, fortemente induzidas por IFN, e que inibem a tradução através da interação com o complexo de iniciação da tradução eIF3 (Hui et al., 2003; Terenzi et al., 2005).

Conforme mencionado anteriormente, ainda há diversos genes com expressão aumentada em resposta a IFN cujas funções ainda são completamente desconhecidas e é possível que dentre eles alguns demonstrem ser mediadores críticos das atividades antivirais induzidas por IFN. Dessa maneira, como todas as funções biológicas dos IFNs são mediadas por ISGs, um estudo mais completo e detalhado da função dessas proteínas pode levar a terapias antivirais mais eficazes.

1.1.4. Mecanismos de evasão da resposta antiviral

Vírus não seriam patógenos bem sucedidos se não tivessem desenvolvido estratégias de escape que lhes permitisse lidar com o sistema IFN. Análises genéticas de diversos vírus têm revelado um número crescente de proteínas com atividade antagonista aos IFNs que têm como alvo praticamente todos os componentes do sistema IFN (Figura 3). Esses antagonistas interagem com diversos componentes virais e celulares envolvidos na regulação de diferentes funções na célula infectada (Haller et al., 2006).

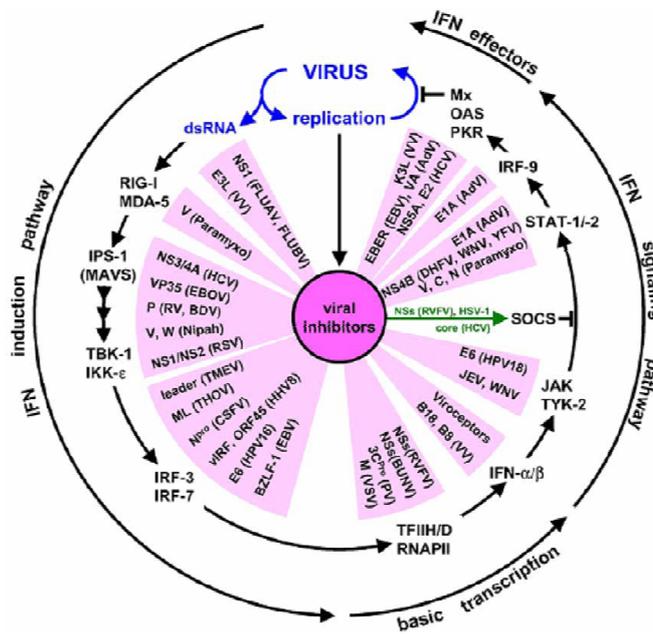


Figura 3: Exemplos de antagonistas virais da via do interferon. São conhecidos exemplos de proteínas virais que interferem com toda a via do interferon. As proteínas virais podem interferir com indução dos genes de interferon, com a transcrição celular global, com a sinalização iniciada em resposta à ligação dos IFNs aos receptores específicos na superfície celular, e por fim, com a atividade específica de ISGs (Haller et al., 2006).

Os antagonistas virais da resposta a IFN são frequentemente proteínas multi-funcionais e suas diferentes propriedades variam em importância em diferentes estágios do ciclo de replicação viral. Um exemplo é a proteína NS1 presente na maioria das linhagens de vírus *influenza A*. Essa proteína bloqueia a expressão gênica celular através de sua interferência com a estabilidade, processamento e exportação de mRNAs nucleares (Fortes et al., 1994; Chen et al., 1999; Noah et al., 2003; Satterly et al., 2007). Além disso, a proteína também inibe a via de regulação negativa da expressão de IFNs (Guo et al., 2007). Isso porque o vírus utiliza essa janela de indução da

expressão gênica para aumentar a expressão de genes celulares utilizados em benefício próprio, sendo também por esse motivo que a proteína NS1 ativa a quinase PI3K (Hale et al., 2006). A proteína NS1 também interage com dsRNA, sequestrando esse potente ativador de respostas antivirais (Lu et al., 1995), e interage com PKR bloqueando sua atividade (Langland et al., 2006). Assim, a afinidade de NS1 por cada um dos seus ligantes, sua localização subcelular e sua abundância influenciam suas propriedades biológicas em todas as fases do ciclo de replicação viral.

A inibição global da síntese proteica pode ser obtida por diversos mecanismos, tais como a inibição da transcrição, do processamento de mRNA e da tradução. A proteína NSs de *bunyamwera virus* (BUNV) inibe a transcrição bloqueando a atividade da RNA polimerase II (Thomas et al., 2004). Porém, embora a inibição global da expressão gênica apresente vantagens, tais como a inibição da produção de IFN e de ISGs, uma célula nessas condições morre rapidamente, o que limita o tempo disponível para o vírus se replicar. Possivelmente é devido a isso que se desenvolveram meios mais sutis de se lidar com a resposta a IFN.

Para minimizar a produção de IFN em resposta à infecção, é necessário manter a expressão de PAMPs em valores mínimos. Para isso diferentes vírus desenvolveram diferentes estratégias. Exemplos são os *poxvirus*, que limitaram a produção de dsRNA através da transcrição de genes em blocos, na mesma direção, e através da presença de diversos terminadores da transcrição em regiões intergênicas onde dois genes são transcritos de forma convergente (Smith et al., 1998). Já os *paramyxovirus* protegem as extremidades 5' de seus mRNAs do reconhecimento por RIG-I através da adição de *cap* aos mesmos. Já os retrovírus inserem seu material genético nos cromossomos do hospedeiro e então passam a utilizar a maquinaria do hospedeiro para replicação. Porém, pequenas quantidades de dsRNA são frequentemente produzidas como consequência da replicação de muitos vírus, e por isso muitos deles desenvolveram proteínas capazes de se ligar a esses produtos, impedindo que eles ativem a produção de IFN ou mesmo ISGs específicas. Exemplos são a proteína sigma A de reovírus aviários (Martínez-Costas et al., 2000), NSP3 de rotavírus (Langland et al., 1994), a proteína E3L de vaccinia vírus (VACV) (Chang et al., 1992), US11 de herpesvírus (HSV-1) e a proteína VP35 do vírus Ebola (EBOV) (Feng et al., 2007). Ainda há exemplos de proteínas virais interferindo especificamente na maioria dos pontos das vias de sinalização que levam à expressão de IFN. A

proteína NS3/4a do vírus da hepatite C (HCV) cliva a proteína adaptadora TRIF, bloqueando a sinalização via TLR3 (Li et al., 2005). Outros vírus bloqueiam essa via através da inibição de fatores mais abaixo na via de sinalização. É o caso de RABV (*rabies simplex virus*) e MeV (*measles virus*) que inibem TBK e IRF-3 (Schlender et al., 2005). Já a proteína N^{pro} de BVDV (*bovine viral diarrhea virus*) e de CSFV (*classical swine fever virus*) bloqueia a indução de IFN através do endereçamento de IRF-3 para degradação via proteassomo (Hilton et al., 2006). A proteína ICP0 de HSV-1 inibe IRF-3 através de seu recrutamento em conjunto com CBP/p300 para estruturas nucleares distantes da cromatina do hospedeiro (Melroe et al., 2007). O vírus HHV-8 (*human herpesvirus-8*) produz ortólogos de IRF, como a vIRF3, que interage com IRF-7 interferindo tanto com a ativação da expressão de IFNs como a de ISGs (Joo et al., 2007).

Há diversas vantagens associadas ao bloqueio da sinalização em resposta a IFN. Através dessa estratégia, não apenas a expressão de ISGs é inibida, mas também a expressão de moléculas de MHC de classe I, de forma que as células se tornam menos susceptíveis à morte citotóxica mediada por CTLs (*cytotoxic T lymphocytes*). Além disso, como existem muitos fatores comuns entre as vias de sinalização ativadas em resposta aos IFNs tipo I, II e III, é possível aos vírus bloquear múltiplas vias simultaneamente. A diversidade de mecanismos desenvolvidos pelos vírus para bloquear a sinalização em resposta a IFN é enorme. VACV codifica para um receptor solúvel de IFN- α/β (Alcamí et al., 2000). As proteínas K3 e K5 de HHV-8 regulam negativamente a atividade de IFNGR1 através da indução de sua ubiquitinação, endocitose e degradação (Li et al., 2007). HCMV (*human cytomegalovirus*) inibe a via de resposta a IFN pela diminuição nos níveis de JAK1 e IRF-9 através de um mecanismo que envolve o proteassomo (Miller et al., 1998) e, paralelamente através da proteína IE1 (*immediate-early 1*) que sequestra as STATs 1 e 2 (Paulus et al., 2006). A proteína P de RABV interage com STAT1 e STAT2, formando um complexo inativo (Brzózka et al., 2005). A proteína 16 E7 de HPV (*human papillomavirus*) interage diretamente com IRF-9, impedindo a formação do complexo ISGF3 e assim a ativação de ISGs (Barnard e McMillan, 1999). Proteínas do core de HCV interferem com a sinalização via IRF-1, um fator de transcrição responsável pela indução prolongada de ISGs (Ciccaglione et al., 2007).

Os vírus também evadem a resposta iniciada em resposta a IFN através da inibição direta da atividade de ISGs específicas. Um mecanismo bastante utilizado é o sequestro de

dsRNA, que inibe a ativação de diversas ISGs, como PKR, OAS e ADAR1. Como PKR também pode ser ativada por PACT (proteína ativadora de PKR) por uma via independente de dsRNA, diversos vírus desenvolveram maneiras de inativá-la diretamente. Uma das estratégias utilizadas nesse sentido consiste na produção de pequenas moléculas de RNA, altamente estruturadas, que inibem a dimerização de PKR pela ligação a dsRNA e dessa forma sua ativação. Exemplos são o VA-RNA de AdVs (*adenovirus*) e a IRES (*internal ribosome entry sequence*) de HCV. Outros vírus codificam proteínas que se ligam diretamente a PKR inibindo sua atividade. É o caso das proteínas E2 e NS5A de HCV, US11 de HSV-1, a vIRF-2 de HHV-8 e a proteína E3 de VACV. Já as proteínas Tat de HIV e K3L de VACV funcionam como pseudosubstratos de PKR inibindo de maneira competitiva sua atividade. A proteína NS1 do vírus *influenza* induz a expressão de p58^{IPK}, um inibidor celular da atividade de PKR (Langland et al., 2006). Outras ISGs também são alvos frequentes dos antagonistas virais. A proteína NS1 de influenzavírus também é capaz de se ligar a ISG15, impedindo que ela seja conjugada a seus substratos (Yuan e Krug, 2001). Embora a função dos corpos nucleares PML (*promyelocitic leukemia*) na determinação do estado antiviral ainda seja pouco conhecida eles são alvo de diversas proteínas virais. Um exemplo é a proteína ICP0 de HSV-1, que através de sua atividade de E3 ligase induz a degradação da proteína PML (Hagglund e Roizman, 2004). No caso das APOBECs, a proteína *vif* de HIV causa sua ubiquitinação e consequente degradação proteossômica (Malim, 2006).

À medida que se acumulam dados a respeito dos mecanismos moleculares utilizados pelos IFNs para combater as infecções, os mecanismos utilizados pelos vírus para bloquear essas respostas, e ao mesmo tempo, se expande o conhecimento das inter-relações entre a resposta de IFN e outros mecanismos de defesa do hospedeiro e ainda, de que forma os vírus se adaptaram para usar a programação da resposta de IFN em benefício próprio, será possível aplicar todo esse conhecimento de forma a desenvolver métodos de controle de infecções mais efetivos. Para isso é essencial que novas vias sejam estudadas, como por exemplo, as executadas por ISGs cujas funções ainda permanecem inteiramente desconhecidas.

1.2. KIAA0082/ISG95

Uma ampla revisão das publicações referentes à análise da expressão gênica em resposta a infecção viral (Su et al., 2002; Guerra et al., 2003), ou ainda, ao tratamento com IFN (Geiss et al., 2003) permitiu a identificação da proteína KIAA0082/ISG95 (ainda não caracterizada) sendo superexpressa em conjunto com diversas ISGs.

KIAA0082/ISG95 foi inicialmente identificada durante o estudo da resposta genômica do hospedeiro frente à infecção por HCV (*hepatitis C virus*) (Su et al., 2002). Esse estudo foi realizado através da comparação entre três chimpanzés que apresentavam diferentes respostas à infecção por HCV. Num deles havia a efetiva eliminação do vírus do organismo (SC), no outro a infecção era controlada, mas persistente (TC), e no terceiro a infecção era generalizada (PS). No intuito de tentar determinar o conjunto de genes cuja expressão reflete a resposta celular inicial a HCV, foram identificados genes cuja expressão se relacionava intimamente com a quantidade de RNA de HCV no soro de todos os três animais durante todo o período examinado. Foram identificados 27 transcritos nessa análise, a maior parte deles sabidamente induzidos por IFN- α , tais como OAS1, OAS2, OAS L, Mx1, STAT1, ISG15 e Sp100. Dentre esses 27 transcritos, que refletem a resposta celular inicial à infecção, encontra-se KIAA0082/ISG95. Porém, embora esses genes demonstrem a ativação da resposta de IFN à infecção por HCV, eles parecem não ter correlação com o prognóstico da infecção. Os genes cuja expressão é relacionada à erradicação da infecção, foram identificados como aqueles induzidos durante o declínio da viremia em SC/TC mas não em PS. Nesse conjunto também foram identificados 27 genes, porém sendo a maioria deles induzidos por IFN- γ , estando relacionados à erradicação da viremia já que sabidamente possuem papel na ativação do sistema imune, recrutamento de L_T (linfócito T) e processamento e apresentação de antígenos (Su et al., 2002).

A indução da expressão de KIAA0082/ISG95 foi identificada também num trabalho de análise da alteração do padrão de expressão gênica em resposta à infecção por vírus vaccinia (VACV) (Guerra et al., 2003). Esse estudo demonstrou que 90% dos genes têm expressão inibida 16 horas após a infecção. Não foi possível estabelecer se essa inibição global do conteúdo de mRNA em células infectadas decorre de uma repressão geral da transcrição ou de um aumento nas taxas de degradação de mRNAs. Porém, de acordo com a cinética apresentada, os genes cuja expressão foi alterada pela infecção com VACV foram classificados em 7 grupos.

KIAA0082/ISG95 faz parte de um conjunto de 24 genes induzidos no início da infecção, porém retornando a níveis de expressão basais 16 horas após a infecção. Apenas 37 genes tiveram indução da expressão mantida durante todo o período estudado, ou seja, até 16 horas após a infecção. O fato de que os níveis de alguns mRNAs específicos terem sido, mesmo que temporariamente, aumentados durante a infecção por VACV pode ser devido a uma resposta geral da célula a situações de *stress* ou pode ser uma resposta mais específica da célula à infecção por VACV. Os resultados apresentados indicam que a indução de *KIAA0082/ISG95* faz parte de uma resposta celular à infecção, já que seu nível de expressão se altera à medida que a infecção procede, embora não se possa dizer, se essa resposta é ou não específica, ou mesmo em que aspecto do metabolismo celular ela está envolvida.

A análise da expressão gênica induzida por IFN- α/β e de sua atenuação parcial pela proteína NS5 de HCV (Geiss et al., 2003) também identificou o gene *KIAA0082/ISG95*. O vírus da hepatite C é resistente ao tratamento com IFN- α/β , e especula-se que isso esteja relacionado a NS5A, já que em alguns casos mutações na região ISDR (*IFN sensitivity determining region*) se correlacionam com o prognóstico da doença. Nesse trabalho foram analisadas as diferenças na expressão gênica induzidas após 16 horas de tratamento com IFN- α/β em diferentes linhagens celulares, dentre elas células HeLa, células Huh7 (que contém o *replicon* de HCV), células HH2 (uma linhagem de hepatócitos humanos imortalizada) e por fim uma cultura primária de hepatócitos fetais humanos. O período de 16 horas de tratamento foi escolhido para as análises por ter sido aquele no qual o maior número de alterações na expressão gênica foi observado, embora algumas dessas mudanças possam se dever a efeitos secundários do IFN ou a fatores como a estabilidade diferencial de mRNAs. Nesse estudo *KIAA0082/ISG95* aparece fazendo parte de um conjunto de genes cuja expressão foi significativamente induzida nos quatro tipos celulares pelo tratamento com IFN- α/β , dentre eles ISGF3, Mx1, Mx2, MyD88, ADAR, sp100 e STAT1, ISGs com atividade antiviral descrita. Esse conjunto de genes representa provavelmente a resposta principal a IFN, conservada entre os tipos celulares. A expressão de NS5A não alterou o padrão de expressão de *KIAA0082/ISG95* embora tenha sido demonstrado nesse trabalho que a habilidade do IFN- α/β de induzir a transcrição dependente de ISRE é parcialmente bloqueada na presença de NS5A.

A expressão de KIAA0082/ISG95 também demonstrou ser alterada pelo tratamento de células mononucleadas de sangue periférico (PBMC) com oligodesoxinucleotídeos CpG (CpG ODN) (Kato et al., 2003). Os CpG ODN são reconhecidos pelo sistema imune inato, através do receptor TLR-9, como PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*), devido ao fato de serem compostos por motivos CpG não-metilados, infrequentes no DNA eucariótico. O objetivo do estudo era identificar genes cuja expressão pudesse indicar os mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos positivos observados durante a administração de CpG ODN como adjuvante em respostas imunes do tipo Th1. No trabalho em questão, após o tratamento com CpG ODN, observou-se a super-expressão de 77 genes, classificados em dois sub-grupos de acordo com a cinética de indução. No primeiro grupo, induzido de 3 a 6 horas após o tratamento, estavam contidos principalmente genes de citocinas inflamatórias. Porém, a indução desses genes em resposta a LPS (lipopolissacarídeo) é muito mais intensa e prolongada, o que indica que não são eles os responsáveis pelos efeitos do tratamento com CpG ODN. No segundo grupo, do qual KIAA0082/ISG95 faz parte, a indução ocorre de 6 a 24 horas após o tratamento. Esse grupo é composto principalmente por proteínas antivirais e antitumor induzidas por IFN e para alguns desses genes demonstrou-se que a indução da expressão é mediada diretamente pela ligação de IFNs tipo I a seu receptor, embora a indução de IFNs tipo I tenha ficado abaixo dos níveis detectáveis pelo sistema DNA *microarray* e Elisa, porém tendo sido possível a detecção de baixos níveis de IFN- α 2 através de RT-PCR. Esse resultado demonstra que o efeito de CpG ODN é, ao menos em parte, mediado por uma via dependente do receptor de IFN, na presença de níveis bastante baixos de IFN tipo I. Esse trabalho descreve a superexpressão de KIAA0082/ISG95 em conjunto com ISGs, numa via dependente de IFN, seguindo no mesmo sentido dos anteriormente apresentados (Su et al., 2002; Guerra et al., 2003; Geiss et al., 2003).

Em 2005, Einav e colaboradores re-analisaram dados de microarranjo anteriormente publicados através de um novo método estatístico e identificaram um conjunto de genes cujo padrão de expressão permite diferenciar uma porcentagem das amostras de leucemia infantil (ALL - *acute lymphoblastic leukemia*) e alguns tipos de cânceres. Trinta genes foram identificados, dentre eles KIAA0082/ISG95. Dezesete deles são ISGs nunca anteriormente relacionados à leucemia, tais como STAT1, IRF-7, OAS1, OAS2, ADAR, ISGF3, Sp100 e APOBEC3G. Além disso, enzimas conjugadoras de ubiquitina, como E2L6 e E2A e

componentes do sistema proteossomo também foram identificados. Estes estão envolvidos com a geração de peptídeos antigênicos apresentados às células T CD8⁺ via MHC classe I. Assim, foram identificados diversos genes relevantes no contexto de uma resposta imunológica, sugerindo um possível papel desempenhado por um agente infeccioso, provavelmente um vírus, no desenvolvimento de leucemias e outros tipos de cânceres. A expressão diferencial desses genes foi identificada em aproximadamente 10% das amostras de leucemia, 40% das amostras de câncer de mama e 20% das amostras de câncer de ovário. Há hipóteses sobre a etiologia infecciosa das leucemias linfoblásticas agudas (ALLs). A teoria de Kinlen (1995) sugere que a mobilidade e mistura de populações resultaria na infecção de indivíduos susceptíveis não previamente expostos, e que disso resultariam os aumentos transitórios nos casos de leucemia em determinadas regiões geográficas. Uma hipótese alternativa (Greaves e Alexander, 1993) sugere que alguns casos de leucemia, principalmente os do subtipo com um precursor de células B comum (cALL), estariam associados com a falta de exposição a agentes infecciosos na infância, o que resultaria numa falha na modulação do sistema imune e contribuiria para o desenvolvimento da leucemia. O desenvolvimento de leucemias cALL frequentemente se inicia com translocações e não-disjunções que ocorrem no período pré-natal, porém requerem um segundo estímulo para levarem à leucemia. Sugere-se que uma resposta desregulada à infecção forneceria *stress* proliferativo ou mesmo apoptótico à medula óssea, consistindo assim no segundo e decisivo estímulo ao desenvolvimento da doença. No caso das amostras de câncer de mama e ovário identificados superexpressando esse conjunto de genes, também há estudos epidemiológicos que sugerem um papel infeccioso no seu desenvolvimento. Além disso, foram identificadas sequências relacionadas às de MMTV (*mouse mammary tumor virus*) em 40% das amostras de câncer de mama, frequência bastante similar à encontrada superexpressando o *cluster* de ISGs identificado nesse trabalho. Porém, também é possível que, no caso dos tumores sólidos, a expressão dessas ISGs esteja associada ao nível de inflamação dos tumores, sendo um efeito do IFN secretado por células do sistema imune em resposta ao tumor. A porcentagem de amostras leucêmicas super-expressando os marcadores é minoria (10%), o que poderia indicar que a infecção é apenas um dos fatores causativos (2º evento) para o desenvolvimento das LLAs. Por outro lado também poderia indicar um papel indireto da infecção, de forma que o agente infeccioso contribuiria de maneira transiente para o surgimento da doença, não havendo vestígios

na diagnose. Há ainda a possibilidade de que diferentes populações possuam diferentes níveis de contribuição das infecções para o desenvolvimento da doença.

Outro trabalho onde se observa a superexpressão de KIAA0082/ISG95 analisou as diferenças na expressão gênica entre células T CD8⁺ *naive*, ativadas e de memória (Holmes et al., 2005). Esse trabalho focou em genes com expressão alterada nos três tipos celulares, e portanto não inclui genes com expressão similar entre dois tipos celulares e com expressão alterada em apenas um dos tipos. KIAA0082/ISG95 faz parte de um conjunto de genes com expressão aumentada em células ativadas, intermediária em células de memória e diminuída em células *naive*. Esse conjunto de genes não é composto por ISGs especialmente, embora APOBEC3B seja um dos genes com padrão de expressão similar ao de KIAA0082/ISG95 nos três tipos celulares. Porém, embora nesse estudo KIAA0082/ISG95 não tenha expressão associada a ISGs, sua expressão se associa à determinação de linhagens de linfócitos T, o que a mantém associada ao estabelecimento da resposta imunológica.

A proteína KIAA0082/ISG95 possui 835 aminoácidos e massa molecular aproximada de 95 kDa. A análise de sua sequência primária, através da ferramenta SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), evidencia a existência de quatro domínios (Figura 4). O primeiro domínio identificado, o domínio “G patch” (aminoácidos 85 a 131), é rico em glicina, sendo encontrado principalmente em proteínas de ligação a RNA, o que sugere sua possível função na ligação a ribonucleotídeos. O segundo domínio identificado (aminoácidos 252 a 451), FtsJ, tem função de metiltransferase e utiliza como co-fator S-adenosilmetionina, tendo normalmente como substrato em *E. coli* o rRNA 23S. Esse é um domínio de metiltransferase distinto do normalmente encontrado em enzimas dessa classe em humanos. O terceiro domínio (aminoácidos 591 a 725) indica que essa proteína pertence à família de DNA ligases e enzimas de capping de RNA, por homologia aos domínios catalíticos encontrados nessa família. O quarto domínio (aminoácidos 753 a 786) é o chamado WW. Este domínio liga peptídios ricos em prolina e se constitui como uma curta região conservada, encontrada numa variedade de proteínas não-relacionadas, estando frequentemente associado a outros domínios típicos de proteínas envolvidas em processos de transdução de sinal. A presença desse domínio indica uma possível rede de interações protéicas importante para a função de KIAA0082/ISG95. Há ainda um sinal de localização nuclear na extremidade N-terminal da proteína.

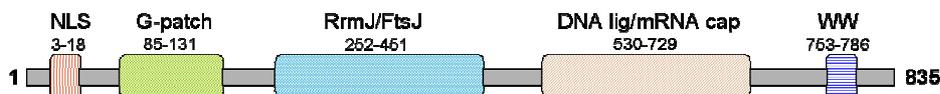


Figura 4: Representação esquemática dos domínios identificados em KIAA0082/ISG95.

Uma busca no site Homologene do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=homologene>) demonstra que *KIAA0082/ISG95* possui homólogos em diversas espécies, com altas taxas de conservação na sequência de aminoácidos entre elas (Quadro 1).

Quadro 1: Homólogos de KIAA0082/ISG95 em diferentes espécies, com as taxas de identidade de sequência de DNA e de aminoácidos.

Gene		Identidade (%)	
Espécies	Símbolo	Proteína	DNA
Homo sapiens	KIAA0082		
vs. <i>Pan troglodytes</i>	LOC471998	100.0	99.8
vs. <i>Canis lupus familiaris</i>	LOC481775	92.6	88.8
vs. <i>Bos taurus</i>	LOC509620	95.1	91.2
vs. <i>Mus musculus</i>	1300018I05Rik	90.4	87.3
vs. <i>Rattus norvegicus</i>	RGD1307801	90.3	86.7
vs. <i>Gallus gallus</i>	KIAA0082	84.8	76.9
vs. <i>Danio rerio</i>	zgc:55336	72.1	67.6
vs. <i>Drosophila melanogaster</i>	CG6379	40.3	49.7
vs. <i>Anopheles gambiae</i>	AgaP_AGAP000826	44.2	53.5
vs. <i>Caenorhabditis elegans</i>	Y53F4B.13	40.8	50.9

Com base nos domínios identificados, propôs-se que KIAA0082/ISG95 seja uma proteína envolvida no processamento de mRNA, assunto de interesse em nosso laboratório. Além disso, os dados de expressão indicam que ISG95 responde à infecção viral, de forma que a análise de sua atividade poderia levar à identificação de novas relações entre a maturação de pré-mRNAs e a resposta à infecção, sendo dessa forma um interessante alvo de estudo. Assim, o objetivo de nosso trabalho foi a caracterização da função de ISG95, sendo que as hipóteses investigadas durante o decorrer do projeto foram a de uma função relacionada ao *capping* de mRNAs inicialmente e, posteriormente, ao *splicing*. Cada um desses mecanismos será analisado com mais detalhes a seguir.

1.3. *Capping* de pré-mRNA

O *capping* de pré-mRNAs desempenha diversas funções celulares. No núcleo essa estrutura interage com o complexo CBP (*cap-binding complex*) e, através dessa interação, estimula processos subsequentes de maturação do pré-mRNA, como *splicing* e formação da estrutura 3' (cauda poly-A). No citoplasma o *cap* é responsável pelo recrutamento de ribossomos, através de sua interação com o fator eIF4F. Além disso, também protege os mRNAs da degradação pela ação de 5'-3' exonucleases (Cougot et al., 2004).

O *capping* de pré-mRNAs celulares é específico para transcritos sintetizados pela RNA polimerase II. Essa especificidade é alcançada pela interação física de um ou mais componentes do aparato de *capping* ao CTD (*C-terminal domain*) fosforilado da subunidade maior da RNA polimerase II (Chiu et al., 2001). O CTD é um domínio único, encontrado apenas na RNA polimerase II e consiste de repetições do heptapeptídeo consenso Y1-S2-P3-T4-S5-P6-S7. O número de repetições depende da espécie, sendo 26 em leveduras e 52 em humanos. O CTD forma uma extensão em forma de cauda a partir do núcleo catalítico da polimerase, próximo ao poro de saída do RNA recém-sintetizado. A ligação de fatores de processamento específicos ao CTD depende do padrão de fosforilação do domínio, que se altera durante o ciclo de transcrição, coordenando eventos na biogênese de mRNAs. Embora haja cinco sítios de fosforilação potenciais, os sítios S2 e S5 são os alvos principais. A fosforilação de S5, catalisada pela quinase TFIIF e pelo complexo *Mediator*, é mais comum em regiões próximas a promotores, durante a iniciação da transcrição, e recruta enzimas de *capping*, enquanto que a fosforilação em resíduos S2, catalisada pela quinase P-TEFb, é mais frequente em regiões distais, durante a elongação da transcrição, levando ao recrutamento de enzimas da maquinaria de processamento 3' (Meinhart et al., 2005; Hirose e Ohkuma, 2007).

O processo de *capping* de mRNAs eucarióticos ocorre numa sequência de três reações enzimáticas, iniciadas pela clivagem da extremidade 5'-trifosfato do pré-mRNA pela ação de uma RNA trifosfatase. Durante o segundo passo, a RNA guanililtransferase inicialmente forma um complexo covalente enzima-GMP e em seguida transfere o GMP à extremidade difosfato do pré-mRNA, através de uma ligação 5'-5' trifosfato não-usual. O *cap* é então metilado na posição N7 da guanina por uma RNA (guanina-7) metiltransferase, dando origem à estrutura m⁷GpppN, conhecida também como *cap0* (Figura 5). A enzima de *capping* de mamíferos, Mce1, é um

polipeptídeo bifuncional com atividades de RNA trifosfatase (em seu N-terminal) e guanililtransferase (em seu C-terminal), e se liga apenas ao CTD fosforilado (Chiu et al., 2001). Em levedura três enzimas estão envolvidas na formação de *cap*, a guanililtransferase Ceg1p, a trifosfatase Cet1p e a metiltransferase Abd1p. Apenas Ceg1p e Abd1p interagem diretamente com o CTD fosforilado, sendo Cet1p recrutada por sua interação com Ceg1 (Cho et al., 1998).

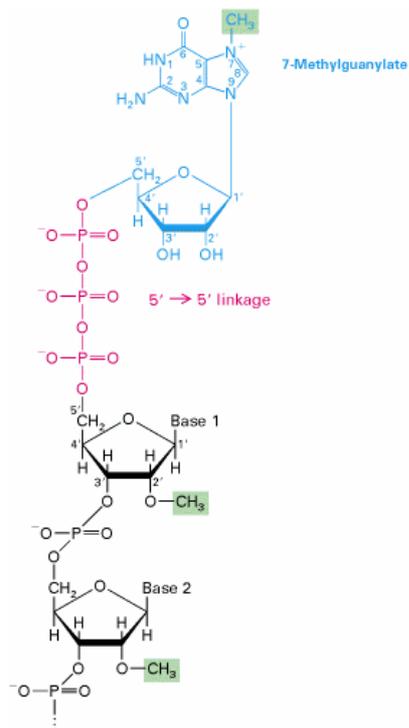


Figura 5: Esquema da estrutura do *cap* de mRNA. Em preto estão os dois últimos ribonucleotídeos do mRNA. Em azul o *cap* de GMP, ligado ao mRNA através de uma ligação trifosfato 5'-5' não usual (em rosa). O *cap* de GMP é metilado na posição N7 da guanina. (Lodish et al., 1999).

As RNA guanililtransferases celulares e virais fazem parte de uma mesma superfamília da qual também fazem parte DNA ligases NAD^+ -dependentes e RNA ligases ATP-dependentes e a análise da estrutura de cinco dos seus membros permitiu a identificação de uma organização comum (Sawaya e Shuman, 2003), que consiste de um domínio N-terminal de nucleotídeo transferase e um domínio C-terminal composto de um tipo estrutural especial chamado OB (um barril de cinco fitas beta anti-paralelas). O domínio N-terminal possui cinco sub-domínios (I, III, IIIa, IV e V), conservados em sua ordem, e que definem a superfamília de polinucleotídeo ligase/enzimas de *capping* de mRNA, presente também em KIAA0082/ISG95. O domínio OB

das enzimas de *capping* de RNA e das RNA e DNA ligases possui também um sub-domínio, chamado VI. O sub-domínio I (KxDG) contém o nucleófilo lisina ao qual o GMP e o AMP se tornam covalentemente ligados no primeiro passo das reações de *capping* e ligação, respectivamente.

Durante a infecção viral, o RNA viral deve ser endereçado à maquinaria de tradução da célula hospedeira. Para isso, os vírus desenvolveram enzimas de *capping* ou proteínas que de alguma forma estimulam a formação do *capping*, catalisada pelas enzimas celulares no RNA viral. Tat é uma pequena proteína codificada pelo genoma do HIV que se liga especificamente a um elemento de RNA estruturado, o TAR, localizado na extremidade 5' nascente dos transcritos virais (Chiu et al., 2001). Através de uma interação física direta, ela estimula atividades de guanililtransferase e trifosfatase de MceI, aumentando dessa forma a eficiência de formação de *cap* em RNAs definidos, nesse caso os resultantes da transcrição do genoma de HIV-I.

Há diversos estudos sobre as proteínas de *capping* codificadas por vírus. No caso do vírus vaccinia (Yu et al., 1997), os três passos da formação de *capping* nos mRNAs virais são catalisados por um heterodímero codificado pelo genoma viral, composto de subunidades de 95 kDa (codificada pelo gene D1) e 33 kDa (codificada por D12). A região aminoterminal da subunidade D1 catalisa as reações de trifosfatase e guanililtransferase. A reação de metiltransferase é catalisada por um domínio que consiste da porção C-terminal de D1 juntamente com D12.

Em reovírus, todas as enzimas necessárias para a formação de *cap* são codificadas pelo genoma viral já que se demonstrou que o *core* é capaz de gerar RNAs com *cap in vitro*. O *cap* gerado é do tipo 1 e para sua síntese são necessárias duas atividades de metiltransferase, a de (guanósina-7N)-metiltransferase e a de (guanósina-2'-O)-metiltransferase, que ao final do processo dão origem à estrutura $m^7GpppGm2'OpC(pN)n-OH$. Com base em análise de sequência primária, estudos de UV-*crosslinking*, de mutagênese sítio-dirigida e da resolução da estrutura tridimensional do *core* de reovirus, identificou-se dois domínios com similaridade a metiltransferases, embora a proteína purificada não demonstre a atividade de metiltransferase prevista, o que se atribui a uma falha na determinação de sua estrutura quaternária (Bujnicki e Rychlewski, 2001).

O vírus da hepatite E (HEV) possui como material genético RNA de polaridade positiva, com um *cap* m⁷GTP em sua extremidade 5'. A análise da seqüência da ORF1 do vírus revelou em sua região N-terminal a presença de um domínio com similaridade a metiltransferases, dentre outros. O fragmento codificado pelo N-terminal da ORF1, chamado P110, expresso em células de inseto, catalisa uma reação de adição de *cap* distinta das normalmente realizadas nas células eucarióticas (Magden et al., 2001). A P110 de HEV, assim como a nsP1 de TMV (*tobacco mosaic virus*), a P126 de BMV (*brome mosaic virus*) e a proteína 1a de BaMV (*bamboo mosaic virus*), todos alphavírus, ao invés de metilar o mRNA já contendo o *cap*, metila o GTP, gerando m⁷GTP, que então reage com a enzima para gerar o intermediário covalentemente ligado m⁷GTP-enzima. Assim, a enzima viral é específica para pequenos substratos aceptores, ao contrário da enzima celular, que metila apenas oligonucleotídios longos contendo o *cap* GpppN.

O vírus *influenza* utiliza uma via única para a formação de mRNAs virais com *cap* (Lamb e Krug, 2001). A RNA polimerase viral, constituída de três subunidades (PA, PB1 e PB2) se liga ao *cap* dos mRNAs celulares através da subunidade PB2. Em seguida, através de sua atividade endonuclease associada à subunidade PB1, cliva o mRNA celular liberando oligonucleotídeos (9-15 nts) contendo *cap*. Esses oligonucleotídios com *cap* são então utilizados como *primers* para a iniciação da transcrição viral. As moléculas de mRNA viral carregam então o *cap* e uma curta seqüência derivada do hospedeiro em sua extremidade 5', o que garante eficiente exportação nuclear, iniciação da tradução e síntese da proteína viral no citoplasma. Assim, a atividade endonuclease *cap* dependente é essencial para a replicação do vírus, e a ligação de PB2 ao *cap* de mRNAs celulares constitui o primeiro passo na síntese de mRNAs virais. Em 2003 Hooker e colaboradores compararam as propriedades de ligação ao *cap* da proteína PB2, codificada pelo vírus *influenza*, e de eIF4E, um fator de tradução humano no intuito de desenvolver um inibidor específico de PB2. Eles observaram que a contribuição dos grupos fosfato na afinidade de ligação difere entre essas duas proteínas. A remoção de grupos fosfato, originando m⁷GDP e m⁷GMP, causou uma perda de afinidade de ligação maior para eIF4E que para PB2. A perda da carga negativa na guanina, que ocorre em GTP em comparação a m⁷GTP, teve um efeito menor na afinidade de ligação de PB2 em comparação a eIF4E. Adicionalmente a substituição da ribose por um açúcar acíclico na estrutura da guanina aumentou a afinidade por PB2. Assim, a ausência de carga negativa gerou uma maior seletividade por PB2 e a substituição da ribose por um açúcar

acíclico aumentou a potência e a seletividade da interação com PB2. Com base nesses dados foi possível desenvolver um composto, chamado RO0794238, que inibe especificamente a ligação de PB2 ao *cap* (Hooker et al., 2003).

Todos esses estudos sobre proteínas de *capping* virais demonstram que esse é um processo celular extremamente importante e que os vírus desenvolveram diversos mecanismos para promover a formação do *cap* em seus mRNAs. O fato de KIAA0082/ISG95 ser superexpressa em resposta à infecção e ao tratamento com IFNs e de possuir domínios de ligação à RNA, de metiltransferase e de proteínas da família *capping*/DNA ligase, gerou a hipótese de que, dentro da função geral proposta para KIAA0082/ISG95, relacionada ao processamento de pré-mRNAs, sua atividade poderia estar associada especificamente ao *capping* de pré-mRNAs. Assim, essa foi uma das hipóteses desenvolvidas para determinação da função biológica de KIAA0082/ISG95.

1.4. Splicing de pré-mRNA

A maior parte das sequências codificadoras (*exons*) de proteína presentes nos transcritos da RNA polimerase II nos eucariotos superiores é interrompida por sequências não-codificadoras, chamadas *introns*, que devem ser eficientemente eliminados do pré-mRNA no processo denominado *splicing*. Erros no processo de reconhecimento e remoção de *introns*, ou seja, no *splicing*, acarretam alteração na mensagem genética, o que pode ter efeitos danosos para a célula. Em concordância com esse papel fundamental, o *spliceossomo*, ou seja, o complexo celular que executa a reação de *splicing*, é uma das maiores e mais sofisticadas maquinarias celulares, sendo composta por mais de trezentas diferentes proteínas e cinco pequenas moléculas de RNA (snRNA U1, U2, U4, U5 e U6) (Valadkhan, 2007; Chen et al., 2007). Tanto os snRNA quanto as proteínas que constituem o complexo de *splicing* interagem com sequências específicas na interface *exon/intron* no sentido de direcionar a retirada dos *introns* e a religação dos *exons* nessas regiões, denominadas sítios de *splicing* (ss). Além disso, snRNAs interagem entre si para garantir a correta justaposição de sequências distantes no substrato, necessárias para a catálise. Um ponto crítico durante o *splicing* é o reconhecimento dos sítios de *splicing* 5' (5'ss) e 3' (3'ss). Embora o 5'ss seja definido por um único elemento de oito nucleotídeos, o 3'ss é definido por três sequências, normalmente contidas num intervalo de 40 nucleotídeos *upstream* ao sítio de

splicing 3'. Essas sequências são a sequência *branch-point*, o trato de polipirimidina e a junção *exon/3' intron* (Reed, 1996; Hertel, 2008).

O *splicing* é realizado através de duas reações de transesterificação consecutivas (Patel e Steitz, 2003). No primeiro passo, o radical 2'-hidroxil de um resíduo de adenosina conservado, chamado *branch site adenosine*, executa um ataque nucleofílico na extremidade *upstream* do *intron*, o sítio de *splicing* 5'. O resultado dessa reação é a liberação da sequência codificadora (*exon*) *upstream* e a formação da estrutura *lariat* no *intron*. O grupo 3' hidroxil do *exon* recém liberado executa então um ataque nucleofílico na extremidade *downstream* do *intron*, o sítio de *splicing* 3', resultando na liberação do *intron* em estrutura *lariat* e na ligação dos dois *exons* (Figura 6A).

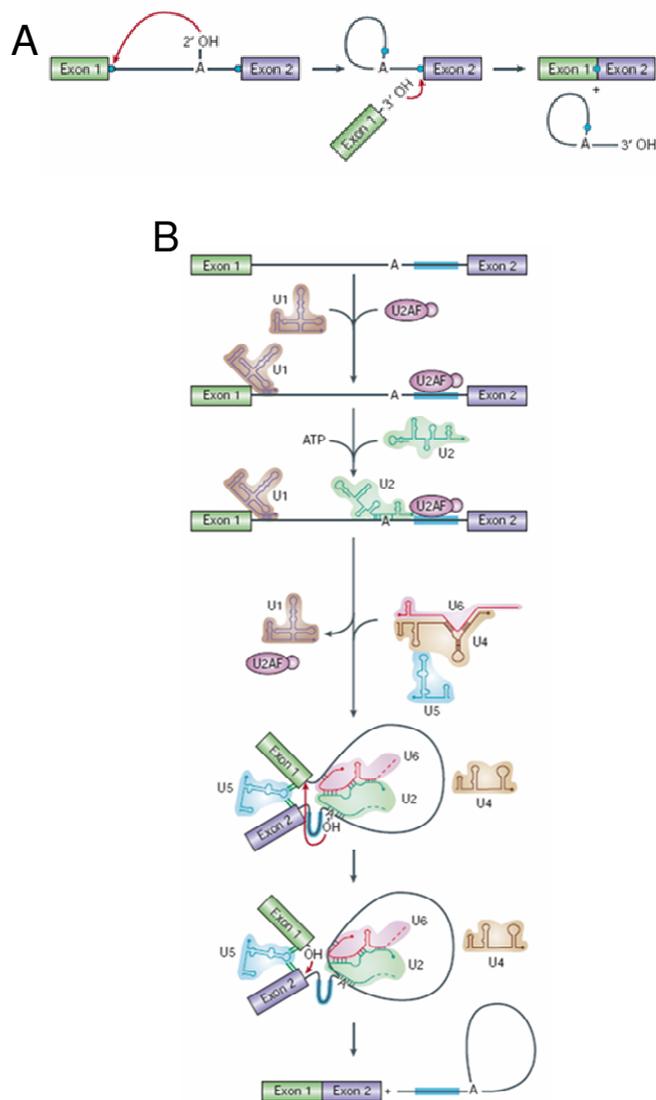


Figura 6: **A)** Esquema representando as duas reações de transesterificação realizadas pelo complexo de *splicing* para a retirada do *intron* e ligação dos *exons* adjacentes. **B)** Esquema representando a montagem do complexo de *splicing* e a catálise realizada por ele. A montagem do complexo de *splicing* começa com a associação das hnRNPs U1 e U2 através de pareamento com regiões conservadas com o sítio de *splicing* 5' e com o *branch site*, respectivamente. O pareamento de hnRNP U2 é auxiliado por outro fator, o U2AF, previamente associado a outra região conservada, chamada trato de polipirimidina. O complexo formado pela snRNP U5 e as snRNPs U4 e U6 pareadas então liga-se de forma estável ao complexo de *splicing*. Em seguida, rearranjos promovidos por proteínas, com o consumo de ATP, justapoem os sítios de *splicing* 5' e 3' formando o sítio catalítico do complexo de *splicing* e liberando a snRNP U4 e U1. Ocorrem então os ataques nucleofílicos sequenciais, resultando na liberação do *intron* em estrutura *lariat* e na ligação dos *exons* adjacentes (Patel e Steitz, 2003).

A montagem de um complexo de *splicing* competente para a catálise requer múltiplos rearranjos das snRNPs, através de uma série de passos de montagem, que envolvem mudanças tanto na composição dos fatores associados quanto na conformação dos mesmos dentro do complexo. Assim, o primeiro complexo comprometido com o *splicing*, denominado complexo E, é definido pelo reconhecimento do sítio de clivagem 5' através do pareamento com a snRNP U1 e pelo reconhecimento do sítio de clivagem 3' pela ligação da subunidade de 65 kDa do heterodímero U2AF (U2AF65) ao trato de polipirimidina e da subunidade de 35 kDa (U2AF35) ao dinucleotídeo conservado (AG) no sítio de *splicing* 3', além da ligação de SF1 (*splicing factor 1*) à sequência *branch-point*. O complexo E é então convertido ao complexo pré-*spliceossomo* A pela adição, dependente de ATP, da snRNP U2 ao 3'ss, o que é facilitado pelo pareamento entre snRNA U2 com a sequência *branch-point*. No duplex U2-*branch-site* a adenosina conservada do *branch-point* não participa do pareamento, de forma que fica exposta, livre para participar da primeira reação de transesterificação. O recrutamento e adição da tri-snRNP U4-U6/U5 resulta na formação do complexo B. Em seguida ocorre um extensivo remodelamento tanto dos snRNA quanto dos componentes protéicos do complexo de forma a ajustar os sítios de *splicing* 5' e 3' formando o sítio catalítico do complexo de *splicing* (Figura 6B). Durante esse remodelamento ocorre um desapareamento do duplex U4-U6, e as snRNPs U1 e U4 são retiradas do complexo, o que permite que U6 pareie com o 5'ss e com uma região de U2 próxima ao duplex U2-*branch-site*. A liberação das snRNPs U1 e U4, assim como diversos outros rearranjos moleculares necessários para a montagem do complexo de *splicing* são promovidos pela energia liberada pela hidrólise de ATP realizada por uma série de proteínas DExD/H box, parte das quais também apresenta atividade de RNA helicase (Patel e Steitz, 2003; House e Lynch, 2008).

A formação do complexo conforme descrito acima, representa a montagem do *spliceossomo* ao redor de um *intron*, numa orientação chamada "*intron-defined*". Ela é baseada em estudos iniciais, com o uso de genes de *S. cerevisiae* ou de substratos artificiais de metazoários, que tipicamente continham apenas um *intron* curto. Porém, o uso subsequente de substratos mais complexos levou à conclusão de que, pelo menos durante os primeiros passos de montagem, o complexo de *splicing* de metazoários é construído ao redor do *exon* de uma forma conhecida como "*exon-defined*". Porém, o complexo C final, deve ser formado ao redor de um *intron* para a reação de catálise, de forma que ainda não se sabe quanto tempo durante a

formação do complexo a conformação *exon-defined* persiste. É possível que o estágio no qual ocorre a transição da conformação *exon-defined* para a *intron-defined* durante a formação do *spliceossomo* varie entre diferentes substratos, sendo influenciada por fatores como o tamanho do *intron*, proteínas regulatórias auxiliares e a força do sítio de *splicing* (House e Lynch, 2008; Berget, 1995).

Embora o complexo de *splicing* catalize a clivagem e religação do pré-mRNA com alta fidelidade, a flexibilidade inerente do complexo o faz extremamente sensível à regulação. A consequência dessa regulação é a inclusão ou exclusão diferencial de *exons* no mRNA final, num processo conhecido como *splicing* alternativo. Acredita-se que o *splicing* alternativo ocorra em mais de 70% dos genes humanos constituindo o mecanismo primário através do qual organismos complexos regulam a expressão protéica e geram um proteoma tão diverso frente ao relativamente limitado genoma. As isoformas protéicas geradas através de *splicing* alternativo comumente variam em seu conteúdo de domínios funcionais, embora compartilhem funções comuns. Em casos mais dramáticos, o *splicing* alternativo pode levar a terminação prematura de ORFs (*open reading frames*), ou mesmo à síntese de mRNAs com diferentes pautas de leitura. A importância desse processo pode ser exemplificada através da influência exercida em processos apoptóticos, onde diferentes isoformas de Bcl e caspases, geradas por *splicing* alternativo, produzem formas antagônicas de proteínas, promovendo a sobrevivência ou morte celular, dependendo da isoforma gerada. Além disso, há casos descritos onde a alteração da isoforma protéica gerada por *splicing* alternativo pode acarretar doenças. É o caso da resistência à insulina em músculo esquelético de pacientes com distrofia miotônica, causada por alterações geradas por *splicing* alternativo no receptor de insulina nesses tecidos, gerando uma isoforma com menor capacidade de sinalização (Roberts e Smith, 2002). Além disso, o fato de que 16% das 31.250 mutações pontuais listadas na database de alelos de doenças humanas (www.hgmd.org) ocorrem em sítios de *splicing*, demonstra o valor desse processo no desenvolvimento de doenças.

Há diversos mecanismos através dos quais a montagem e atividade do complexo de *splicing* podem ser moduladas com o objetivo de gerar diferentes padrões de *splicing* para um determinado gene (Hertel, 2008). Elementos presentes fora do sítio de *splicing* podem afetar de maneira acentuada o *splicing* de pré-mRNAs em metazoários. Exemplos desses elementos são sequências auxiliares de ação-cis, que ocorrem em regiões "exônicas" ou "intrônicas" e que

podem tanto promover a inclusão de *exons* (*splicing enhancers*) quanto causar o desmanche da maquinaria de *splicing*, acarretando a não inclusão de determinado *exon* (*splicing silencers*). A arquitetura de *exons* e *introns* em determinado gene também parece influenciar o reconhecimento de sítios de *splicing*, de forma que o aumento no tamanho de um *exon* resulta em sua não inclusão, enquanto que, esse mesmo *exon* com tamanho aumentado, quando presente entre pequenos *introns*, é incluído no mRNA maduro. Dessa forma, o reconhecimento do sítio de *splicing* parece ser mais eficiente quando *exons* e *introns* são pequenos. A presença de estruturas secundárias no pré-mRNA também tem papel no *splicing* alternativo. Dependendo da sua estabilidade, essas estruturas podem persistir por tempo suficiente para modular o reconhecimento do sítio de *splicing*. Em princípio, essas estruturas podem inibir ou estimular a formação do complexo de *splicing*, já que o reconhecimento dos sítios 3'ss e 5'ss, de elementos *enhancer* e *silencer* normalmente dependem de interações entre fatores protéicos e regiões simples fita do pré-mRNA. Se esses elementos estiverem dentro de uma estrutura secundária, a formação dos complexos será afetada, já que estes elementos não serão mais reconhecidos. Além disso, demonstrou-se que o *splicing* é um processo co-transcricional, de forma que a remoção de *introns* está física e temporalmente ligada à transcrição. Nesse sentido, observou-se que o mesmo gene, quando sob o controle de diferentes promotores, apresenta padrões de *splicing* diferentes, sugerindo um modelo onde os fatores de *splicing* se associariam à polimerase em regiões próximas a promotores. Como consequência, diferenças na estrutura do promotor poderiam levar a diferenças nos fatores de *splicing* recrutados para a maquinaria de transcrição. Paralelamente, a cinética de transcrição de determinado gene também pode influenciar na determinação dos sítios de *splicing*. Dependendo da velocidade de transcrição, a síntese de *exons* alternativos pode ocorrer num intervalo de tempo onde o *exon* com maior força nos sítios de *splicing* ainda não foi sintetizado. Nesse caso, a maquinaria de *splicing* acaba tendo tempo suficiente para reconhecer os sinais fracos presentes no *exon* alternativo, e este acaba sendo incorporado ao mRNA maduro devido à ausência de competição com outro *exon* cujos sinais para o reconhecimento dos sítios de *splicing* fossem mais fortes (Hertel, 2008).

A primeira evidência da co-transcricionalidade do *splicing* veio da visualização direta de transcritos nascentes em embriões de *Drosophila melanogaster* por microscopia eletrônica (Beyer e Osheim, 1988). Além disso, estudos da taxa de *splicing* do gene Balbiani ring 1, de

Chironomus tentans e do gene da distrofina humana demonstraram que os *introns* 5' são frequentemente retirados co-transcricionalmente, enquanto que os *introns* 3' desses longos transcritos são geralmente removidos pós-transcricionalmente (Baurén e Wieslander, 1994). Adicionalmente, estudos recentes têm apresentado diversas evidências apoiando a co-transcricionalidade do *splicing* (Hagiwara e Nojima, 2007). Dentre elas pode-se citar o fato de que algumas mutações no CTD da RNA polimerase II afetam especificamente o *splicing*, não tendo efeito sobre os demais processos, como a transcrição, *capping* e poliadenilação. Além disso, diferentes promotores, *enhancers* e ativadores da transcrição podem afetar a escolha dos sítios de *splicing in vivo*. Adicionalmente, a taxa de alongação da transcrição também é capaz de afetar esse processo. Observou-se também que, fatores de *splicing* anteriormente concentrados em estruturas nucleares definidas, chamadas *speckles*, são recrutados para os sítios de transcrição após a ativação transcricional de um gene *in vivo*. Embora ainda não se conheça precisamente de que forma a transcrição afeta o *splicing*, especula-se que o CTD funcione como uma plataforma para os fatores de *splicing*. Diversos fatores relacionados ao *splicing* já foram identificados em complexos com a RNA polimerase, como PSF, CA150, snRNPs e proteínas SR (Kameoka et al., 2004; Smith et al., 2004; Yuryev et al., 1996). Experimentos demonstraram que a polimerase ou mesmo apenas CTD purificados são capazes de estimular o *splicing in vitro*. Porém o CTD apenas estimulou o *splicing* de pré-mRNAs com *exons* completos, contendo tanto os sítios de *splicing* 5' e 3'. Isso levou a hipótese de que o CTD pudesse imobilizar *exons* consecutivos, facilitando sua justaposição para a reação de *splicing*. Uma evidência que apóia essa hipótese é o fato de que a quebra da continuidade do pré-mRNA não apresentou nenhum efeito no *splicing* de *exons* a 5' e 3' do ponto de quebra no *intron*, o que implica que *exons* consecutivos permanecem de alguma forma conectados ao complexo de transcrição até sofrerem a reação de *splicing*. Nesse sentido foi proposto que proteínas da família SR, fatores de *splicing* essenciais que reconhecem sequências *enhancer* nos *exons* e também se associam ao CTD da polimerase, fossem as responsáveis pela associação dos *exons* à maquinaria de transcrição (de Almeida e Carmo-Fonseca, 2008).

Pouco se conhece até o momento sobre as relações entre o processo de *splicing* e a resposta celular à infecção viral, porém diversos trabalhos têm sido publicados buscando identificá-las e analisá-las (Huang et al., 2002; Iwai et al., 2003; Bryant et al., 2001; Fukuhara et al., 2006;

Terada e Yasuda, 2006; Khabar e Young, 2007; Zhao et al., 2005). Em 2002 Huang e colaboradores mostraram que a infecção por adenovírus e vaccinia vírus (VACV) interfere com a atividade de proteínas da família SR. Conforme mencionado anteriormente, proteínas dessa família são fatores de *splicing* com papel crucial durante o *splicing* constitutivo e com atividade reguladora chave durante o *splicing* alternativo. Em células infectadas por adenovírus ou vaccinia vírus, as proteínas dessa família encontram-se desfosforiladas e funcionalmente inativas. Em 2003, Iwai e colaboradores identificaram a interação entre SmD1 e a proteína NS3 de HCV. SmD1 faz parte das snRNPs U1, U2, U4, U5 e U6, interagindo diretamente com os snRNAs, tendo papel relacionado ao *splicing* de pré-mRNAs. NS3 também interage com RNA, possui atividade trifosfatase e RNA helicase, além de uma atividade serina protease associada a sua região N-terminal. A interação de NS3 com SmD1 se deu através das repetições GR contidas no C-terminal de SmD1 e causou a re-localização de NS3 para o compartimento nuclear. Além disso, SmD1 também foi capaz de se ligar à região 3' UTR dos RNAs de HCV e JEV (*Japanese Encephalitis Virus*) provavelmente através da estrutura secundária formada nessa região dos RNAs dos vírus dessa família (flavivírus). Isso indica um possível papel de SmD1 durante a replicação de HCV.

Foi demonstrado também que durante a infecção com herpes vírus tipo 1 (HSV-1), uma das proteínas virais, IE63, interage diretamente com SP145, um componente essencial do fator de *splicing* 3b, inibindo o *splicing* antes da primeira reação de transesterificação (Bryant et al., 2001). No caso do HIV demonstrou-se que a infecção diminui seletivamente os níveis de proteínas SR e foi proposto que a proteína Tat, codificada pelo vírus, possui papel crítico nesse processo (Fukuhara et al., 2006). O mesmo trabalho também mostra que a superexpressão de proteínas quinase de SR, como SRPK2, é capaz de estabilizar proteínas SR, impedindo a sua degradação mediada pelo vírus. Além disso, demonstra que a superexpressão de algumas SR aumenta a produção de partículas virais, ao contrário de dados previamente publicados, onde a superexpressão de outras proteínas da família SR diminuiriam a eficiência de produção de partículas virais. Os dados apresentados sugerem que diferentes proteínas SR teriam diferentes papéis no processamento de RNA do HIV e que a estabilização dessas proteínas através da atividade de suas quinases pode estar relacionada à eficiência de replicação viral. Estudos com HIV demonstram que a ativação do *checkpoint* da fase G2 em células infectadas, essencial para a

replicação do vírus, é mediada pela interação entre a proteína viral Vpr e o fator de *splicing* SAP145 (Terada e Yasuda, 2006).

No que se refere à via de sinalização dos interferons, já foram observadas formas truncadas de PKR (*double-stranded RNA activated protein kinase*), geradas por *splicing* alternativo e com atividade dominante negativa (Khabar e Young, 2007). O IRF-3, fator indispensável para a ativação do promotor de IFN- β , possui uma forma gerada por *splicing* alternativo, chamada IRF-3a, que não possui o domínio de ligação a DNA e age como um modulador negativo do promotor de IFN- β , inibindo a ativação induzida por infecção (Khabar e Young, 2007). Um grande número de proteínas que são alvo de conjugação à ISG15 estão relacionadas ao processamento de RNA, incluindo diversos fatores de *splicing*, componentes das snRNPs U2 e U5 e a um fator de *splicing* alternativo, o PTB-1. Os resultados apresentados mostram que a conjugação de ISG15 pode ter papel na regulação do *splicing* de pré-mRNA durante a resposta a IFN (Zhao et al., 2005).

Com base nos resultados de expressão induzida de KIAA0082/ISG95 em diferentes condições relacionadas à infecção viral e à resposta à interferon, e no resultado da análise de domínios preditos em sua estrutura primária, julgamos um interessante alvo para estudos funcionais, já que se deduz de sua organização de domínios que possua atividade relacionada ao processamento de RNA, alvo de estudo de nosso laboratório, co-relacionando essa função biológica a mecanismos de resposta à infecção. Dessa maneira, propõe-se a análise funcional da proteína, para caracterização de sua função biológica, e a confirmação do gene que a codifica como parte do grupo das ISGs. Uma análise mais profunda das atividades de KIAA0082/ISG95, de sua possível função durante o processamento de pré-mRNAs, pode esclarecer a importância desse aspecto do metabolismo celular durante a resposta a IFN e em situações de infecção viral.

2. OBJETIVOS

➤ Determinar a função biológica de KIAA0082/ISG95 durante o processamento de pré-mRNAs e sua identidade como ISG através das seguintes estratégias experimentais:

- ✓ Caracterização da resposta a IFN do promotor do gene *KIAA0082/ISG95*.
- ✓ Determinação de sua localização sub-celular em fusão à GFP (*green fluorescent protein*).
- ✓ Estabelecimento de um sistema de expressão para a proteína KIAA0082/ISG95 e dos seus domínios para ensaios funcionais.
- ✓ Teste das atividades de ligação à RNA, metiltransferase e de ATPase através de ensaios *in vitro*.
- ✓ Teste das atividades de RNA-metil, RNA-guanilil e RNA-trifosfatase, essenciais à formação de *cap* de pré-mRNAs, através de ensaios de complementação em levedura.
- ✓ Análise da interação de KIAA0082/ISG95 com outras proteínas utilizando o método duplo-híbrido de levedura e ensaios de co-purificação.
- ✓ Teste da possível participação de KIAA0082/ISG95 no processo de *splicing* de pré-mRNAs através de ensaios *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cepas de bactérias, levedura e linhagens de células eucarióticas.

3.1.1 Cepas de *Escherichia coli*

Cepa	Genótipo	Referência
DH5 α	<i>F</i> ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K⁻ m_K⁺</i>), λ -	Grant et al., 1990.
BL21-DE3	<i>F</i> ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) λ (<i>DE3</i> [<i>lacI lacUV5-T7</i> <i>gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])	Studier e Moffatt, 1986
BL21-SI	<i>F</i> ⁻ <i>ompT Ion hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal dcm endA1 proUp::T7 RNAP::</i> <i>malQ-lacZ Tet^r</i>	Life Technologies
BL21-DE3 Δ slyD	BL21-DE3 com deleção do gene <i>slyD</i>	Yan et al., 2001
C41	BL21-DE3 com mutação não determinada	Miroux e Walker, 1996
C43	C41 com mutação não determinada adicional	Miroux e Walker, 1996

3.1.2 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Cepa	Genótipo	Referência
L40	<i>MATa, trp1, leu2, his3, LYS2::lexA-HIS3, URA3::lexA-LacZ</i>	Hollenberg et al., 1995
Y21064 (heterozigota para <i>CET1</i>)	<i>BY4743; Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YPL228w::kanMX4/YPL228w</i>	EUROSCARF
Y24497 (heterozigota para <i>CEG1</i>)	<i>BY4743; Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YGL130w::kanMX4/YGL130w</i>	EUROSCARF
Y23376 (heterozigota para <i>ABDI</i>)	<i>BY4743; Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YBR236c::kanMX4/YBR236c</i>	EUROSCARF

3.1.3 Linhagens celulares eucarióticas

Linhagem	Origem	Referência
Sf9	Células de origem ovariana de <i>Spodoptera frugiperda</i>	Vaughn et al., 1977
HeLa	Adenocarcinoma cervical humano	Gey et al., 1952
Vero	Células de origem renal de <i>Cercopithecus aethiops</i> (macaco verde africano)	Simizu et al., 1967

3.2. Cultura de cepas de *Escherichia coli*, levedura e linhagens celulares eucarióticas.

3.2.1 Meios de cultura e manutenção de cepas de *E. coli*

As bactérias foram cultivadas a 37 °C em meio LB (Sambrook et al., 1989), composto por 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura e 1% de cloreto de sódio. Ao meio sólido se adiciona 2% de ágar bacteriológico.

3.2.2. Meios de cultura e manutenção de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Todas as cepas foram mantidas a 30 °C e os meios preparados conforme descrito por Guthrie e Fink, 1991.

- **Meio completo (YPD)** - 1% de extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose, suplementado com 0,02 mg/mL de adenina ou 0,2 mg/mL de geneticina quando necessário (2% de ágar para meio sólido).

- **Meio mínimo (SC)** - 0,67% de base nitrogenada de levedura, 2% de glicose e suplementado com aminoácidos quando necessário (2% de ágar para meio sólido).

- **Meio SC-GAL** - 0,67% de base nitrogenada de levedura sem aminoácidos, 2% de galactose e suplementado com aminoácidos, geneticina (0,2 mg/mL) ou 5-FOA (ácido 5-5-fluoroorótico, 1mg/mL) quando necessário (2% de ágar para meio sólido).

- **Meio de pré-esporulação** - 0,8% de base nitrogenada de levedura sem aminoácidos, 0,3% de peptona, 10% de glicose e 2% de ágar.

- **Meio de esporulação** – 1% de acetato de potássio, 0,1% extrato de levedura, 0,05% de glicose e 2% de ágar.

3.2.3. Meio de cultura e manutenção de células de inseto Sf9

As células foram cultivadas em meio IPL41 (Invitrogen) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab) e 10% de triptose (GIBCO) a 27 °C. Quando atingem confluência a passagem das células para novo frasco é realizada através da ressuspensão no próprio meio de cultivo.

3.2.4. Meio de cultura e manutenção de células de mamíferos

Células HeLa e Vero foram cultivadas em meio MEM (Cultilab) contendo 1% de antibiótico (ampicilina e streptomina) e 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab). Para a realização da passagem das células confluentes para novo frasco utilizou-se uma solução de tripsina/EDTA 1:250 (Cultilab).

3.3. Oligodesoxirribonucleotídeos

Número	Nome	Restrição	Sequência
ONZ218	ABD1-F	BamHI	5' CGGGATCCATGTCAACCAAACCAGAGAAG 3'
ONZ219	ABD1-R	XbaI	5' GCTCTAGATTAGTTGGGCTT TACGCTTTCC 3'
ONZ220	CEG1-F	SalI	5' ACGCGTCGACATGGTT TTAGCAATGGAAAGTA 3'
ONZ221	CEG1-R	SpeI	5' CACTAGTTTAATCCGACCAATCATCCTCG 3'
ONZ222	CET1-F	BamHI	5' GCGGATCCATGAGTTACACTGACAACCCT 3'
ONZ223	CET1-R	EcoRI	5' GGAATTC TTACATGACTTTCTT TGAACCT 3'
ONZ224	ISG95-F	SalI/NdeI	5' GCGTCGACATATGAAGAGGAGAACTGACCC 3'
ONZ225	ISG95-R2	Sal I	5' AGCGGTCGACTTAGGCCCTGTGCATCTGGA 3'
ONZ226	Guanilil-F	BamHI/NdeI	5' CGGGATCCCATATGGTGTGTTGACTACCGCTGCAT 3'
ONZ227	Guanilil-R	SalI	5' ATCGGTCGACTTAGCCCTTGATGATCTTCATCTC 3''
ONZ228	FtsJ-F	BamHI/NdeI	5' CGGGATCCCATATGACAAAATCCGCGGGACTCTTAT 3'
ONZ229	FtsJ-R	SalI	5' AGGGGTCGACTTACACCTTCAGGCCCTTGACAC 3'
ONZ230	ISG95-R2	Kpn I	5' GAGGTACCGGGCCCTGTGCATCTGGATGA 3'
ONZ243	ISG95Seq	-	5' CAGAAGCTCAGCTTCCCGG 3'
ONZ246	Ki-1441	-	5' CCTATTACCAGCCGTCCTGC 3'
ONZ250	CET-415	-	5' AAGCCTTCTGATGAT TCAATTC 3'
ONZ251	CET-845	-	5' CAAAGTCAGTACAGGACTGGG 3'
ONZ252	CEG-347	-	5' AAGAAGAGCTGCTAGAGACTC 3'
ONZ253	CEG-691	-	5' CCTGTGAAGGCACCTTACAC 3'
ONZ254	ABD-348	-	5' AAATGTTGACCAGATTGTCCG 3'
ONZ255	ABD-658	-	5' ATTACTGGGGATTGCTTTGGC 3'
ONZ339	KanB	-	5' CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT 3'
ONZ340	ABD1 Prom.	-	5'TTCGAATCAATAGTTTCCATACCTC 3'
ONZ341	CET1 Prom.	-	5' CTAAAGTCAAGCCATACATAATGCC 3'
ONZ342	CEG1 Prom.	-	5' TATAAT TCACGTTTTTAGCACCTC 3'
ONZ350	ISG95-Rev	SalI	5' AGCGGTCGACGGCCCTGTGCATCTGGATGA 3'
ONZ351	CEG1-Mut	-	5' CTG TTCGCTCACAAACGTAGTAATCATGCG C 3'
ONZ352	MBP-FNco	NcoI	5' ATAGCCATGGAAATCGAAGAAGGTAACCTg 3'
ONZ355	MBP- Rev	Nde I	5' CATATGGTGATGGTGATGGTGCCCTGAAAATACAGGTT TTC 3'
ONZ420	Seq TEF1	-	5' CGGTCTTCAATTTCTCAAGTTTC 3'
ONZ421	ProtISG1	KpnI	5' GGTACC TTTGCTTTTGCAGCCTTTTCCG 3'
ONZ422	ProtISG2	KpnI	5' GGTACCCAGAAGAGAGGTTTGAGATGA 3'
ONZ423	ProtISG3	KpnI	5' GGTACCAAACCTGAGAAGAGTCAGCATGG 3'
ONZ424	ProtISG4	KpnI	5' GGTACCCATCAGGAAATATTTTCGAGATAG 3'
ONZ425	ProtISGR	XhoI	5' CTCGAGTCGGGTCCAGTACTGCCGGC 3'
ONZ469	ISG95	BamHI-NdeI	5' CGGGATCCATGTGTTGACTACCGCTGCAT 3'
ONZ542	ISG15Fow1	KpnI	5' C TCGGGAAAGGGAACCGAAACTGAAGCCAAATTTGGCCACCA 3'
ONZ543	ISG15Fow2	-	5' GCGCAGGCTCGCGGCACGCCCTGACGTGTGTGCCA 3'
ONZ544	ISG15Rev1	BglII	5' GATCTGGCACACACGTCAGGGGGCGTGCCGCGAGCCTGCGCTGGTGG 3'
ONZ545	ISG15Rev2	-	5' CCAAATTTGGCTTCAGTTTCGGTTTCCCTTTCCCGAGGTAC 3'
ONZ546	CCHC7-FB	BamHI	5' GGATCCATGATGTTTGGTGGCTATGAGA 3'
ONZ547	CCHC7-RX	XhoI	5' CTCGAGTTAAGACTTTTTTTTCTCTGCTT 3'
ONZ548	SmD1-FB	BamHI	5' GGATCCATGAAGCTCGTGAGATTTTGTAT 3'
ONZ549	SmD1-RX	XhoI	5' CTCGAGTTATCGCCTAGGACCCCTCT 3'
ONZ550	SF3b5-FB	BamHI	5' GGATCCATGACTGACCGCTACACCATC 3'
ONZ551	SF3b5-RX	XhoI	5' CTCGAGTCAGTTCTCTCGGGCTTGTG 3'

3.4. Plasmídeos

3.4.1. Plasmídeos para *Escherichia coli*

Nome	Vetor	Inserto	Oligos	Fusão	Referência
pETEV	pET28a	Sítio para TEV	-	-	Carneiro et al, 2006
pRARE	-	-	-	-	Novagen
pMAL-c2x	-	-	-	-	NE Biolabs
pSPORT-ISG95	pCMV-SPORT6	ISG95	-	-	Invitrogen
pETEV-Nterm	pETEV	Aminoácidos 1 a 451 de ISG95	ONZ224 ONZ229	6-His	Este trabalho
pETEV-Cterm	pETEV	Aminoácidos 588 a 835 de ISG95	ONZ226 ONZ225	6-His	Este trabalho
pETEV-guanilil	pETEV	Aminoácidos 588 a 726 de ISG95	ONZ226 ONZ227	6-His	Este trabalho
pETEV-FtsJ	pETEV	Aminoácidos 252 a 451 de ISG95	ONZ228 ONZ229	6-His	Este trabalho
pETEV-ISG95	pETEV	ISG95	ONZ224 ONZ225	6-His	Este trabalho
pETEV-MBP-Nterm	pETEV-Nterm	MBP (<i>maltose binding protein</i>)	ONZ352 ONZ355	MBP-6-His	Este trabalho
pETEV-MBP-Cterm	pETEV-Cterm	MBP (<i>maltose binding protein</i>)	ONZ352 ONZ355	MBP-6-His	Este trabalho
pETEV-MBP-guanilil	pETEV-guanilil	MBP (<i>maltose binding protein</i>)	ONZ352 ONZ355	MBP-6-His	Este trabalho
pETEV-MBP-FtsJ	pETEV-FtsJ	MBP (<i>maltose binding protein</i>)	ONZ352 ONZ355	MBP-6-His	Este trabalho
pETEV-MBP-ISG95	pETEV-ISG95	MBP (<i>maltose binding protein</i>)	ONZ352 ONZ355	MBP-6-His	Este trabalho
pOTB7-SmD1	pOTB7	SmD1		-	EUROSCARF
pOTB7-Sf3b5	pOTB7	Sf3b5		-	EUROSCARF
pSPORT-CCHC7	pCMV-SPORT6	Proteína com domínio CCHC7		-	EUROSCARF

3.4.2 Plasmídeos para levedura

Plasmídeo	Características	Oligos	Referência
pTL1-ISG95	<i>lexADBBD::ISG95, TRP1, 2 μm</i>	-	Este trabalho
pTL1-ISGNT	<i>lexADBBD::ISG95NT</i> (aminoácidos 1 a 451), <i>TRP1, 2 μm</i>	-	Este trabalho
pTL1-ISGCT	<i>lexADBBD::ISG95CT</i> (aminoácidos 541 a 835), <i>TRP1, 2 μm</i>	-	Este trabalho
pTL1-ISGdWW	<i>lexADBBD::ISG95dWW</i> (aminoácidos 1 a 726), <i>TRP1, 2 μm</i>	-	Este trabalho
pACT-PolII	<i>GAL4AD::ISG95, LEU2, 2 μm</i>	-	Este trabalho
pBTM-NIP7	<i>lexADBBD::NIP7, TRP1, 2 μm</i>	-	Zanchin et al, 1999
pACT-NOP8	<i>GAL4AD::NOP8, LEU2, 2 μm</i>	-	Zanchin et al, 1999
YCpGAL1-ABD1	<i>GAL1p::ABD1, URA3, CEN4</i>	ONZ254 ONZ255	Este trabalho
YCpGAL1-CEG1	<i>GAL1p::CEG1, URA3, CEN4</i>	ONZ252 ONZ253	Este trabalho
YCpGAL1-CET1	<i>GAL1p::CET1, URA3, CEN4</i>	ONZ250 ONZ251	Este trabalho
YEpl81	<i>LEU2, 2 μm</i>	-	Gietz et al, 1988
YCp33-Supex2	<i>URA3, CEN4</i>	-	Zanchin, dados não publicados
YEpl-ISG95	Promotor <i>TEF1, ISG95, LEU2, 2 μm</i>	-	Este trabalho
YEplISG95- cegl ^{K70A}	Promotor <i>TEF1, cegl^{K70A}::ISG95, LEU2, 2 μm</i>	ONZ224 ONZ350 ONZ252 ONZ253 ONZ351	Este trabalho
YEpecegl ^{K70A}	Promotor <i>TEF1, cegl^{K70A}, LEU2, 2 μm</i>	ONZ252 ONZ253 ONZ351	Este trabalho

3.4.3. Plasmídeos para cultura de células eucarióticas

Plasmídeo	Características	Oligos	Referência
pVL1393	<i>Amp^R</i>	-	BD Biosciences
pVL1393-HisISG95	<i>His::ISG95, Amp^R</i>	-	Este trabalho
pMARE-SEAP	<i>Amp^R, MARE::SEAP</i>	-	Petersen et al, 2004
pP1551-SEAP	<i>ISG95p^{-1/-1551}::SEAP,</i>	ONZ424 ONZ425	Este trabalho
pP1100-SEAP	<i>ISG95p^{-1/-1100}::SEAP,</i>	ONZ423 ONZ425	Este trabalho
pP500-SEAP	<i>ISG95p^{-1/-500}::SEAP,</i>	ONZ422 ONZ425	Este trabalho
pP185-SEAP	<i>ISG95p^{-1/-185}::SEAP,</i>	ONZ421 ONZ425	Este trabalho
pPISG15-SEAP	<i>ISG15p ISRE ISG15::SEAP</i>	ONZ542 ONZ543 ONZ544 ONZ545	Este trabalho
pEGFP-C2	<i>Kan^R</i>	-	Clontech
pEGFP-ISG95	<i>EGFP::ISG95 Kan^R</i>	ONZ224 ONZ230	Este trabalho

3.5. Descrição das construções de plasmídeos

Todos os oligodesoxirribonucleotídeos utilizados estão listados na seção 3.3. Da mesma forma todos os plasmídeos utilizados e originados durante o trabalho estão listados na seção 3.4.

3.5.1. Construções de plasmídeos para expressão de proteínas em *Escherichia coli*

O cDNA de ISG95, de seus domínios guanililtransferase e FtsJ, e de seus fragmentos N e C-terminais foram amplificados por PCR utilizando como *template* o plasmídeo pSPORT-ISG95 e os oligodesoxirribonucleotídeos descritos na seção 3.3.

Os cDNAs amplificados foram clonados no vetor pETEV entre os sítios de NdeI e SalI, de forma a se obter os plasmídeos pETEV-Nterm, pETEV-guanilil, pETEV-FtsJ, pETEV-Cterm e pETEV-ISG95, que codificam para ISG5 e os diferentes domínios em fusão a uma hexa-histidina (6-his) N-terminal. O vetor pETEV (Figura 7) foi construído em nosso laboratório (Carneiro et al., 2006) e consiste num vetor pET28a, onde se retirou o sítio de reconhecimento para trombina e em seu lugar se inseriu um sítio de reconhecimento para a protease TEV (*tobacco etch virus*).

A proteína ISG95 e seus domínios foram posteriormente clonados em fusão com a proteína MBP (*maltose binding protein*) na tentativa de se melhorar a solubilidade das proteínas recombinantes (Kapust e Waugh, 1999). Para isso o cDNA da MBP foi amplificado por PCR utilizando-se como *template* o vetor pMAL-c2x (New England Biolabs). O oligodesoxirribonucleotídeo reverso ONZ355 utilizado inseriu à 3' da seqüência amplificada um sítio de reconhecimento para a protease TEV. O cDNA amplificado foi então clonado nos vetores recombinantes pETEV-Nterm, pETEV-guanilil, pETEV-FtsJ, pETEV-Cterm e pETEV-ISG95 no sítio de NdeI, dando origem a plasmídeos que codificam uma hexa-histidina (6-His), seguida de um sítio de reconhecimento para TEV, a MBP, um outro sítio de reconhecimento para a protease TEV e finalmente a proteína de interesse. A orientação de entrada do cDNA nos plasmídeos recombinantes foi confirmada por PCR, utilizando-se o oligodesoxirribonucleotídeo direto para a MBP e o reverso para cada um dos fragmentos já anteriormente clonados no vetor pETEV.

3.5.2. Construção de plasmídeo para expressão de proteínas em Sf9

O vetor pETEV-ISG95 foi clivado com as enzimas Xba I e Not I e o fragmento liberado, que codifica para a hexa-histidina N-terminal seguida pela seqüência da proteína, foi então ligado no vetor pVL1393 (BD Biosciences - Figura 8A) clivado com as mesmas enzimas. O

vetor recombinante pVL1393-HisISG95 foi então utilizado para a transfecção de células de inseto Sf9.

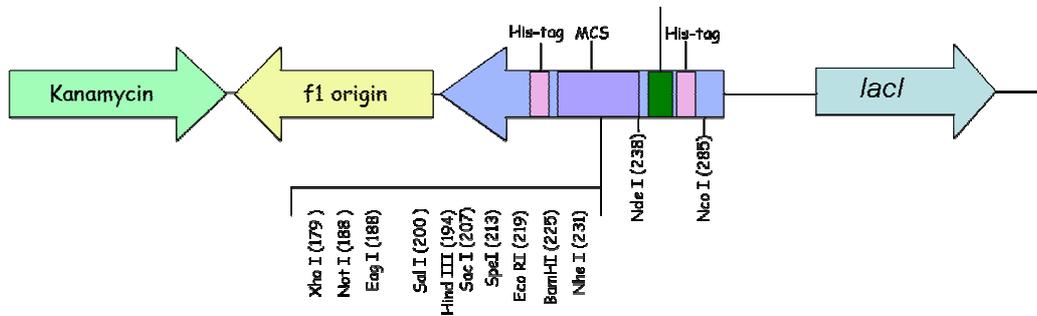


Figura 7: Esquema do vetor pETEV (Carneiro et al., 2006).

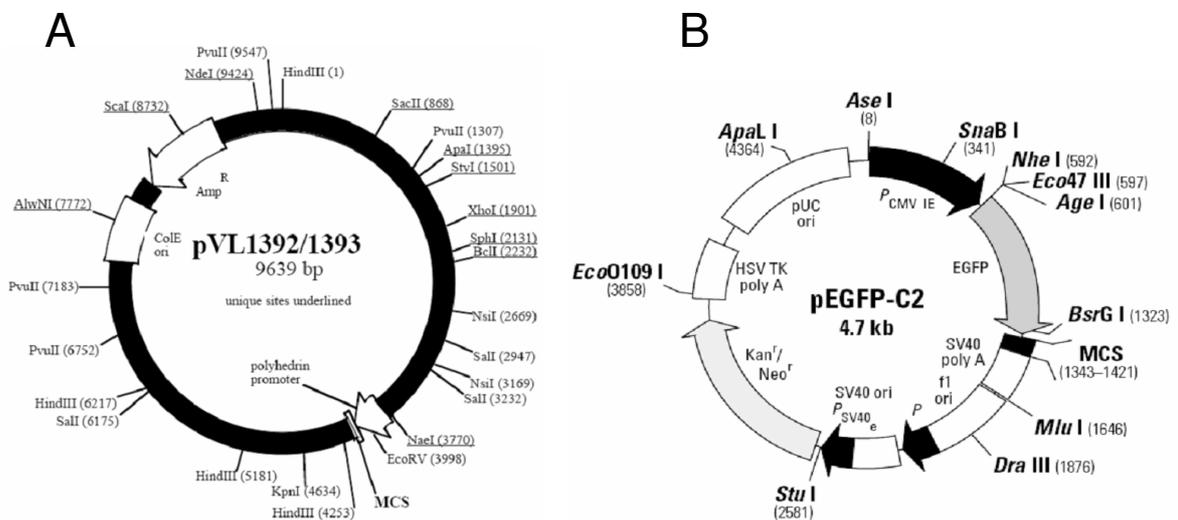


Figura 8: **A)** Vetor pVL1393 utilizado para a clonagem de ISG95 em fusão à hexa-histidina para expressão em células Sf9 pelo sistema baculovírus. **B)** Vetor pEGFP-C2 usado para a construção da fusão de ISG95 à GFP (*green fluorescent protein*), transfecção em células HeLa e determinação da localização sub-celular de ISG95.

3.5.3. Construções de plasmídeos para células de mamíferos

Para o ensaio de localização sub-celular o cDNA de *ISG95* foi amplificado por PCR utilizando-se os oligodesoxirribonucleotídeos ONZ224 e ONZ230 descritos na seção 3.2 e clonado *in frame* a sequência codificadora da GFP (*green fluorescent protein*) no vetor pEGFP-C2 (Clontech - Figura 8B).

No intuito de analisar melhor a sequência promotora de *ISG95* e definir sua possível estimulação via interferon (IFN) foram construídos plasmídeos repórteres. Utilizou-se para isso o vetor pTAL-SEAP (Clontech, Figura 9A) que possui o cDNA da proteína repórter SEAP (*Secreted Alkaline Phosphatase*) e *upstream* a ela um MCS (*Multiple Cloning Site*) onde podem ser clonadas sequências promotoras para controlar a expressão do repórter (*Great EscAPE SEAP User Manual*, 2005). Sequências de diferentes tamanhos (1551pb, 1100pb, 500pb e 185pb) *upstream* ao sítio de início da transcrição de *ISG95* foram amplificadas com os respectivos oligodesoxirribonucleotídeos (seção 3.3) a partir de DNA total humano (cedido pela Dra. Dulcineia Martins de Albuquerque e Dr. Fernando Ferreira Costa do Centro de Hematologia e Hemoterapia - Hemocentro da UNICAMP) e inseridas no vetor pTAL-SEAP entre os sítios de KpnI e XhoI, dando origem aos plasmídeos recombinantes pP1551-SEAP, pP1100-SEAP, pP500-SEAP e pP185-SEAP. Como controle positivo da resposta a IFN foi construído o plasmídeo pISG15-SEAP. Para isso reconstituiu-se a sequência ISRE de *ISG15*, cuja resposta a IFN já foi descrita (Reich et al., 1987), através do anelamento de quatro oligonucleotídeos sintéticos, sendo então esta clonada no vetor pTAL-SEAP entre os sítios de KpnI e BglII. Como controle negativo utilizou-se o plasmídeo pTAL-MARE (cedido pelo Dr. H. H. Petersen, Max-Delbrueck-Center for Molecular Medicine, Germany), que possui sítio de ligação ao fator de transcrição MafB (Petersen et al., 2004), não estando relacionado à resposta a IFN.

3.5.4. Construções de plasmídeos para *Saccharomyces cerevisiae*

Para a realização dos ensaios de complementação inicialmente os genes *CET1*, *CEG1* e *ABD1* foram amplificados a partir de DNA total da cepa L40 de *S. cerevisiae*, utilizando para isso os respectivos oligodesoxirribonucleotídeos descritos na seção 3.3. Os cDNAs amplificados foram então individualmente subclonados no vetor YCplac33-Supex2 (Figura 9B - Zanchin, dados não publicados) sob o controle do promotor *GAL1* e com o gene *URA3* como marca de seleção, dando origem aos plasmídeos descritos na seção e 3.4.2.

Para os ensaios de complementação inicialmente construiu-se o plasmídeo YEp-ISG95. Nesse plasmídeo o cDNA de *ISG95* está sob controle do promotor *TEF1* (constitutivo e forte). Para sua construção, inicialmente o promotor TEF foi extraído por clivagem com as enzimas EcoRI e BamHI do vetor YCp33-TEF (Zanchin, dados não publicados) e inserido no vetor YEp181 (Figura 10A - Gietz e Sugino, 1988) clivado com as mesmas enzimas, dando origem ao plasmídeo YEp181-TEF. A sequência codificadora de *ISG95* foi então extraída do vetor pETEV-ISG95 com as enzimas XbaI e SalI, de forma a carregar a sequência codificadora da hexa-histidina N-terminal, e inserida no vetor YEp181-TEF clivado com as mesmas enzimas, de forma a gerar o plasmídeo desejado YEp-ISG95. O plasmídeo YEp181-TEF foi usado como controle negativo do teste, sendo chamado apenas YEp181.

Outro clone foi construído de forma a procurar direcionar a proteína ISG95 ao complexo de iniciação da transcrição, onde as atividades de formação de *capping* em teste são requeridas. Para isso a proteína ISG95 recebeu como fusão em seu C-terminal a sequência de *CEG1* com uma mutação em seu sítio ativo, que abole sua atividade de guanililtransferase (Shibagaki et al., 1995). A mutação consiste na substituição da lisina presente na posição 70 por uma alanina, dando origem ao mutante *ceg1^{K70A}*. Para a construção do mutante inicialmente foi desenhado um oligodesoxirribonucleotídeo reverso contendo a sequência alvo mutada (ONZ351). Foi realizada uma reação de PCR utilizando o oligodesoxirribonucleotídeo direto sem mutações (ONZ252), anelando na extremidade 5' da sequência de *CEG1* e o oligodesoxirribonucleotídeo reverso que insere a mutação, dando origem a um fragmento de 214 pares de bases (pb). Esse fragmento foi então utilizado numa segunda reação de PCR como o oligodesoxirribonucleotídeo direto, utilizando-se o oligodesoxirribonucleotídeo reverso sem mutações (ONZ253) anelando na região 3' da sequência de *CEG1*. Foi necessário realizar um pequeno ajuste no ciclo de PCR aumentando-se o tempo de anelamento para 1 min e 30 segundos, já que o oligodesoxirribonucleotídeo direto utilizado possuía 214 bases para anelar com o *template*. Ao final da segunda reação de PCR, o fragmento gerado, correspondente ao mutante desejado, foi então ligado no vetor pGEM-T *Easy* e analisado por sequenciamento. Para a construção da fusão ISG95-*ceg1^{K70A}* foi necessário re-amplificar a sequência de *ISG95* por PCR, utilizando-se o oligodesoxirribonucleotídeo reverso ONZ350, a fim de retirar o *codon* de terminação de seu cDNA. Esse cDNA de ISG95 sem o *codon* de terminação foi clonado no vetor pGEM-T *Easy*,

dando origem ao plasmídeo pGEM-ISG95NoStop. Para a construção do plasmídeo recombinante YEpISG95-*ceg1*^{K70A} realizou-se uma reação de ligação com o plasmídeo YEp181 clivado com EcoRI e HindIII, o promotor TEF extraído do plasmídeo YCp33-TEF-4E57A (Zanchin, dados não publicados) com EcoRI e NdeI, um fragmento que codifica para o N-terminal de ISG95 extraído do plasmídeo pETEV-ISG95 com NdeI e NcoI, o fragmento que codifica para o C-terminal de ISG95 extraído do plasmídeo pGEM-ISG95NoStop com NcoI e SalI, o mutante *ceg1*^{K70A} extraído do vetor pGEM-*ceg1*^{K70A} com SalI e SpeI e por fim o terminador PGK extraído do vetor Ycp33-Supex2 com XbaI e HindIII. Como controle negativo para o teste de complementação usando a fusão mencionada foi construído o plasmídeo recombinante YEp-*ceg1*^{K70A}, que expressa apenas o mutante e dessa forma não deve apresentar nenhuma das três atividades relacionadas à formação de *cap* de pré-mRNA. Para isso inicialmente construiu-se o plasmídeo YEp18-TEF-PGK através da ligação do promotor TEF (purificado a partir do plasmídeo YCp33-TEF-4E57A com as enzimas EcoRI e XhoI), do terminador PGK (extraído do plasmídeo YCp33-Supex2 com as enzimas XhoI e HindIII) no vetor YEp181 com extremidades EcoRI e HindIII. A sequência codificadora do mutante *ceg1*^{K70A} (com extremidades SalI) foi então inserida no vetor YEp18-TEF-PGK linearizado com a enzima XhoI.

Para o ensaio de duplo-híbrido de levedura o cDNA de *ISG95* foi clonado *in frame* ao cDNA do domínio de ligação ao DNA da proteína *lexA* no vetor pTL1 (DB-ISG95). O vetor pTL1 foi construído em nosso laboratório (Carneiro et al., 2006) e consiste num vetor pBTM116 com a marca de resistência trocada para canamicina (Figura 10B). Para a construção do plasmídeo recombinante pTL1-ISG95 retirou-se o fragmento que codifica para o N-terminal de ISG95 do vetor pGEM-ISG95NT com as enzimas SalI e SacI e o fragmento C-terminal do vetor pETEV-ISG95 com as enzimas SacI e SalI. Os dois insertos foram ligados no vetor pTL1 linearizado com SalI de forma a reconstituir o cDNA completo de *ISG95 downstream* à sequência codificadora de *lexA*. Foram construídos também clones truncados da isca ISG95 no vetor pTL1 para o mapeamento das regiões responsáveis pelas interações detectadas no ensaio de duplo-híbrido. O clone pTL1-ISGNT consiste na fusão dos primeiros 451 aminoácidos de ISG95 ao domínio de ligação ao DNA de *lexA* no vetor pTL1. Para a construção deste plasmídeo, o inserto ISGNT foi retirado do vetor pGEM-ISG95NT com a enzima SalI e ligado no pTL1 linearizado com a mesma enzima de restrição. Para a construção do clone pTL1-ISGCT (aminoácidos de

541 a 835) o cDNA correspondente foi retirado do vetor pTL1-ISG95 com BamHI e SalI. Por fim, para a construção do vetor pTL1-ISGdWW (aminoácidos 1 a 726) o fragmento que codifica para a extremidade N-terminal da proteína foi retirado do vetor pTL1-ISG95 com as enzimas SalI e BglII e a o fragmento que codifica para a extremidade C-terminal foi retirado do vetor pETEV-guanilil com BglII e SalI. Os dois insertos foram inseridos no vetor pTL1 linearizado com SalI.

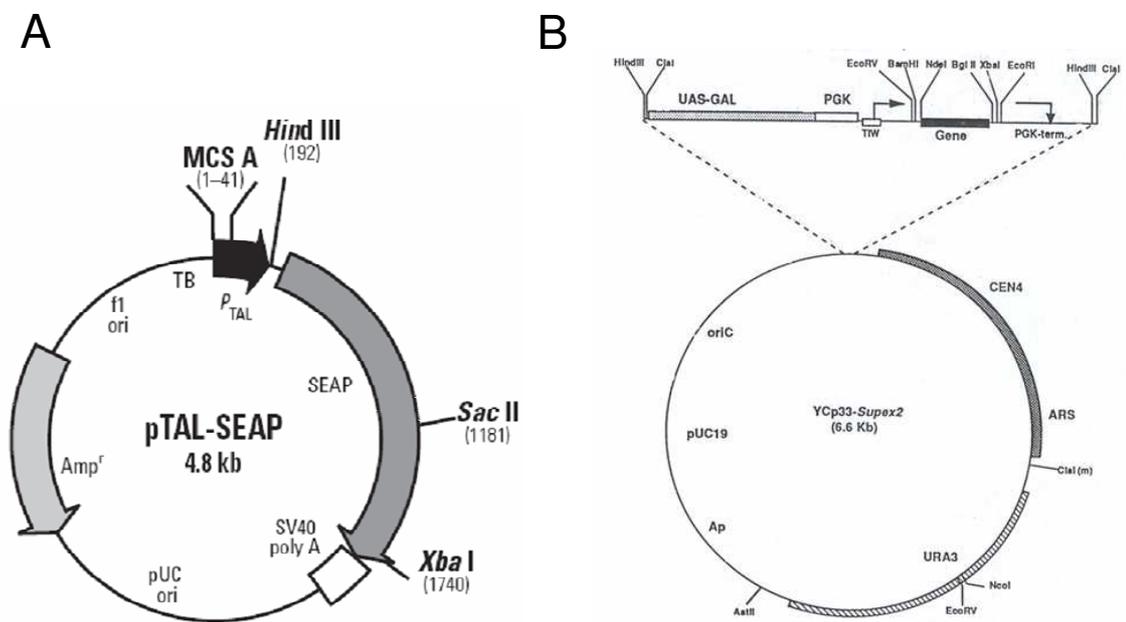


Figura 9: **A)** vetor pTAL-SEAP utilizado nos ensaios de atividade promotora. Sequências de diferentes tamanhos do promotor de ISG95 foram inseridas *upstream* ao repórter SEAP, de forma a controlar sua expressão. **B)** Vetor YCp33-Supex2, onde foram clonados os genes *ABD1*, *CET1* e *CEG1*, sob controle do promotor *GAL1* para os testes de complementação em levedura.

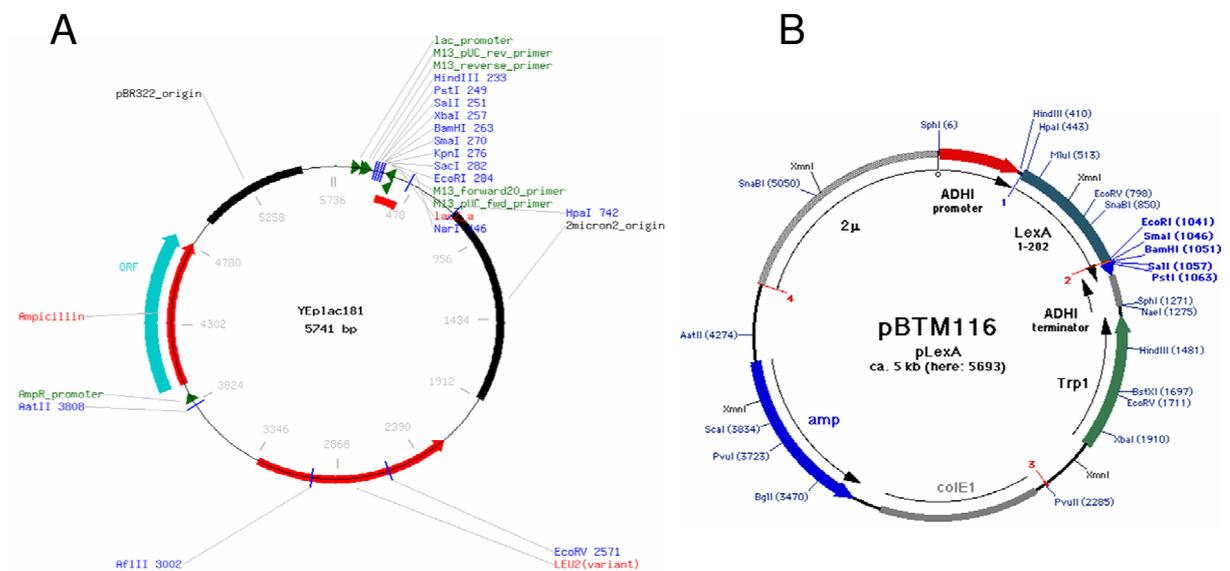


Figura 10: **A)** Vetor YEp181 utilizado para a clonagem de ISG95 para os ensaios de complementação em levedura. **B)** Vetor pBTM116. A marca de resistência à ampicilina foi trocada para canamicina, dando origem ao vetor pTL1 (Carneiro et al., 2006), utilizado para o ensaio de duplo-híbrido de levedura.

3.6. Transformação/Transfecção

3.6.1. Transformação de *Escherichia coli*

As diferentes cepas de *Escherichia coli* foram transformadas por choque térmico ou eletroporação (Sambrook et al., 1989).

3.6.2. Transformação de levedura

As diferentes linhagens de *Sacharomyces cerevisiae* foram transformadas através do protocolo de Acetato de Lítio (Guthrie e Fink, 1991).

3.6.3. Transfecção de células eucarióticas

Células eucarióticas foram transformadas através da técnica de lipossomos catiônicos (Ausubel et al., 1998), utilizando-se Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

3.6.3.1. Transfecção de células HeLa

Para o ensaio de localização sub-celular, células HeLa aderidas à lamínulas de vidro em placa de 6 *wells* com aproximadamente 80% de confluência foram transfectadas utilizando-se 10 μ L de *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) e 5 μ g de pGFP-ISG95 ou pEGFP-C2 (controle negativo). Para a transfecção, a mistura de DNA e lipofetamina teve seu volume ajustado para 500 μ L em meio MEM sem soro e foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. Após

esse período foi colocada sobre as células e ajustou-se o volume da transfecção para 2 mL. Após 5 horas de incubação a 37 °C com a mistura de transfecção, o meio das células foi trocado por MEM contendo 10% de soro fetal bovino. As células foram incubadas por mais 24 horas, quando foram analisadas quanto à localização da proteína de fusão. O ensaio de localização foi repetido duas vezes.

3.6.3.2. Transfecção de células Vero

Para o ensaio de atividade do promotor de *ISG95*, células Vero em placas de 24 *wells* com aproximadamente 80% de confluência foram transfectadas utilizando-se *Lipofectamine 2000* (Invitrogen). Todo teste foi realizado em triplicatas, com duas repetições. Para cada transfecção utilizou-se 0,2 µg do plasmídeo pGFP-C2, adicionado ao *mix* apenas para estimativa da eficiência de transfecção, 0,7 µg de um dos plasmídeos repórteres pP1551-SEAP, pP1100-SEAP, pP500-SEAP, pP185-SEAP, pISG15-SEAP ou pTAL-MARE e 2 µL de lipofetamina. A mistura de DNAs e lipofetamina teve seu volume completado para 50 µL com meio MEM sem soro e foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse período adicionaram-se mais 350 µL de MEM sem soro à mistura e incubou-se as células nessa solução por 5 horas a 37 °C. Após esse período o meio foi trocado por MEM contendo 10% de soro fetal bovino e as células incubadas por mais 24 horas, quando então se realizou o ensaio de atividade.

3.6.3.3. Transfecção de células Sf9 e geração do vírus recombinante

A transfecção de Sf9 foi realizada pelo método mediado por lipossomos catiônicos. Para cada transfecção foi utilizada uma placa com poços de 35 mm (área 9,61 cm²) contendo 2 x 10⁶ células Sf9 (*Baculovirus Expression Vector System*, 1999). Inicialmente são misturados em um *ependorf* 0,5µg do DNA *Baculogold* e 5,5 µg de pVL1393-HisISG95. O controle positivo de transfecção foi feito com 0,5µg do DNA *Baculogold* (BD Biosciences) e 2 µg de pVL1392-XylE. A suspensão de DNAs (transfecção e controle positivo) foi incubada por 5 minutos. Adicionou-se então a cada *ependorf* 15 µg da solução de DOTAP (SIGMA) e incubou-se por 15 minutos para permitir a formação das micelas. As células foram lavadas três vezes com meio sem soro. Adicionou-se então a cada *ependorf* 175 µL de meio IPL-41 sem soro e gotejou-se essa solução diretamente sobre as células lavadas. A placa de transfecção foi agitada levemente, adicionou-se 800 µL de meio IPL-41 sem soro e incubou-se ON (*overnight*) a 27°C. Após esse

período o meio de cultura foi trocado por meio contendo 10% de soro e as placas de infecção foram incubadas a 27°C por 4 dias, verificando-se diariamente quanto ao aparecimento de sinais de infecção, comparando-se ao controle não transfectado. Os sinais de infecção incluem alteração no fenótipo das células, que aumentam de volume ou tornam-se mais alongadas, além da parada no crescimento celular. Uma vez dentro da célula o plasmídeo pVL1393-HisISG95 deve sofrer recombinação com o DNA *Baculogold*, gerando um vírus recombinante viável contendo a sequência codificadora da proteína de fusão His-ISG95 sob controle do promotor da poliedrina. O vírus recombinante é capaz de se replicar e após a lise da célula hospedeira os vírus liberados no meio de cultura podem infectar as demais células Sf9 da placa.

Após o quarto dia o sobrenadante das placas de infecção foi coletado e utilizado para posteriores infecções (passagens) e conseqüente amplificação viral. As células também foram coletadas e analisadas quanto à expressão da proteína recombinante. Da terceira passagem em diante, as infecções foram coletadas no terceiro dia após a infecção (3pi), pois em 4pi a maior parte das células já se encontrava morta.

3.7. Análise da atividade do promotor do gene *ISG95*

3.7.1. Tratamento com IFN- α

A proteína ISG95 foi identificada sendo superexpressa em conjunto com diversas ISGs (*interferon stimulated genes*), porém em seu promotor não foi possível identificar uma sequência ISRE (*interferon-stimulated response element*), presente nos promotores de ISGs e responsável pela resposta à estimulação por IFN (Borden et al., 2007). Para a determinação da região do promotor de *ISG95* que seria usada para os testes de atividade, 5.000 pares de base (pb) acima do sítio de início de transcrição e 2.500 pb da sequência transcrita de *ISG95* foram alinhados com os ortólogos de chimpanzé, camundongo, rato, *D. melanogaster* e *C. elegans* através da ferramenta mVISTA (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>). Com base nos resultados do alinhamento com os ortólogos, quatro extensões do promotor de *ISG95* foram clonadas de forma a controlar a expressão do gene repórter SEAP (*secreted alkaline phosphatase*). Essas construções, assim como o controle positivo e negativo do teste, foram transfectadas em células da linhagem Vero (derivada de rim de *Cercopithecus aethiops*, uma espécie de macaco africano) devido ao fato desta ser capaz de responder à estimulação por IFN- α , mas não ser capaz de produzi-lo (Diaz et

al., 1988). As células utilizadas no ensaio foram gentilmente cedidas pela Profa Maria Silvia Viccari Gatti, do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP. Para a realização do ensaio, 24 horas após a transfecção foram coletados 50 µL do sobrenadante de meio de cultura, correspondentes à amostra não induzida e, em seguida, adicionou-se ao meio IFN- α (*Biosource*) para concentração final de 1.000 UI/ mL. As células foram tratadas com IFN- α por 24 horas, após as quais foram coletados 50 µL do sobrenadante de meio de cultura (para onde o repórter SEAP deve ser secretado), referentes à amostra induzida.

3.7.2. Teste de atividade do repórter SEAP

O teste de atividade do repórter SEAP foi realizado através da incubação do sobrenadante do meio de cultura, para onde a proteína repórter deve ser secretada, e o substrato *4-methylumbelliferyl phosphate* (MUP), sendo o produto dessa reação fluorescente. Através da medida de intensidade de fluorescência do produto gerado infere-se a quantidade de enzima presente no sobrenadante de cultura, de forma que quanto maior a indução do promotor pelo tratamento com IFN- α , maior a expressão do repórter e, conseqüentemente, maior a intensidade da fluorescência.

Para o teste de atividade de SEAP (*Great EscAPE SEAP User Manual, 2005*) foram adicionados 25 µL de *Dilution Buffer* aos 25 µL sobrenadante de cultura e a mistura foi incubada a 65 °C por 30 minutos e então no gelo por 5 minutos. As amostras foram então equilibradas à temperatura ambiente e adicionou-se ao ensaio 97 µL de *Alkaline Phosphatase Buffer* (150 mM Tris-HCl pH 9,5; 150 mM NaCl; 7,5 mM MgCl₂) e 3 µL de *Dilution Buffer* contendo MUP 1 mM (4-methylumbelliferyl phosphate), substrato da fosfatase. A reação foi então incubada à temperatura ambiente por 90 minutos, após os quais se realizou a medida de fluorescência a 449 nm (emissão) em Fluorímetro K2 (ISK, Urbana, IL, USA). O ensaio foi realizado em triplicatas, com duas repetições.

3.8. Análise da localização sub-celular de ISG95

3.8.1. Fusão a GFP (*green fluorescent protein*)

Células HeLa crescendo em lamínulas e transfectadas com pGFP-ISG95 ou pEGFP-C2 (controle negativo) foram analisadas quanto à localização sub-celular da fusão GFP-ISG95 ou do controle GFP em microscópio de fluorescência, 24 horas após a transfecção. Para isso as células aderidas às lamínulas foram lavadas duas vezes com uma solução de PBS 1X (*phosphate buffer*

saline, 3.2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl, pH 7.4) contendo 100 µM CaCl₂ e 500 µM MgCl₂ a 37 °C por 5 minutos. As células foram em seguida fixadas em uma solução de paraformol 2% (Sigma) por 20 minutos a 37°C e em seguida lavadas duas vezes com PBS 1X por 5 minutos, também a 37 °C. As células foram permeabilizadas com 0,3% triton X-100 em PBS por 10 minutos à temperatura ambiente e lavadas três vezes com PBS 1X por 5 minutos. Em seguida montou-se as lâminas com 30 µL de uma solução de 75% glicerol, PBS 1X e 0,005 µg/µL DAPI e realizou-se a análise microscópio óptico de fluorescência (Nikon Eclipse TS100) com aumento de 400 vezes.

3.8.2. Fracionamento celular e *Western Blot*

Para a confirmação da localização nuclear de ISG95 realizou-se um *Western Blot* utilizando extratos nuclear e citoplasmático de células HeLa (Mayeda e Krainer, 1999). Para o fracionamento celular as células foram inicialmente lavadas com PBS 1X e, em seguida, ressuspensas em tampão A (10 mM HEPES-KOH pH 8,0; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 1 mM DTT). O volume de tampão A utilizado deve corresponder a cinco vezes o volume de células em processo de fracionamento. A suspensão foi incubada no gelo por 10 minutos, após os quais foi centrifugada a 1.800 g por 10 minutos a 4 °C. O *pellet* foi ressuspensão em dois volumes de tampão A e homogeneizado com 10 *strokes* no homogeneizador Dounce. Após nova centrifugação a 1.200 g por 10 minutos a 4 °C o sobrenadante, referente ao extrato citoplasmático (S100), foi separado para subsequente tratamento e, o *pellet*, referente ao núcleos intactos, foi novamente centrifugado a 33.000 g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante dessa centrifugação foi descartado e estimou-se o volume de núcleos obtido. Adicionou-se então tampão C (20 mM HEPES-KOH pH 8,0; 0,6 M KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA; 25% glicerol; 1 mM DTT, inibidor de protease) de forma a se obter 0,24 M KCl como concentração final. Os núcleos foram homogeneizados com 10 *strokes* no homogeneizador Dounce e misturados por inversão por 45 minutos a 4 °C. O extrato nuclear foi então centrifugado a 33.000 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante dializado em 200 mL de tampão D (20 mM HEPES-KOH pH 8,0; 100 mM KCl; 0,2 mM EDTA; 20% glicerol; 1 mM DTT) por 16 horas a 4 °C. Para finalizar o tratamento do extrato citoplasmático este recebeu 0,11 volumes de tampão B (0,3 M HEPES-KOH pH 8,0; 1,4 M KCl; 30 mM MgCl₂), foi centrifugado a 100.000 g por 1 hora a 4

°C e o sobrenadante dializado em 200 mL de tampão D por 16 horas a 4 °C. Após as 16 horas de diálise, o tampão D foi trocado e os extratos nuclear e citoplasmático dializados por mais 4 horas a 4 °C, após as quais foram então submetidos a centrifugação a 33.000 g por 25 minutos a 4 °C sendo os sobrenadantes então aliquotados, submetidos a congelamento em nitrogênio líquido e estocados a -80 °C.

Após a corrida das amostras de extrato nuclear e citoplasmático em gel SDS-PAGE, foi realizada a transferência das proteínas do gel para uma membrana de PVDF (Polivinildifluoridina) Immobilon™-P (Millipore) através do sistema semi-seco de transferência (GE Healthcare). A transferência foi realizada por 1 hora a 40 mA. A membrana foi então bloqueada em TBST (20 mM Tris pH 7,0; 150 mM NaCl; 0,1% tween) contendo 3% de leite desnatado por 2 horas à temperatura ambiente. Utilizou-se o anticorpo para KIAA0082 (Bethyl) na diluição 1:5000, o anticorpo para RNA pol II (Santa Cruz) na diluição 1:200 e para actina (Santa Cruz) 1:500 na mesma solução usada para bloquear a membrana. O protocolo utilizado para a revelação dos experimentos utiliza anticorpos secundários conjugados à peroxidase. Utilizou-se *anti-rabbit IgG peroxidase linked* (GE Healthcare) na diluição 1:5000 como anticorpo secundário nas reações de *immunoblot* anti-KIAA0082 e anti-RNA pol II e o secundário *anti-mouse IgG peroxidase linked* (GE Healthcare) para *immunoblot* anti-actina. Para a revelação foi utilizando o kit comercial *ECL Plus Reagent* (GE Healthcare), e o filme impressionado foi revelado conforme instruções do fabricante (KODAK).

3.9. Expressão de proteínas recombinantes

3.9.1. Expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*

As diferentes estratégias utilizadas com o intuito de se obter a expressão solúvel de ISG95 ou de algum de seus domínios estão apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2: Combinações de cepas e plasmídeos testadas para a expressão solúvel de ISG95 ou de seus domínios N-terminal, C-terminal, guanililtransferase ou FtsJ, com ou sem fusão à MBP (*maltose binding protein*)

	Cepas			
	BL21-DE3 + pRARE	BL21-C41 + pRARE	BL21-C43 + pRARE	BL21-SI + pRARE
Vetores	pETEV-Nterm	pETEV-Nterm	pETEV-Nterm	pETEV-Nterm
	pETEV-Cterm	pETEV-Cterm	pETEV-Cterm	pETEV-Cterm
	pETEV-guanilil	pETEV-guanilil	pETEV-guanilil	pETEV-guanilil
	pETEV-FtsJ	pETEV-FtsJ	pETEV-FtsJ	pETEV-FtsJ
	pETEV-ISG95	pETEV-ISG95	pETEV-ISG95	pETEV-ISG95
	pETEV-MBP-Nterm			
	pETEV-MBP-guanilil			
	pETEV-MBP-FtsJ			
	pETEV-MBP-ISG95			

O plasmídeo pRARE (Novagen) codifica para tRNAs contendo anticodons para codons raros em *E. coli* e foi utilizado no intuito de melhorar os níveis de expressão das proteínas de interesse nas diferentes cepas.

Os experimentos de indução das proteínas de fusão a hexa-histidina foram realizados em meio LB contendo os antibióticos necessários (Sambrook et al., 1989). Foram realizados testes de expressão a 37 °C e a 25 °C. As células foram cultivadas a 37°C a 200 rpm até alcançarem DO₆₀₀ entre 0,8 e 1,0 e, então, a expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de 0,5 mM IPTG (*isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside*) ao meio de cultura. No caso da indução a 25 °C, após o período de crescimento a 37 °C, a cultura passou a ser incubada a 25 °C

e então se induziu a expressão da proteína recombinante pela adição de 0,5 mM IPTG. Após 4 horas de indução as células foram coletadas por centrifugação a 6.000 rpm por 10 min a 4°C.

A indução das proteínas de fusão a MBP foi realizada em meio LB contendo glicose 0,2% com o objetivo de reprimir os genes de maltose presentes em *E. coli*, entre eles a amilase que posteriormente seria danosa à resina de amilose durante o processo de purificação.

3.9.2. Expressão de proteínas recombinantes em células de inseto Sf9

3.9.2.1. Teste de concentração viral

Após a obtenção do vírus recombinante, com o gene *ISG95* sob controle do promotor da poliedrina, foi necessária a realização de um teste de concentração viral (*Baculovirus Expression Vector System*, 1999). O objetivo é determinar qual diluição do sobrenadante de infecção (meio de cultura contendo partículas virais, proveniente de uma infecção anterior) resulta em maior produção de proteína ISG95 recombinante.

O teste foi realizado com diluições do sobrenadante de infecção e um controle negativo. Para isso uma placa de 6 *wells* foi semeada com $3,2 \times 10^5$ células Sf9/ poço. Cada poço contendo 1 mL de meio IPL-41 com 10% de soro recebeu então volumes diferentes do sobrenadante de infecção. No caso, o teste foi realizado com 200 µL, 100 µL, 50 µL, 10 µL e 5µL da solução de vírus. Além disso, uma placa, correspondente ao controle negativo, não recebe o sobrenadante de infecção. Incubou-se a placa de infecção a 27°C por 3 dias e, após esse período, as células foram coletadas para análise da expressão de ISG95, ou seja, para determinação da diluição que produziu a maior quantidade de proteína recombinante.

As amostras foram analisadas por *Western Blot* e, para isso, após a corrida em gel SDS-PAGE foram transferidas para membrana de PVDF (Polivinildifluoridina) Immobilon™-P (Millipore) através do sistema semi-seco de transferência (GE Healthcare). A transferência foi realizada por 1 hora a 40 mA e em seguida a membrana foi bloqueada em solução de TBS (NaCl 150 mM; Tris pH 7,0 20 mM) contendo 3% de Albumina (SIGMA) por 1 hora à temperatura ambiente. A membrana foi então lavada com TBS e incubada à temperatura ambiente por 2 horas sob agitação com o anticorpo para hexa-histidina (GE Healthcare) na diluição 1:5000. Novamente lavou-se a membrana em TBS e, então, esta foi incubada por 2 horas sob agitação à temperatura ambiente com o anticorpo secundário *anti-mouse-IgG alkaline phosphatase linked*

(GE Healthcare) na diluição de 1:5000. Após nova lavagem com TBS a revelação foi realizada em 10 mL de tampão para fosfatase alcalina (100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 100 mM Tris-HCl pH9,5) contendo 33 µL de BCIP (*5-Bromo-4-Cloro-3-Inolyl Phosphate*, SIGMA) e 66 µL de NBT (*nitroblue tetrazolium*, SIGMA) até o aparecimento das bandas. A membrana foi então bloqueada com TBS contendo 10 mM EDTA por 15 min.

3.9.2.2. Teste de período ótimo de indução após infecção

Realizou-se um teste para determinação do período ótimo de expressão da proteína recombinante após a infecção de Sf9. Para isso foram utilizadas quatro garrafas com áreas individuais de 25 cm², com aproximadamente 70% de confluência celular. Cada garrafa foi infectada com 250 µL de sobrenadante de infecção, já que o teste de concentração viral determinou uma proporção de 10 µL de sobrenadante de infecção por cm² de área. Foi coletada uma garrafa por dia, a partir do primeiro dia após a infecção (1pi) até o quarto dia (4pi) e o extrato das células coletadas foi analisado por *Western Blot* anti-KIAA0082 para a determinação do período ótimo de incubação das células após a infecção para a produção máxima de proteína recombinante.

3.9.2.3. Infecção de Sf9 em larga escala

As condições ótimas de expressão de ISG95 em Sf9 foram obtidas com dois dias de incubação a 27°C, após a infecção das células com a diluição viral de 10 µL por cm² de área. Nessas condições obteve-se a expressão solúvel de ISG95. Porém, a quantidade de proteína produzida é pequena. Para que se obtenha quantidade de proteína suficiente para os ensaios de atividade foram realizadas infecções em larga escala de Sf9. Assim, quatro garrafas contendo 200 mL de meio foram incubadas a 27°C por 2 dias num sistema de rotação contínua para amplificação do número de células. Após esse período foram adicionados 200 mL de meio fresco e 13 mL do sobrenadante de infecção, o que deu início à expressão da proteína recombinante. Tendo em vista que a purificação de ISG95 a partir do extrato das células Sf9 não resultou em um grau de pureza adequado, foi preciso expressar um controle negativo para os testes de atividade posteriores. Dessa forma, foi necessário obter um extrato adicional, de expressão de uma proteína não-relacionada, passando pelos mesmos padrões de purificação, para obter as proteínas contaminantes da purificação de His-ISG95 em um extrato sem a proteína de interesse,

que foi utilizado então como controle negativo em todos os posteriores testes de atividade. Para isso foi realizada, em paralelo, a expressão da proteína His-STC1 (staniocalcina 1, uma glicoproteína secretada com possível papel na regulação do transporte de cálcio e fosfato nos intestinos e rins) cujo sobrenadante de infecção foi cedido por Daniel Maragno Trindade, aluno de doutorado do laboratório sob orientação do Dr. Jörg Kobarg. Para a expressão de STC1 utilizou-se se 1 mL do sobrenadante de infecção para 75 mL de meio de cultura, ou seja, 4,15 μ L do sobrenadante viral por cm^2 de área.

3.10. Purificação de proteínas recombinantes

3.10.1. Purificação a partir de extratos de *E. coli*

3.10.1.1. Preparação dos extratos para os testes de purificação

A lise foi realizada ressuspendendo-se as células em tampão, adicionando-se 0,4 mg de lisozima por grama de células e incubando-se por 30 min no gelo. Após esse período a solução passou por 8 ciclos de 20 seg de sonicação e foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min a 4°C. O *pellet*, correspondente aos corpos de inclusão foi separado para posterior tratamento e o sobrenadante, correpondente ao extrato solúvel foi novamente centrifugado a 30.000g por 10 min a 4°C. O tampão utilizado para a preparação dos extratos varia de acordo com o método de purificação escolhido. Nos casos em que o extrato foi preparado apenas para análise em gel de poliacrilamida da expressão das proteínas recombinantes, utilizou-se o tampão de extrato (20 mM Tris- HCl pH 7,4; 300 mM NaCl). No caso do extrato ser submetido a uma coluna de afinidade a níquel, as células foram lisadas em tampão de afinidade (50 mM fosfato de sódio pH 7,2; 5% glicerol; 100mM NaCl).

Os extratos das proteínas de fusão a MBP foram preparados em tampão contendo Tris-HCl pH 7,4 20 mM; NaCl 200 mM; DTT 1 mM e lisados por congelamento ON (*overnight*) seguido de 20 ciclos de sonicação de 20 seg.

3.10.1.2. Teste de purificação por afinidade a metal imobilizado das proteínas de fusão à hexa-histidina

Foram realizados ensaios de purificação por cromatografia de afinidade utilizando-se as resinas Ni-NTA *Superflow* (Quiagen) e *HiTrap Chelating* (GE Healthcare) durante a análise do extrato total referente à expressão dos clones pETEV-ISG95, pETEV-Nterm, pETEV-guanilil,

pETEV-FtsJ e pETEV-Cterm. Após a ligação das proteínas de interesse na resina esta foi lavada com tampão de afinidade (50 mM fosfato de sódio pH 7,2; 5% glicerol; 100mM NaCl) e a eluição foi realizada em tampão de afinidade contendo concentrações crescentes de imidazol.

3.10.1.3. Testes de purificação das proteínas de fusão a MBP

3.10.1.3.1. Cromatografias de afinidade

3.10.1.3.1.1. Afinidade a amilose

As diferentes fusões a MBP testadas foram incubadas em a resina de amilose (New England BioLabs) e a eluição da proteína de fusão ligada à resina foi realizada no mesmo tampão de ligação (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 200 mM NaCl; 1 mM DTT), porém contendo concentrações crescentes de maltose, inicialmente de 10 mM a 50 mM. Testes foram realizados para a eluição da proteína ligada à resina com até 500 mM de maltose. Alterou-se também o tampão de ligação para 20 mM Tris-HCl pH 8,6; 200 mM NaCl; 10% glicerol; 1 mM DTT e 0,5 mM EDTA e realizou-se a eluição numa única fração de 1,5 mL pela incubação da resina em tampão contendo maltose 200 mM.

3.10.1.3.1.2. Afinidade a níquel

O extrato da indução da proteína de fusão MBP-ISG95 foi ressuspense em tampão de afinidade modificado (50 mM fosfato de sódio pH 8,6; 150 mM NaCl e 5% glicerol) e aplicado em colunas *HiTrap Chelating* de 5 mL (GE Healthcare). A eluição foi realizada com gradiente de 50 mL de 0 a 100% de tampão B (tampão de afinidade modificado contendo 300 mM imidazol).

3.10.1.3.2. Cromatografias de troca iônica

3.10.1.3.2.1. Cromatografia em DEAE-Sepharose

O extrato de 1 litro de indução da proteína de fusão MBP-ISG95 foi ressuspense em tampão DEAE (20 mM Tris-HCl pH 8,6; 50 mM NaCl; 5% glicerol; 1 mM DTT; 0,1 mM MgCl₂). Utilizou-se uma resina de 15 mL e um gradiente linear de 300 mL de 0 a 100% de tampão B (20 mM Tris-HCl pH 8,6; 1 M NaCl; 5% glicerol; 1 mM DTT; 0,1 mM MgCl₂).

3.10.1.3.2.2. Cromatografia em Q-Sepharose

O extrato correspondente a 1 litro de indução da proteína de fusão MBP-ISG95 foi ressuspense em tampão A (20 mM CAPS pH 10,1; 5% glicerol; 1 mM DTT; 0,1 mM MgCl₂) e

injetado em uma coluna Q-Sepharose de 15 mL. O gradiente linear de 75 mL vai de 0 a 100% de tampão B (20 mM CAPS pH 10,1; 1 M NaCl; 5% glicerol; 1 mM DTT; 0,1 mM MgCl₂).

3.10.1.3.2.3. Cromatografia em SP-Sepharose

O extrato correspondente a 1 litro de indução da proteína de fusão MBP-ISG95 foi ressuspensão em tampão A (20 mM acetato de sódio pH 5,0; 5% glicerol; 0,5 mM DTT; 0,1 mM MgCl₂). Utilizou-se uma coluna de 10 mL e o gradiente linear de 0 a 100% de Tampão B (20 mM acetato de sódio pH 5,0; 1 M NaCl; 5% glicerol; 0,5 mM DTT; 0,1 mM MgCl₂).

3.10.1.3.3. Cromatografia de exclusão molecular

Como a proteína MBP-ISG95 possui alto peso molecular, de aproximadamente 130 kDa, optou-se por uma gel filtração para a separação dos contaminantes da amostra obtida após a renaturação dos corpos de inclusão da proteína de fusão. Para isso a amostra renaturada foi concentrada por centrifugação até 9,5 mg/mL (Amicon Ultra – 4 5,000 MWCO, Millipore) e injetada na coluna Superdex 200 16/ 60. A cromatografia foi realizada em 90 mL com tampão superdex (20 mM Tris-HCl pH 8,6; 150 mM NaCl; 5% glicerol; 1 mM DTT; 0,1 mM MgCl₂)

3.10.1.3.4. Digestão com a protease TEV

Foi realizado um teste de digestão da proteína de fusão ligada à resina de amilose com a protease do vírus TEV, no intuito de liberar a proteína de interesse da resina já que as tentativas de eluição não demonstraram resultados positivos. Para isso a resina de amilose, contendo a proteína de fusão associada, foi ressuspensa em tampão de clivagem (50 mM Tris-HCl pH8,0; 100 mM NaCl; 10% glicerol; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT) e adicionou-se 0,9 mg de protease do vírus TEV. A reação foi incubada à temperatura ambiente por 5 horas em agitador giratório.

3.10.1.4 Testes de renaturação de proteínas *in vitro*

O tratamento dos corpos de inclusão se dá através da suspensão dos mesmos em tampão L (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 25% sacarose; 2% triton X-100) seguido por 10 ciclos de 20 segundos de sonicação e centrifugação a 10.000g por 5 min a 4°C.

Foram realizados testes de renaturação com os corpos de inclusão do domínio guanililtransferase de ISG95 por dois métodos. Primeiramente os corpos de inclusão foram ressuspensos por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação em tampão de desnaturação (50 mM de Tris-HCl pH8,0; 8 M de uréia) numa concentração de 50 mg/mL. Após esse período a

solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min e gotejou-se o sobrenadante em 500 mL de tampão de renaturação (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM MgCl₂). A solução de renaturação foi agitada a 4°C por 16 horas e posteriormente foi purificada por afinidade em 1 mL de resina Ni-NTA num fluxo de 0,5 mL/min. Outro teste de renaturação foi realizado através da técnica de diálise e nesse caso adicionou-se 5 mM de DTT ao tampão de desnaturação e 0,2 mM de DTT ao tampão de renaturação. A desnaturação foi realizada a 50 mg/mL por 1 hora à temperatura ambiente. Após esse período a solução de proteína desnaturada foi diluída 1 vez, alcançando a concentração de 4 M de uréia e então foi dialisada por 16 horas a 4°C sob agitação em 2 litros do tampão de renaturação. A solução de proteína renaturada foi então centrifugada a 14.000 rpm por 10 min e concentrada 10 vezes para análise em gel de poliacrilamida.

Os corpos de inclusão da proteína de fusão MBP-ISG95 foram ressuspensos em tampão de lavagem (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2% triton X-100), submetidos a 10 ciclos de sonicação de 20 segundos e centrifugados a 18.000 rpm por 15 min. Os corpos de inclusão foram então ressuspensos em tampão 2 de lavagem (50 mM Tris-HCl pH 8,6; 5 mM DTT; 1 M uréia) e centrifugados novamente. A desnaturação foi realizada em tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 8,6; 5 mM DTT e 8 M uréia sob agitação à temperatura ambiente por 1 hora. Após esse período o material desnaturado foi centrifugado a 18.000 rpm por 15 min para remoção do material insolúvel e a fração solúvel foi colocada em sacos de diálise (Spectra/por Membrane MWCO 12-14,000) e dialisada por 16 horas a 4 °C sob agitação em tampão de renaturação (20 mM Tris-HCl pH 8,6; 100 mM NaCl; 5% glicerol; 1 mM DTT; 0,1 mM MgCl₂). A renaturação rendeu quantidade considerável de proteína parcialmente pura.

3.10.2. Purificação de proteínas recombinantes de células de inseto

3.10.2.1. Tratamento dos extratos de células Sf9

As células Sf9 foram desprendidas da parede das garrafas de cultivo por simples agitação do meio de cultura. Posteriormente, foram centrifugadas a 1.500 g por 5 minutos a 4°C. O *pellet* celular foi então ressuspenso em 20 mL de tampão de lise (50 mM fosfato de sódio pH 7,2; 250 mM NaCl; 1% nonidet P-40). Ao tampão de lise adiciona-se uma mistura de inibidores de protease (Roche). As células foram incubadas no gelo por 30 minutos e então sonicadas 5 vezes

por 10 segundos. O extrato foi então centrifugado a 10.000g por 20 minutos e o sobrenadante obtido utilizado para a purificação.

3.10.2.2. Purificação de ISG95 dos extratos de Sf9

3.10.2.2.1. Cromatografia de afinidade a metal imobilizado

O extrato solúvel referente à expressão de ISG95 foi injetado em coluna *HisTrap Crude* 1mL (GE Healthcare). A coluna foi lavada com 20 mL de tampão A (50 mM fosfato de sódio pH 7,2; 10% glicerol; 100 mM NaCl; 0,5% igepal; 1 mM MgCl₂; 5 mM β-mercaptoetanol; 5 mM imidazol) e realizou-se um gradiente de 20 mL de 0 a 100% de tampão B (50 mM fosfato de sódio pH 7,2; 10% glicerol; 100 mM NaCl; 0,5% igepal; 1 mM MgCl₂; 5 mM β-mercaptoetanol; 350 mM imidazol), com frações de eluição de 0,5 mL. As frações contendo a proteína de interesse foram então submetidas à diálise em tampão contendo 20 mM fosfato de sódio pH 7,2; 10% glicerol; 50 mM NaCl; 0,5% igepal; 1 mM MgCl₂; 10 mM β-mercaptoetanol para em seguida serem utilizadas num segundo passo de purificação em coluna de troca iônica.

No caso da purificação do extrato de expressão da proteína controle STC1 o procedimento de purificação utilizado foi o mesmo e as frações submetidas à diálise foram as correspondentes às dialisadas na purificação de ISG95.

3.10.2.2.2. Cromatografia de troca iônica

Após a diálise das frações obtidas na cromatografia de afinidade a amostra foi centrifugada a 17.000 rpm por 20 min a 4°C e injetada em resina Mono Q de 1 mL (GE Healthcare). A coluna foi lavada com 20 mL de tampão A (20 mM fosfato de sódio pH 7,2; 10% glicerol; 50 mM NaCl; 0,5% igepal; 1 mM MgCl₂; 10 mM β-mercaptoetanol) e realizou-se um gradiente de 20 mL de 0 a 100% de tampão B (20 mM fosfato de sódio pH 7,2; 10% glicerol; 1 M NaCl; 0,5% igepal; 1 mM MgCl₂; 10 mM β-mercaptoetanol), com frações de eluição de 0,5 mL. A proteína de interesse elui com aproximadamente 150 mM de NaCl e nessas condições foi aliquoteada e submetida a congelamento em nitrogênio líquido, com posterior estocagem a -70°C.

3.11. Caracterização bioquímica da ISG95 recombinante

3.11.1. Ensaio de atividade trifosfatase

A atividade de trifosfatase consiste na liberação de um fosfato inorgânico (Pi) a partir do substrato ATP (Deshpande et al., 1999; Martins e Shuman, 2000; Bisaillon e Shuman, 2001; Changela et al., 2001; Martins e Shuman, 2002; Gong e Shuman, 2003; Martins e Shuman, 2003). Para a realização deste teste utilizou-se 0,4 µg da proteína ISG95 purificada, ou do controle negativo da purificação de STC1 obtido nas mesmas condições, e 0,5 µCi de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP em tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 2 mM DTT. O ensaio foi realizado a 37 °C e foram testados competidores, como 25 µM, 50 µM e 100 µM de ATP e 50 µM de GTP. O controle positivo do teste foi feito com 1 UI de CIAP (*calf intestinal alkaline phosphatase*) e o controle negativo utilizado foi uma reação onde não se acrescentou nada além do tampão ao $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. A reação foi interrompida pela adição de EDTA para uma concentração final de 20 mM. Uma alíquota da reação foi colocada numa placa de TLC (*thin layer chromatography*) de celulose PEI (*poli-etileno imina*) com fase móvel 1 M ácido fórmico e 0,75 M cloreto de lítio. Após a cromatografia a placa de TLC foi secada e a liberação de ^{32}Pi foi quantificada no Phosphoimager Fuji BAS 1800 II através da leitura do IP (*image plate reader*) exposto.

Foi realizado também um ensaio de cinética com triplicatas para análise da atividade de trifosfatase de ISG95. Como controle negativo do ensaio foi utilizada uma fração correspondente à de ISG95, porém advinda da purificação da proteína não-relacionada STC1. O ensaio foi realizado com 0,08 µg de proteína e 0,5 µCi de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP a 37 °C e amostras foram retiradas após 0, 10, 20, 30, 45 e 60 minutos. Os valores obtidos foram normalizados através da repetição de um mesmo ponto em todas as placas TLC. Foram realizadas 2 repetições do ensaio.

3.11.2. Ensaio de atividade guanililtransferase

Proteínas que possuem atividade de guanililtransferase hidrolizam GTP e formam uma ligação covalente com GMP, dando origem a um complexo enzima-guanilato (Ahola e Kaariainen, 1995; Hausmann et al., 2001; Magden et al., 2001; Sawaya e Shuman, 2003; Takagi et al., 2003) e liberando Pi. Posteriormente transferem o GMP à extremidade 5' do mRNA nascente. Dessa forma o ensaio realizado para identificar guanililtransferases consiste em incubar a enzima com $\alpha^{32}\text{P}$ -GTP e analisar a marcação radioativa da proteína de interesse em gel de

poliacrilamida desnaturante. Para a análise da atividade de guanililtransferase de ISG95 utilizou-se 0,2 µg da proteína purificada, 2,5 µCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -GTP e tampão de reação contendo 50 mM Tris-HCl pH7,5; 5 mM MgCl_2 e 5 mM DTT. A reação foi incubada no gelo por 30 minutos e terminada pela adição de 1 volume de tampão de amostra contendo 2% de β -mercaptoetanol. O controle negativo utilizado nesse teste foi um extrato de Sf9 não infectada. Além disso, foram feitos controles com competidores, como 2,5 mM EDTA e 30 µM de ATP, CTP e GTP. Os polipeptídios marcados são visualizados por auto-radiografia do gel seco utilizando o Phosphoimager Fuji BAS 1800 II.

Como não foi possível observar a formação do complexo covalente ISG95-GMP foi realizado um teste de GTP *crosslinking* com ISG95, para verificar se a proteína de interesse interagiu com GTP, mesmo que de forma não-covalente. Nesse caso o controle negativo utilizado foi a fração de eluição da purificação de STC1 correspondente à fração de ISG95 utilizada no ensaio. As reações foram realizadas como descrito para o teste de guanililtransferase, porém, após a incubação da proteína com $\alpha^{32}\text{P}$ -GTP adicionou-se um passo de exposição à UV (luz ultravioleta) por 30 minutos a 10 cm de distância. Em seguida a reação foi terminada como descrito anteriormente e analisada por auto-radiografia do gel seco.

3.11.3. Ensaio de interação com RNA

3.11.3.1. Transcrição *in vitro*

Para o teste de interação foi realizada a transcrição *in vitro* de um RNA de 75 bases marcado com $\alpha^{32}\text{P}$ -GTP, a partir do vetor pETEV (5' GAU AUC CCC UUA ACA CUC GCC UAU UGU UAA GGG GAG AUC UUU UAU UAA AAC AAA UUG AAA UUC UUC CTC TAU AUG 3'). A reação de transcrição foi realizada com 0,5 µg do template linearizado com NcoI, 1 mM de cada um dos ribonucleotídeos ATP, CTP e UTP, 5 mM de DTT, tampão de reação (40 mM Tris pH 8,0; 8 mM MgCl_2 ; 2 mM spermidina-(HCl)₃; 25 mM NaCl; 5 mM DTT) e 50 µCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -GTP. Equilibra-se a reação a 37 °C por 10 minutos e então se adicionam 50 Unidades de T7 RNA polimerase (Invitrogen). A reação de transcrição foi então incubada por 1 hora a 37 °C e após esse período teve seu volume completado para 50 µL com tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 7,5 e 10 mM MgCl_2 . Recebeu então 0,5 µg de DNase e foi incubada à mesma temperatura por 10 minutos para a digestão do DNA *template*. Em seguida a reação foi

interrompida incubando-se a 65 °C por 10 minutos. A purificação do RNA marcado foi realizada em coluna G50 (GE Healthcare).

Realizou-se também a transcrição do mesmo RNA, porém agora marcado com biotina, para ensaios de interação com ISG95 em resina Streptavidina-Sepharose (GE Healthcare). Para isso novamente utilizou-se como DNA *template* 0,5 µg do vetor pETEV linearizado com NcoI, 1 mM de cada um dos ribonucleotídeos ATP, GTP, UTP, 5 mM de DTT, tampão de reação (40 mM Tris pH 8,0; 8 mM MgCl₂; 2 mM spermidina-(HCl)₃; 25 mM NaCl; 5 mM DTT), 2 mM biotin-14-CTP (Invitrogen) e 0,5 mM CTP. Após o período de equilíbrio a 37 °C foram adicionadas 50 Unidades de T7 RNA polimerase. Deste ponto em diante a processo é idêntico ao descrito pra a síntese do RNA radioativo.

3.11.3.2. Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada para os experimentos de co-imunoprecipitação e metilação. Para a extração de RNA inicialmente adicionou-se 1 volume de fenol pré-aquecido a 65 °C e incubou-se a extração nessa mesma temperatura por 10 minutos, agitando-se em vórtex por 1 minuto periodicamente. A reação foi então incubada por 2 minutos no gelo e centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos. As fases foram então separadas e repetiu-se a extração com fenol mais duas vezes. Adicionou-se então 1 volume de *chloroform* (50% fenol, 50% clorofórmio, equilibrados em tampão ANE - 10mM acetato de sódio pH 6,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA) à fase orgânica, agitou-se em vórtex por 3 minutos e então centrifugou-se novamente a 13.000 rpm por 10 minutos. Adicionou-se 20% do volume de acetato de sódio pH 5,3 e repetiu-se a extração com *chloroform*. Para a precipitação foram adicionados 2 volumes de etanol 100%, a reação foi incubada a 20 °C negativos por 16 horas e centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos. O *pellet* de RNA precipitado foi lavado com 1 volume de 75% etanol agitando-se em vórtex por 5 minutos. Após nova centrifugação o *pellet* foi secado e ressuspensão em água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato).

3.11.3.3. Ensaio de retardo de mobilidade eletroforética de RNA (EMSA) e RNA *crosslinking*

O ensaio de interação proteína-RNA (EMSA, *electrophoretic mobility shift assay*) foi realizado em tampão contendo 50 mM de Tris-HCl pH 8,0; 10 mM β-mercaptoetanol; 5% de

glicerol; RNA marcado transcrito *in vitro* a partir do DNA *template* pET28a (20.000 cpm) e diferentes concentrações de ISG95, de 1 a 4 µg (Higman et al., 1994). A reação foi mantida no gelo por 30 minutos e aplicada em gel de acrilamida 6% não-desnaturante. Após a corrida o gel foi secado e analisado por auto-radiografia.

A reação de *crosslinking* foi realizada nas mesmas condições que para o EMSA descrito acima, porém após a incubação por 30 minutos no gelo as reações foram expostas à luz ultravioleta (UV) por 30 min a 10 centímetros de distância. A análise do ensaio foi realizada em gel de acrilamida 8% desnaturante. Após a corrida o gel foi secado e analisado por auto-radiografia.

3.11.3.4. Ensaio de interação com RNA biotilado

Para a reação de interação utilizou-se 50 pmol de ISG95 purificada e 50 pmol de RNA biotilado. A reação foi incubada a 4 °C por 30 minutos. Após esse período adicionou-se 10 µL de resina de streptavidina imobilizada em agarose (GE Healthcare) já equilibrada em tampão de interação (50 mM fosfato de sódio pH 7,2; 10% glicerol; 100 mM NaCl; 0,5% igepal; 1 mM MgCl₂; 5 mM β-mercaptoetanol) e incubou-se novamente por 90 min a 4°C. A resina foi lavada extensivamente e a amostra ligada à resina foi eluída diretamente em tampão de amostra contendo 2% de β-mercaptoetanol.

3.11.3.5. Análise da interação de ISG95 com snRNA U2

3.11.3.5.1. Co-imunoprecipitação

No intuito de co-imunoprecipitar o snRNA U2 (*small nuclear RNA U2*) a partir do extrato total de HeLa através de sua possível interação com ISG95, inicialmente, incubou-se 1 µg do anticorpo para KIAA0082 (Bethyl) com 1,25 µg de ISG95 purificada em 20 µL de resina Proteína A-Sepharose (GE Healthcare) por 4 horas a 4 °C em tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 250 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5% igepal. Em seguida a resina foi lavada no mesmo tampão e incubada com o extrato total de HeLa por 16 horas a 4 °C. A resina foi então extensivamente lavada e teve o conteúdo de RNA extraído. Como controle negativo da co-imunoprecipitação foi realizada em paralelo uma reação utilizando 1 µg do anticorpo para MafB (Bethyl). Outro protocolo buscou imunoprecipitar ISG95 diretamente do extrato total de HeLa. Para isso o extrato total de HeLa foi incubado com 20 µL de resina Proteína A-Sepharose e 1 µg

do anticorpo para ISG95 por 16 horas a 4 °C e após extensiva lavagem da resina esta teve seu conteúdo de RNA extraído e analisado por *Northern Blot*.

3.11.3.5.2. Northern Blot

A amostra de RNA foi preparada para a análise por *Northern Blot* pela adição de 1 µL de tampão MOPS 10X (0,2 M MOPS; 50 mM acetato de sódio; 10 mM EDTA; pH7,0); 3,5 µL de formaldeído; 10 µL de formamida; 2,5 µg de brometo de etídio e 2 µL de RNA *loading buffer* (40% sucrose, 0.025% *Bromophenol blue*). As amostras foram submetidas a uma corrida em gel de agarose 1% em tampão MOPS 1X contendo 5% de formaldeído por 2 horas a 90 Volts. Para a transferência do RNA para a membrana de nitrocelulose (Hybond N, GE Healthcare) inicialmente lavou-se o gel em água tratada com DEPC, em seguida por 20 minutos em 0,05 M NaOH, em água novamente e então por 20 minutos em SSC 20X (0.3 M citrato de sódio pH 7.0; 3M NaCl). A membrana também foi lavada em água tratada com DEPC por 30 minutos e em SSC 20X por 5 minutos. Realizou-se a transferência do RNA para a membrana de nitrocelulose por 16 horas em SSC 20X. Após a transferência a membrana teve o RNA fixado pela exposição à luz ultravioleta (UV) por 3 minutos. Iniciou-se então o tratamento da membrana através de sua incubação em solução de pré-hibridização (50% formamida, SSC 5X, solução Denhardt's 5X, 50 mM fosfato de sódio pH 6,8, 0,1% SDS, 1 mg/mL DNA carreador de fita simples) por 4 horas a 37 °C. A hibridização foi realizada por 16 horas a 37 °C em solução de hibridização (50% formamida, SSC5X, 20 mM fosfato de sódio pH 6,8, 0,1 % SDS, 5% sulfato de dextran). Para a hibridização utilizou-se 24 pmol de sonda marcada radioativamente com $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP. Para a marcação da sonda utilizou-se 25 µCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP numa reação com *forward buffer* 1X (50 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 0,1 mM espermidina; 0,1 mM EDTA) e 15 Unidades de T4 PNK (polinucleotídeo quinase, Fermentas) a 37 °C por 30 minutos. Imediatamente antes de sua adição à solução de hibridização a sonda marcada foi desnaturada incubando-se a 42 °C por 5 minutos e então no gelo por 2 minutos. Após o período de hibridização a membrana foi lavada sucessivamente com SSC 2X, SSC 2X contendo 0,05% SDS e finalmente com SSC 0,2X contendo 0,05% SDS. Após as lavagens a membrana foi exposta em filme (GE Healthcare) e este foi revelado conforme descrito no manual do fabricante (KODAK).

3.11.4. Ensaios de atividade de metiltransferase

3.11.4.1. Análise da interação de ISG95 a SAM (S-adenosilmetionina)

O ensaio de ligação à S-adenosilmetionina (SAM) foi realizado em resina EAH-Sepharose 4B (GE Healthcare). Para isso foi necessário realizar o acoplamento de SAM à resina, processo que se dá em baixos pHs e na presença de CMC (*N-cyclohexyl-N'-2-(4'-methyl-morpholinium) ethyl carbodiimide-p-toluene sulphonate*), resultando na formação de uma ligação peptídica entre um grupo amina da resina e um grupo carboxila da S-adenosilmetionina (SAM). Para isso, inicialmente, a resina foi lavada com 1 volume de água em pH 4,5; em seguida com 1 volume de 0,5 M NaCl e então duas vezes com 1 volume de água pH 4,5. O acoplamento foi então realizado a 4 °C por 90 minutos em uma solução com 0,03 M SAM na presença de CMC (SIGMA) numa concentração final de 0,1 M. O excesso de SAM foi então retirado da resina através de lavagens alternadas com 2 volumes de tampão contendo 0,1 M de acetato de sódio pH 4,5 e 0,5 M de NaCl e em seguida com tampão contendo 0,1 M de Tris-HCl pH 8,0 e 0,5 M de NaCl. As lavagens alternadas foram repetidas 3 vezes e então realizou-se uma lavagem com 2 volumes de água, após o que a resina foi então equilibrada em tampão de ligação (20 mM fosfato de sódio pH 7,2; 10% glicerol; 150 mM NaCl; 0,5% igequal; 1 mM MgCl₂; 10 mM β-mercaptoetanol).

Para o ensaio de interação a resina já equilibrada em tampão de ligação foi inicialmente bloqueada através da incubação por 16 horas a 4 °C com 2 volumes de BSA 0,2 mg/mL. A resina foi então lavada e incubada com 5 µg de ISG95 por 2 horas a 4 °C. A eluição de ISG95 da resina foi feita com uma solução de SAH (S-adenosil-L-homocisteína) a 1 mg/mL. O controle negativo do ensaio foi realizado em resina EAH-Sepharose 4B sem acoplamento de SAM.

3.11.4.2. Ensaio de metilação *in vitro*

Inicialmente 6,5 µg de ISG95 ou do controle negativo STC1 foram incubados com 10 µL de resina Heparina-Sepharose (GE Healthcare) em 100 µL de volume final em tampão contendo 20 mM fosfato de sódio pH7,2, 25 mM NaCl, 0,05% de igequal, 1 mM DTT e mistura de inibidores de protease (Roche) por 30 min a 4 °C. Em seguida a resina foi lavada extensivamente em tampão de metilação (25 mM Tris-HCl pH7,2, 2 mM EDTA e mistura de inibidores de protease). Para o ensaio de metilação a resina foi incubada então com 10 µg de MyBP (*myelin basic protein*) ou GST-SmD1 e 0,5 µCi de H³-SAM (GE Healthcare) por 90 minutos a 30 °C.

Após esse período separou-se o sobrenadante para posterior análise, lavou-se extensivamente a resina com tampão de metilação e por fim esta foi ressuspensa diretamente em tampão de SDS-PAGE. Foram analisadas as frações que não interagiram com a resina durante o ensaio de metilação, as lavagens e a resina ao final das lavagens.

Foram realizados também testes de metilação de RNA. Para isso foram testados dois substratos de metilação e duas condições de reação. Os substratos testados foram o pré-mRNA AdML transcrito *in vitro* a partir do plasmídeo AdML (cedido pela Dra. Robin Reed, Harvard Medical School) e o RNA total purificado de células HEK293. Um dos protocolos testados utilizou o mesmo tampão de metilação usado para o ensaio com substratos protéicos (25 mM Tris-HCl pH7,2, 2 mM EDTA e mistura de inibidores de protease), 5 µg de um dos substratos de RNA (pré-mRNA AdML ou RNA total de HEK293) e 2,5 µg de ISG95 ou do controle negativo STC1. Nesse caso a reação foi incubada a 30 °C por 45 minutos, quando então se realizou a extração do RNA contido na reação pelo método de fenol/clorofórmio, conforme descrito anteriormente. O segundo protocolo testado utilizou um tampão contendo 100 mM NH₄Cl; 10 mM MgCl₂; 40 mM hepes pH 7,6; 12 mM β-mercaptoetanol; 20% glicerol; 0,1% triton X-100. Nesse caso a reação foi incubada a 37 °C por uma hora. Após a extração do RNA este foi analisado em gel de 5,6% de poliacrilamida desnaturante em tampão TBE (89 mM Tris-HCl; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA).

3.12. Teste de complementação em *S. cerevisiae*

3.12.1. Construção das cepas condicionais para os genes *ABD1*, *CET1* e *CEG1*.

Os ensaios de complementação em levedura foram realizados através de uma estratégia semelhante à descrita por Ho e colaboradores em 2000 (Figura 11). Cepas diplóides de *Saccharomyces cerevisiae* com a deleção de um dos alelos dos genes *CET1* (*record number* 21064), *CEG1* (*record number* 24497), ou *ABD1* (*record number* 23376), foram adquiridas do projeto de deleção sistemática de ORFs (*Saccharomyces Genome Deletion Project*) através da empresa EUROSCARF (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>) e mantidas em meio YPD contendo 0,2 mg/mL de geneticina. Estes genes possuem atividades de trifosfatase (*CET1*), guanililtransferase (*CEG1*) e metiltransferase (*ABD1*), necessárias para a formação de *cap* em *S. cerevisiae*, sendo cada um deles de cópia única e essencial para a viabilidade celular.

As cepas *ABD1/Δabd1*, *CET1/Δcet1* e *CEG1/Δceg1* foram transformadas respectivamente com os plasmídeos YCpGAL1-*ABD1*, YCpGAL1-*CET1* e YCpGAL1-*CEG1* e plaqueadas em meio seletivo SC contendo 0,02 mg/mL de histidina e metionina, 0,03 mg/mL de leucina e lisina e 0,2 mg/mL de geneticina. Posteriormente, foi realizada a esporulação (Guthrie e Fink, 1991) das cepas diplóides transformadas para o *screening* de esporos contendo a cópia do gene em questão deletada no genoma e contendo o plasmídeo correspondente com a cópia selvagem do gene. Para tanto as cepas diplóides transformadas foram plaqueadas em meio de pré-esporulação (0,8% extrato de levedura; 0,3% peptona; 6% glicose; 2% ágar) contendo 0,02 mg/mL de histidina, 0,03 mg/mL de leucina e 0,2 mg/mL de geneticina e incubadas a 30°C por 2 dias. As células foram então plaqueadas em meio de esporulação (1% acetato de potássio; 0,1% extrato de levedura; 0,05% glicose; 2% ágar) contendo 0,02 mg/mL de histidina, 0,03 mg/mL de leucina e 0,2 mg/mL de geneticina e incubadas por 4 dias a 30°C. Após esse período foi realizado o procedimento de isolamento dos esporos utilizando-se o protocolo de separação hidrofóbica (Guthrie e Fink, 1991). O protocolo se inicia com a degradação da parede dos ascos através da adição de liticase a 100μg/mL. A reação foi incubada a 30 °C sob agitação por aproximadamente 30 min e após esse período a liberação dos esporos é acompanhada por microscopia óptica. Posteriormente, a reação foi centrifugada a 14.000g por 30 segundos, o sobrenadante foi descartado e os esporos ressuspensos em 1,0 mL de água milli-Q. Centrifugou-se novamente e ressuspendeu-se os esporos em 100 μL de água milli-Q. Esse volume foi então agitado em vórtex em velocidade máxima por 2 minutos. É nesse passo que ocorre a separação dos esporos das células diplóides, pois os esporos, mais hidrofóbicos, se aglutinam e aderem à parede do tubo, enquanto que as células diplóides continuam em suspensão. Retirou-se então a solução do tubo *eppendorf*, lavaram-se os esporos aderidos à parede diversas vezes com água milli-Q e ressuspendeu-se em 500 μL de 0,01% nonidet-P40. Os esporos foram então separados em micromanipulador e plaqueados em meio YP-GAL contendo 2% de galactose ao invés de glicose e 0,2 mg/mL de geneticina. Nesse meio a presença de galactose induz a expressão da cópia selvagem do gene de interesse contida no vetor YCp33, de forma que os esporos contendo a cópia deletada no genoma também são capazes de gerar colônias.

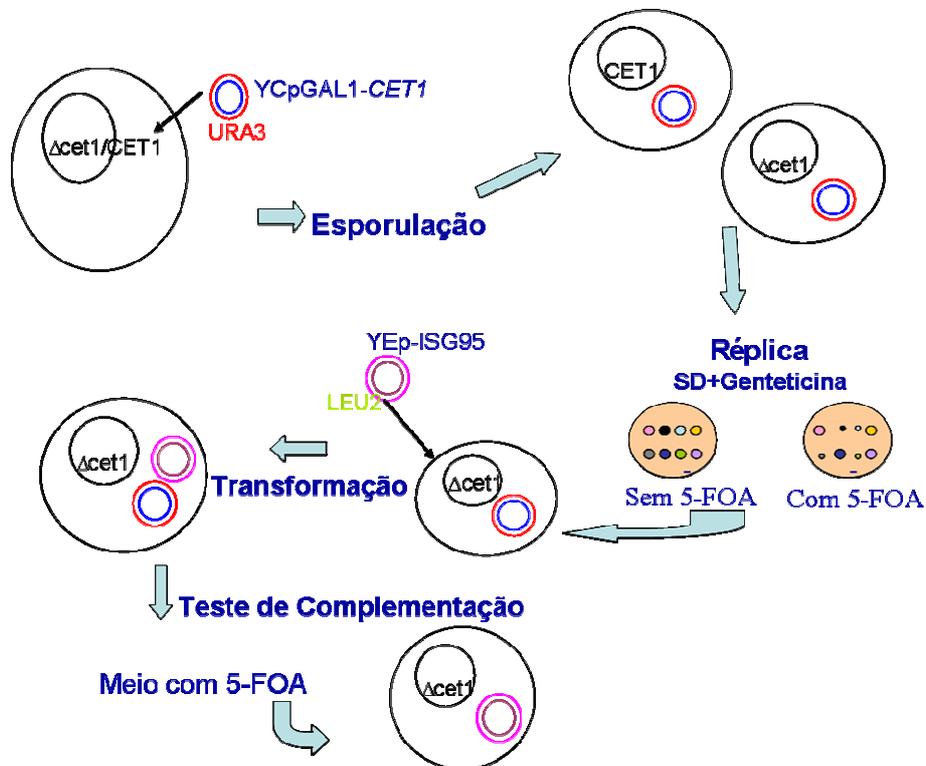


Figura 11: Esquema representando os passos para construção das cepas de levedura para os ensaios de complementação. O esquema ilustra os procedimentos realizados para uma cepa, porém são os mesmos na construção das três cepas de interesse. O teste de complementação é realizado numa cepa haplóide contendo a cópia do gene de interesse (*CET1*, *CEG1* ou *ABD1*) deletada no genoma e uma cópia selvagem em um plasmídeo contendo o gene *URA3*, que complementa uma das marcas de auxotrofia da levedura. Para a obtenção dessas cepas inicialmente a célula diplóide adquirida é transformada com o plasmídeo em questão e então passa por um processo de esporulação e seleção dos esporos de interesse com base em seu genótipo (*cet1::Kan*; *p[URA3 GAL1::CET1]*). A cepa obtida é capaz de crescer em meio contendo galactose devido à presença extracromossômica do gene selvagem sob controle do promotor *GAL4*. Para o teste de complementação cada uma dessas cepas é transformada com um plasmídeo (com marca *LEU2*) codificando para *ISG95*, e induz-se a perda do plasmídeo com marca de *URA3* contendo a cópia selvagem do gene de levedura pela adição de 5-FOA (ácido 5-fluororótico) ao meio de cultura, já que 5-FOA é tóxico para as células que contém o gene *URA3*. Essa célula, contendo apenas o plasmídeo que codifica *ISG95*, sem a cópia selvagem do gene de levedura, só irá crescer se a proteína em teste, *ISG95*, for capaz de suprir a ausência do gene deletado, ou seja, se for capaz de desenvolver a mesma atividade.

3.12.2. Confirmação do genótipo das cepas condicionais

O primeiro teste realizado para a confirmação do genótipo dos esporos isolados foi o teste de diluição em meio YPD contendo 0,2 mg/mL de geneticina. Nesse meio os esporos, por conterem a cópia selvagem dos genes *ABD1*, *CET1* ou *CEG1* apenas no plasmídeo sob o controle do promotor *GALI*, que é reprimido por dextrose, devem crescer mais lentamente que as células diplóides, que possuem uma cópia genômica adicional. O segundo teste foi realizado em meio SC-GAL contendo 0,02 mg/mL de histidina e metionina, 0,03 mg/mL de leucina e lisina e 0,2 mg/mL de geneticina para a confirmação do genótipo *URA3* contido no plasmídeo recombinante.

A confirmação definitiva dos genótipos dos esporos selecionados foi feita por PCR através de três reações (Figura 12). Utilizou-se como *template* o DNA total de levedura extraído de cada esporo ou célula diplóide. Na primeira reação amplificou-se a cópia genômica selvagem do gene em questão. Para isso utilizou-se um oligodesoxirribonucleotídeo direto específico (*primer A* no esquema), anelando no promotor do gene (ONZ340 para o gene *ABD1*, ONZ341 para o gene *CET1* e ONZ342 para o gene *CEG1*), e um oligodesoxirribonucleotídeo reverso, também específico, anelando na região 3' do gene (*primer B* no esquema, ONZ219 para o gene *ABD1*, ONZ223 para *CET1* e ONZ221 para *CEG1*). Na segunda reação amplificou-se a deleção genômica. Para isso utilizou-se o oligodesoxirribonucleotídeo direto específico, anelando no promotor de cada gene (*primer A*) e um oligodesoxirribonucleotídeo reverso (*primer kanB* no esquema, ONZ339) anelando na seqüência *kanMX4* que foi utilizada durante a construção das cepas heterozigotas na interrupção de uma das cópias do gene em questão. A terceira reação amplificou a cópia plasmídeo do gene. Nesse caso utilizou-se um oligodesoxirribonucleotídeo direto que anela na região 5' do gene (*primer C* no esquema, ONZ218 para o gene *ABD1*, ONZ222 para *CET1* e ONZ220 para *CEG1*) e um oligodesoxirribonucleotídeo reverso que anela na região 3' do gene (*primer B* no esquema, ONZ219 para o gene *ABD1*, ONZ223 para *CET1* e ONZ221 para *CEG1*). Não há problema quanto a uma possível amplificação a partir da cópia genômica selvagem porque no caso dos clones haplóides deletados de interesse, a ausência de amplificação na reação 1 já comprova a ausência desse alelo. Portanto, a presença de amplificação na reação 3 refere-se certamente à cópia selvagem contida no plasmídeo recombinante.

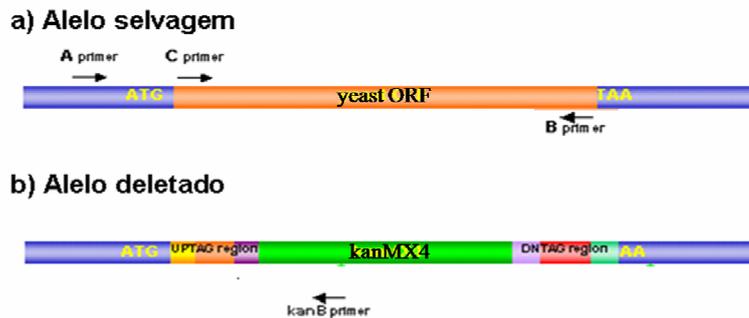


Figura 12: Representação esquemática das cópias genômicas selvagem (a) e deletada (b) das cepas heterozigotas adquiridas. Para a amplificação da cópia genômica selvagem (a) utiliza-se o par de *primers* A e B. Para a amplificação da cópia deletada (b) utiliza-se o par de *primers* A e kanB. Para a amplificação da cópia contida no plasmídeo recombinante utiliza-se o par de *primers* C e B.

3.12.3. Teste de complementação das atividades de *ABD1*, *CET1* e *CEG1* por *ISG95* nas cepas condicionais de *S. cerevisiae*

Uma vez confirmado o genótipo das cepas haplóides deletadas estas foram transformadas separadamente com os plasmídeos YEp-*ISG95* e YEp181 (controle negativo) para se testar a possível complementação das atividades de *CET1*, *CEG1* e *ABD1* por *ISG95*. Para o ensaio de complementação as cepas transformadas foram plaqueadas em meio SC-GAL contendo 0,02 mg/mL de histidina, metionina e uracila, 0,03 mg/mL de lisina, 0,2 mg/mL de geneticina e 1 mg/mL de 5-FOA em diluições crescentes (1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000) e incubadas a 30 °C. Nesse meio, as cepas perdem os plasmídeos YCpGAL1-*ABD1*, YCpGAL1-*CET1* e YCpGAL1-*CEG1* como resultado da pressão exercida pela presença do 5-FOA no meio. O 5-FOA sob a ação da proteína codificada pelo gene *URA3* (orotidine-5N-P decarboxylase₃) presente no plasmídeo, leva a produção de um composto tóxico, o 5-fluorouracil. Com a perda dos plasmídeos com a marca *URA3*, a única cópia selvagem de cada um dos genes *ABD1*, *CET1* ou *CEG1* também é perdida. A ausência do gene selvagem *ABD1*, *CEG1* ou *CET1* é letal em *S. cerevisiae*, o que causa a morte das cepas transformadas com o controle negativo. Caso haja a complementação por *ISG95* da atividade do gene deletado em questão, o esporo será capaz de crescer no meio seletivo. O mesmo ensaio foi realizado com as cepas haplóides deletadas para cada um dos genes em teste transformadas separadamente com os plasmídeos YEp*ISG95-ceg1*^{K70A} e YEp*ceg1*^{K70A} (controle negativo).

3.13. Duplo-híbrido de levedura

O método duplo-híbrido (Fields e Song, 1989) vem sendo largamente utilizado para testar interações entre proteínas *in vivo*. Ele se baseia no fato de muitos fatores de transcrição possuírem dois domínios necessários à sua função, um domínio de ligação ao DNA (*DNA-binding domain*, DB) e um domínio de ativação (*transcription-activation domain*, AD). Partindo-se do princípio de que esses dois domínios não necessitam estar covalentemente ligados para ativar a transcrição, mas sim fisicamente próximos, foi possível criar essa ferramenta genética. Ela se baseia na construção de duas proteínas de fusão, a primeira entre a proteína de interesse (X) e o domínio de ligação ao DNA (isca, DB-X), e a segunda entre a proteína alvo do teste (Y) e o domínio de ativação (presa, AD-Y). No caso de haver interação entre as proteínas X e Y, haverá a aproximação do domínio de ligação ao DNA e do domínio de ativação, o que resulta então na transcrição de um ou mais genes repórteres (introduzidos na cepa de levedura a ser utilizada) sob o controle de promotores com seqüências específicas para o domínio de ligação ao DNA em questão. Nesse caso o método foi utilizado para o rastreamento de proteínas que interagem com ISG95 utilizando como presa um banco de cDNA de cérebro fetal (Clontech) fusionado ao domínio de ativação da transcrição da proteína Gal4p (Figura 13) e como isca a proteína ISG95 fusionada ao domínio de ligação ao DNA da proteína lexA.

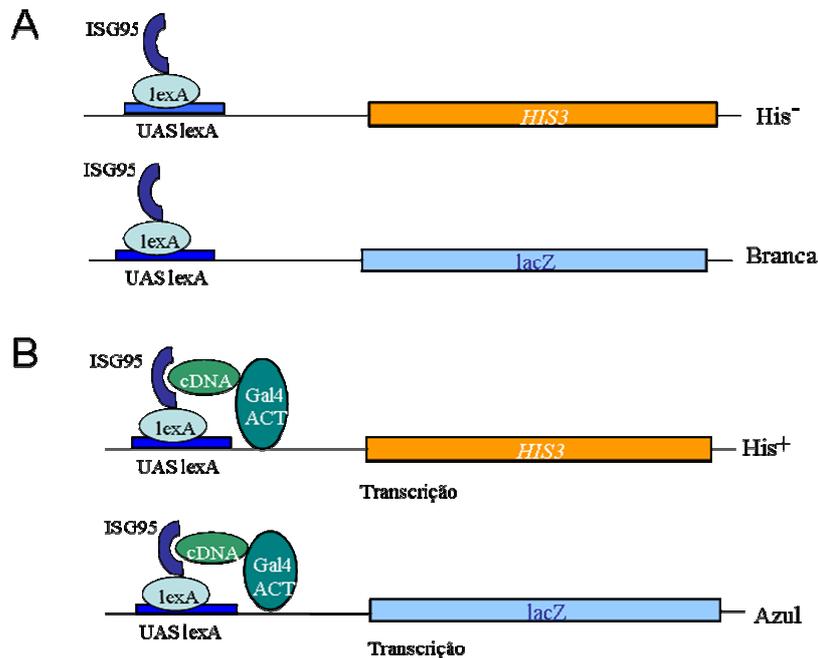


Figura 13: Esquema representando o ensaio de duplo-híbrido de levedura. A cepa L40 utilizada para o ensaio possui dois genes repórteres: *HIS3*, que confere prototrofia a histidina, e *lacZ*, que na presença do substrato X-Gal (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside*) dá origem a um produto de coloração azul (*5-bromo-4-chloro-indigo*). Ambos os genes possuem em sua sequência promotora 8 repetições do sítio reconhecido pelo domínio de ligação ao DNA de *lexA* (UAS *lexA*). A cepa L40 é co-transformada com o plasmídeo pTL1-ISG95, que codifica ISG95 fusionada ao domínio de ligação ao DNA da proteína *lexA* e com uma biblioteca de cDNAs de cérebro fetal humano fusionados ao domínio de ativação da transcrição do fator Gal4p. No caso onde não há interação com a proteína de fusão *lexA*-ISG95 (A), a colônia não é capaz de crescer em meio sem histidina e também não dá origem ao produto de coloração azul na presença de X-Gal. Quando ocorre interação entre a proteína de fusão *lexA*-ISG95 e uma das proteínas de fusão da biblioteca (B), o domínio de ligação *lexA* e o domínio de ativação Gal4 se encontram fisicamente próximos e ocorre a ativação da expressão dos genes repórteres. Dessa forma a colônia é capaz de crescer em meio sem histidina e se torna azul na presença de X-Gal.

3.13.1 Teste de Auto-Ativação da Isca

O plasmídeo recombinante pTL1-ISG95 foi co-transformado com o vetor pACT na cepa L40 (Hollenberg et al., 1995) para a realização do teste de auto-ativação da isca em meio SC contendo 0,02 mg/mL de adenina. Nesse meio a cepa co-transformada não deve ser capaz de crescer já que não deve ocorrer a ativação do gene *HIS3*, devendo permanecer auxotrófica para histidina. Para o teste, a cepa co-transformada com pTL1-ISG95 e pACT e o controle positivo do teste, referente à cepa L40 co-transformada com os vetores pBTM-NIP7 e pACT-NOP8 (uma

interação já descrita, Zanchin et al, 1999) foram inoculadas em meio SC contendo 0,02 mg/mL de adenina e histidina e posteriormente plaqueadas em diluições 1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000 em meio SC contendo 0,02 mg/mL de adenina e histidina e SC contendo apenas 0,02 mg/mL de adenina para análise de seu padrão de crescimento.

3.13.2. Rastreamento em larga escala pelo sistema duplo-híbrido de levedura

A cepa L40 transformada com o plasmídeo pTL1-ISG95 foi inoculada em 80 mL de YPD suplementado com 0,02 mg/mL de adenina e incubada *ON* (*overnight*) a 30°C. Esse pré-inóculo foi então utilizado para inocular 300 mL do mesmo meio, sendo este também incubado *ON* a 30°C. Esse inóculo foi centrifugado a 1.000 g por 5 minutos a 4 °C e o *pellet* obtido ressuspensão em 40 mL de água. Após nova centrifugação a 1.000 g por 5 minutos a 4 °C as células foram então ressuspensas em 1,5 mL de uma solução de TE (10 mM Tris-Cl, pH 7.5. 1 mM EDTA) e 0,2 M de cloreto de lítio. A essa suspensão foram adicionados 14 µg do DNA da biblioteca de cérebro fetal humano (Clontech), 1 mg de DNA carreador (*SS herring sperm DNA*, Clontech) e 6 mL de uma solução 40% PEG (polietilenoglicol) e 0,2 M de acetato de lítio sendo em seguida incubada a 30°C por 30 min sob 200 rpm de agitação. Após esse período foram adicionados 700 µL de DMSO (dimetil sulfóxido, SIGMA) e a suspensão foi submetida a um choque térmico de 42°C por 25 minutos e em seguida em gelo por 5 minutos. As células foram então centrifugadas a 1.000g por 5 min, o *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de YPD suplementado com 0,02 mg/mL de adenina e a suspensão plaqueada em alíquotas de 136 µL em placas de 14 cm de diâmetro com meio SC contendo 0,02 mg/mL de adenina. As placas foram incubadas a 30°C e as colônias numeradas de acordo com a ordem de surgimento até o sétimo dia após o plaqueamento. Paralelamente foram feitos dois controles negativos de transformação. Num dos controles a cepa L40 contendo o plasmídeo pTL1-ISG95 foi transformada com o vetor pACT e em outro controle a mesma cepa foi submetida ao procedimento de transformação apenas com água no lugar do segundo plasmídeo. Esses controles são importantes para a determinação do período máximo de coleta de colônias transformantes no rastreamento em larga-escala. Quando começam a surgir colônias nos controles negativos não é mais necessária a coleta de colônias nas placas de rastreamento, pois estas possivelmente serão falso-positivas.

3.13.3. Teste de atividade do gene repórter *lacZ*

Os clones isolados no rastreamento em larga-escala foram em seguida submetidos ao teste de atividade do gene repórter *lacZ* (Sambrook et al., 1989). Para isso os clones foram incubados sobre uma membrana de nitrocelulose de 82 mm de diâmetro (Millipore) em contato com meio SC contendo 0,02 mg/mL de adenina a 30°C por 2 dias. Após esse período o filtro foi incubado por 5 segundos em nitrogênio líquido para a permeabilização das colônias. Em seguida este foi embebido em tampão Z (0,06 M Na₂HPO₄. 7 H₂O; 0,04 M NaH₂PO₄. H₂O; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄. 7 H₂O; 50 mM β-mercaptoetanol) contendo 1 mg/mL de X-Gal (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside*) e incubado a 30°C até o surgimento de coloração azul. Como controle positivo foi utilizado um clone co-transformado com os plasmídeos pBTM-NIP7 e pACT-NOP8 e como controle negativo um clone co-transformado com os plasmídeos pTL1-ISG95 e pACT.

Os clones que apresentaram alta atividade do gene *lacZ* no ensaio de β-galactosidase tiveram seu DNA total extraído e transformado em DH5α. A transformação foi plaqueada em meio seletivo e o plasmídeo pACT-cDNA isolado. O cDNA do plasmídeo isolado foi então sequenciado para identificação da proteína que codifica.

3.13.4. Mapeamento da região de ISG95 responsável pelas interações identificadas no rastreamento de duplo-híbrido

3.13.4.1. Duplo-híbrido com clones truncados de ISG95

Para a determinação da região de ISG95 responsável pela interação com algumas das presas identificadas no rastreamento de duplo-híbrido (Sf3b5, SmD1, proteína não caracterizada com domínio CCHC7, CTD da RNA polimerase II e proteína não caracterizada com domínios quinase e 3'-5' exonuclease), estas foram co-transformadas separadamente com os clones pTL1-ISGNT, pTL1-ISGCT, pTL1-ISGdWW e pTL1-ISG95 na cepa L40. O controle positivo utilizado foi a cepa co-transformada com pBTM-NIP7 e pACT-NOP8. Os controles negativos realizados foram a cepa L40 co-transformada com cada um dos clones de ISG95 em teste, juntamente com o vetor pACT (controle de auto-ativação da presa) e cada uma das presas em teste (pACT-Sf3b5, pACT-SmD1, pACT-CCHC7, pACT-polIII e pACT-quinase), juntamente com pBTM-NIP7 (controle de auto-ativação da presa). O teste foi realizado plaqueando-se as co-transformações em meio SC contendo 0,02 mg/mL de adenina e diferentes concentrações de 3-

AT (3-aminotriazole) e incubando-se a 30 °C por 5 dias. O 3-AT é um inibidor competitivo da síntese de histidinas, assim ele seleciona os clones de interação mais forte entre isca e presa, ou seja, aqueles onde a expressão do repórter *HIS3* é mais intensa.

3.13.4.2. Co-imunoprecipitação

No intuito de confirmar *in vivo* as interações de ISG95 com a RNA polimerase II foram realizados testes de co-imunoprecipitação. Para estes testes utilizou-se extrato nuclear de HeLa (Mayeda e Krainer, 1999). Para a imunoprecipitação de ISG95 utilizou-se 10 µL de resina Poteína A-Sepharose (GE Healthcare), 1 µg de anti-KIAA0082 (Bethyl) e 0,5 mg de extrato nuclear de HeLa em um volume final de 500 µL em tampão contendo 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 125 mM NaCl; 2,5 mM EDTA. O controle negativo da imunoprecipitação foi realizado nas mesmas condições, porém com o anticorpo para MafB (Bethyl), também produzido em coelho. A reação de imunoprecipitação foi incubada por 1 hora a 4 °C e após extensiva lavagem da resina as proteínas associadas foram eluídas diretamente em tampão de amostra. O resultado das imunoprecipitações foi analisado por *Western Blot* utilizando os anticorpos primários para KIAA0082 (Bethyl) na diluição de 1:5000, para RNA polimerase II (Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:200 e o anticorpo secundário *anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidase linked* (GE Healthcare) na diluição de 1:5000. A revelação foi realizada utilizando *ECL Plus Reagent* (GE Healthcare) e o filme impressionado foi revelado conforme instruções do fabricante (KODAK).

3.14. Ensaio de *splicing in vitro*

Para testar uma possível participação de ISG95 na maquinaria de *splicing* foi realizado um teste *in vitro*, utilizando o pré-mRNA AdML marcado radioativamente como substrato (Gozani et al., 1994; Gozani et al., 1998). Para a síntese do RNA radioativo utilizou-se 10 µg do template pAdML (cedido por Robin Reed, Harvard Medical School) linearizado com BamHI e 50 µCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP conforme instruções do fabricante (Invitrogen). Após a síntese, o pré-mRNA AdML foi precipitado e ressuspensão em TE (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM EDTA). Para o ensaio de *splicing* (Mayeda e Krainer, 1999) montou-se uma mistura de reação contendo 1,25 mM ATP; 50 mM fosfato de creatina; 8 mM MgCl₂; 50 mM hepes-KOH pH 7,3; 6,5% PVA (álcool polivinílico) e $0,5 \times 10^5$ cpm de pré-mRNA AdML para um volume final de 10 µL. À mistura adicionaram-se 150 µg do extrato nuclear de HeLa, totalizando 25 µL de reação, e a reação foi

incubada a 30°C por 90 minutos. Em seguida realizou-se a imunoprecipitação do complexo de *splicing*. Para isso foram utilizados anticorpos para proteínas que sabidamente participam deste processo, como hnRNPA1 (anticorpo Santa Cruz) e SmD1 (anticorpo Santa Cruz). A imunoprecipitação foi realizada também com anticorpo para KIAA0082 (Bethyl), no intuito de demonstrar sua participação no *splicing* do pré-mRNA AdML e com os anticorpos para MafB (Bethyl) e para SBDS (cedido pela Dr. Carla Oliveira, Instituto de Química, USP) como controles negativos. Para a imunoprecipitação foram adicionados 10 µg de cada anticorpo e 10 µL de Proteína A-Sepharose às reações de *splicing* e estas foram incubadas a 4 °C por 2 horas. Após a imunoprecipitação a resina foi lavada extensivamente com tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl e 0,05% de igepal. O RNA associado à resina foi então extraído com fenol/clorofórmio, conforme descrito anteriormente, e separado em gel 5,6% de acrilamida desnaturante. Após a secagem o gel foi exposto em filme e este foi revelado conforme indicação do fabricante (KODAK). Como controle positivo da reação de *splicing*, a fração que não interagiu com a resina durante a imunoprecipitação de MafB também teve o conteúdo de RNA extraído e analisado em gel desnaturante. Dessa forma pode-se acompanhar a eficiência do extrato nuclear de HeLa em realizar o *splicing* do pré-mRNA AdML adicionado à reação.

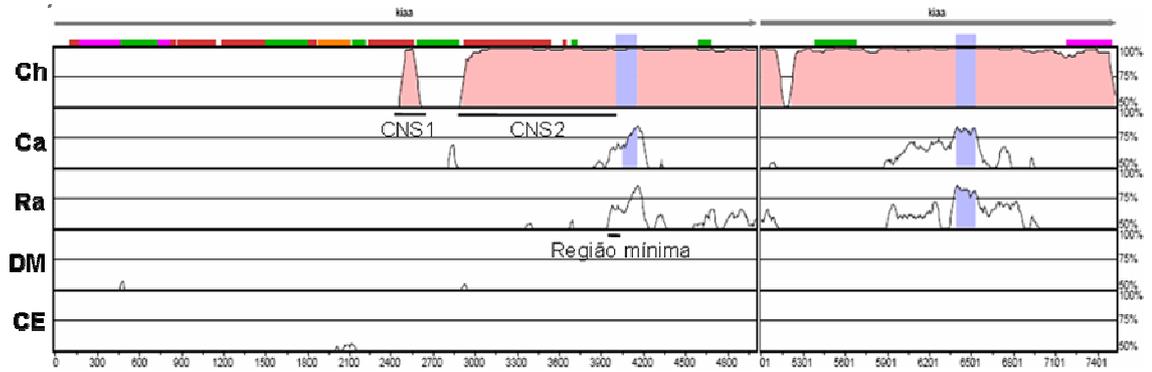
4. RESULTADOS

4.1. Teste da atividade do promotor do gene *ISG95*

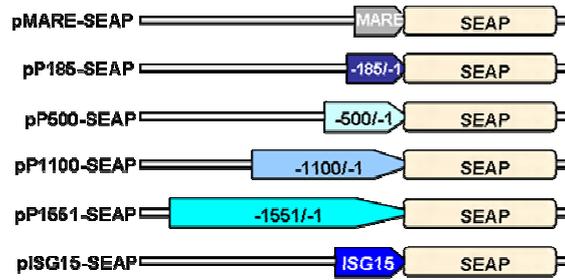
Para confirmar a hipótese de que *ISG95* teria sua expressão induzida por IFN- α foram construídos quatro plasmídeos recombinantes, com diferentes extensões do promotor de *ISG95* controlando a expressão do gene repórter SEAP (*secreted alkaline phosphatase*).

Através do alinhamento de *ISG95* e seus ortólogos executado pelo programa mVISTA foi possível determinar as regiões mais conservadas no promotor de *ISG95*. No alinhamento com o ortólogo de chimpanzé foram identificadas duas regiões, chamadas CNS1 e CNS2. Dentro da região CNS2, uma pequena sequência de 185 pb *upstream* ao primeiro *exon* de *ISG95* demonstrou ser conservada também em camundongos e ratos, além de chimpanzés (Fig 14A). Essa região foi chamada de região mínima e foi a menor sequência utilizada para o ensaio de atividade. Além dela foram utilizados fragmentos de 500 pb, 1100 pb e 1551 pb *upstream* ao sítio de início da transcrição, clonados de forma a controlar a expressão do repórter SEAP para os ensaios de atividade promotora. O fragmento maior, de 1551 pb engloba também a região conservada CNS2. Como controle positivo utilizou-se a sequência ISRE (*interferon-stimulated response element*) do promotor de *ISG15*, cuja ativação em resposta a IFN já foi demonstrada (Reich et al., 1987) e como controle negativo utilizou-se a sequência MARE, sítio de ligação para fatores de transcrição da família MafB, não relacionada à resposta a IFN (Petersen et al., 2004). A figura 14B apresenta uma representação esquemática dos clones utilizados no ensaio de atividade promotora. No ensaio de atividade (Figura 14C), obtém-se uma medida indireta da quantidade de proteína repórter sintetizada na amostra em análise através da intensidade de fluorescência do produto gerado. O ensaio foi realizado em triplicatas em células Vero.

A



B



C

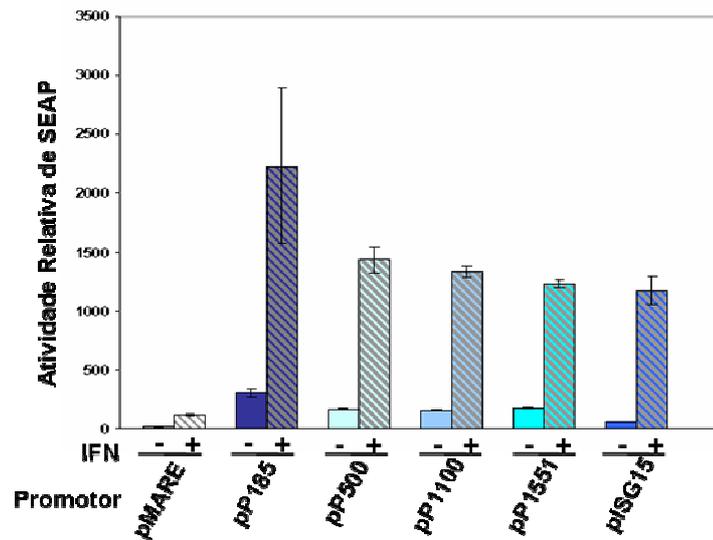


Figura 14: **A)** Gráfico mostrando a análise da região promotora do gene *ISG95* e seus ortólogos em chimpanzé (Ch), camundongo (Ca), rato (Ra), *D. melanogaster* (DM) e *C. elegans* (CE). As regiões conservadas CNS1, CNS2 e mínima estão destacadas por barras. **B)** Construções utilizadas para o ensaio de atividade do promotor de *ISG95*. pMARE-SEAP foi usado como controle negativo, já que possui a sequência reconhecida pelo fator de transcrição MafB, não relacionada a resposta a IFN controlando a expressão do repórter SEAP. p185-SEAP, p500-SEAP, p1100-SEAP e p1551-SEAP referem-se às construções em teste, com diferentes extensões do promotor de *ISG95* controlando a expressão do repórter. pISG15-SEAP foi utilizado como controle positivo e possui a sequência ISRE do promotor de *ISG15* controlando a expressão do repórter SEAP. **C)** Ensaio de ativação do promotor de *ISG95* em resposta a IFN- α . Houve ativação da expressão do gene repórter SEAP após o tratamento com todas as extensões do promotor de *ISG95*, indicando que na região mínima escolhida, de 185 pares de bases, se encontra o elemento de resposta a IFN- α . O controle positivo escolhido, a região ISRE da *ISG15*, obteve o mesmo nível de resposta ao tratamento. O controle negativo não apresenta indução da expressão do gene repórter após o tratamento, apresentando nível de expressão do repórter semelhante aos das amostras não induzidas.

Os resultados obtidos no ensaio comprovam a ativação do promotor de *ISG95* em resposta ao tratamento com IFN- α (Figura 14C). Todas as extensões do promotor utilizadas obtiveram níveis semelhantes de expressão do gene repórter após o tratamento, o que é demonstrado pelos níveis de fluorescência obtidos, e indica que o elemento de resposta a IFN- α está localizado dentro da região mínima escolhida, de 185 pares de bases. Nível de fluorescência semelhante foi obtido, após o tratamento, no clone contendo a *ISRE* de *ISG15*, o que reforça e valida os resultados obtidos com as construções do promotor de *ISG95*. As amostras não tratadas se mantêm com níveis de fluorescência basais, demonstrando que a expressão do gene repórter foi especificamente obtida após o tratamento com IFN- α . Além disso, a fluorescência observada após o tratamento na construção contendo a sequência MARE também se manteve em níveis basais, o que confirma a especificidade da resposta ao tratamento com IFN- α pelos demais clones.

A região mínima do promotor de *ISG95* que já é capaz de responder à estimulação por IFN- α foi submetida à análise pelo programa TFSearch (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) para identificação de possíveis sítios de reconhecimento para fatores de transcrição. O programa identificou diversos possíveis sítios, dentre eles os reconhecidos pelos fatores CREB, CBP/p300, GATA-1, c-Rel e AML-1a (Quadro 3). Dentre esses fatores estão alguns com alvos bastante amplos, como Sp1, e outros, como o fator AML-1a, cuja função é relacionada à hematopoiese, e que em muitos casos o gene que o codifica encontra-se alterado

em indivíduos leucêmicos. Já o fator cREL possui função relacionada à resposta imunológica e a processos inflamatórios. Uma primeira análise das funções desses fatores aponta para vias comuns àquelas identificadas para indução da expressão de ISG95, como a hematopoiese e leucemias (relacionando-se com a expressão de ISG95 no cluster gênico em indivíduos com LLA) e a resposta imunológica (relacionando-se com a expressão de ISG95 em resposta a interferon e infecção viral).

Quadro 3: Sítios reconhecidos por diferentes fatores de transcrição identificados na região mínima do promotor de *ISG95* (185 pb) e suas respectivas pontuações relativas, sem valor estatístico.

Fator de Transcrição	Score TFSearch
c-Rel	88,4
CP2	87,5
SRY	86,4
E2F	86,2
AML-1a	88,7
Sp1	87,7
CREB	100
CRE-BP	100
GATA-1	89,8
v-Jun	83,9

4.2. Análise da localização sub-celular de ISG95

Para a determinação da localização sub-celular de ISG95 esta foi fusionada à GFP (*green fluorescent protein*) e transfectada em células HeLa. A expressão da proteína de fusão e do controle negativo expressando apenas GFP foi analisada 24 horas após a transfecção em microscópio óptico de fluorescência (Figura 15A). Os resultados demonstram localização nuclear para a proteína de fusão GFP-ISG95, possivelmente com exclusão do nucléolo, o que se deduz das regiões escuras dentro do núcleo, que coincidem com os nucléolos observados em contraste de fase. A localização nuclear de ISG95 condiz com o sinal de localização nuclear identificado na análise de sua sequência primária (aminoácidos de 3 a 18). Para confirmar os resultados obtidos por fluorescência, realizou-se um *immunoblot* com anticorpo para KIAA0082

após o fracionamento celular de HeLa. Os extratos nuclear e citoplasmático foram analisados quanto à presença de ISG95 e de dois controles, a RNA polimerase II (de localização nuclear) e a actina (presente em frações nucleares e citoplasmáticas) (Vartiainen, 2008). Como se observa na figura 15B o *immunoblot* confirma a localização nuclear de ISG95 (assim como a localização esperada dos controles).

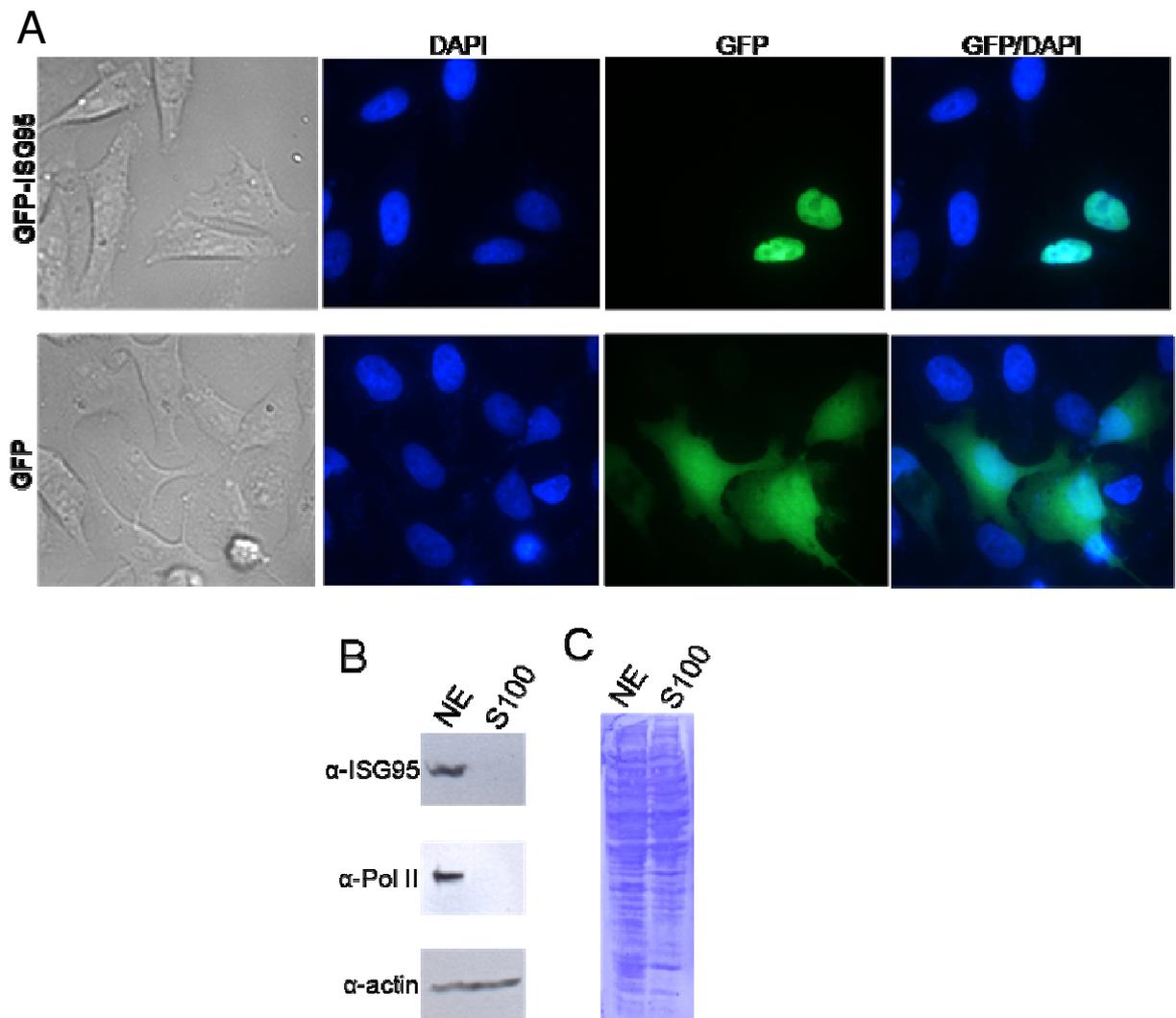


Figura 15: Ensaio de localização sub-celular. **A)** A fusão GFP-ISG95 demonstra localização nuclear, aparentemente sendo excluída do nucléolo. O controle negativo expressando apenas GFP apresenta a localização difusa, conforme esperado. **B)** *Immunoblot* com anticorpo para ISG95 e para os controles RNA polimerase II e actina nos extratos nuclear (NE) e citoplasmático (S100) de HeLa confirmando a localização nuclear de ISG95. **C)** Membrana submetida ao *immunoblot* corada com azul de coomassie para visualização do conteúdo protéico de cada um dos extratos nuclear (NE) e citoplasmático (S100).

4.3. Expressão e purificação de ISG95 e de seus domínios em *Escherichia coli*

4.3.1. Cromatografia de afinidade de proteínas de fusão a hexa-histidina

A expressão de ISG95 e de seus domínios em fusão a hexa-histidina N-terminal em todas as cepas de *E. coli* testadas (BL21-DE3, BL21-SI, C41 e C43) demonstrou-se essencialmente insolúvel. Foram realizados testes de purificação por afinidade a níquel em coluna *HiTrap Chelating* (Figura 16), porém a baixa quantidade de proteína solúvel, aliada à alta taxa de degradação não permitiu a produção de proteína recombinante eficientemente nesse sistema de expressão.



Figura 16: Gel de poliacrilamida 8% corado com azul de coomassie para análise da cromatografia de afinidade do extrato referente à expressão de ISG95 em fusão a hexa-histidina. A proteína é detectada apenas na fração insolúvel (CI). M: marcador de peso molecular (kDa). NI: extrato não-induzido. I: extrato induzido ISG95. CN: corpos de inclusão da cepa não-induzida. CI: corpos de inclusão ISG95. F: fração sem interação com a resina. L: fração de lavagem da resina.

Devido ao fato de não ter havido sucesso na purificação da pequena fração de proteína solúvel expressa em *E.coli* e à produção de grandes quantidades de proteína insolúvel, foram realizados testes de renaturação para o domínio guanililtransferase, que por ser a menor dentre as construções expressas é a que possui maior possibilidade de sucesso de reenovelamento. A desnaturação foi realizada em tampão contendo 8 M de uréia e a renaturação foi realizada tanto pelo método de diluição quanto pelo método de diálise em tampão de renaturação. Após a renaturação por gotejamento a amostra foi purificada por afinidade em resina Ni-NTA para concentrar a proteína renaturada. A análise em gel de poliacrilamida demonstra não ter havido sucesso em nenhum dos métodos testados, já que a quantidade de proteína renaturada foi bastante baixa e proporcional à quantidade de contaminantes (Figura 17).

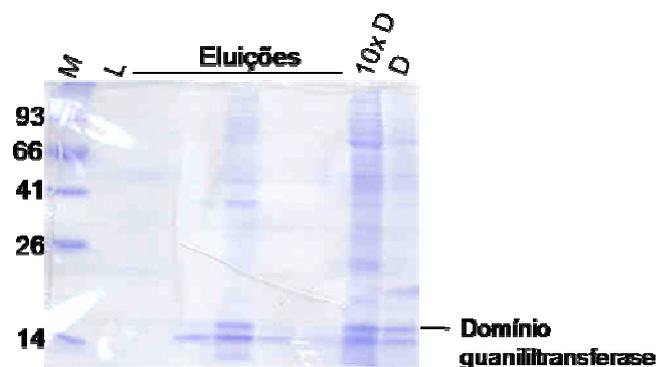


Figura 17: Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de coomassie para análise da renaturação do domínio guanililtransferase através do método de diluição e diálise. M: marcador de peso molecular (kDa). L: lavagem da resina Ni-NTA (em tampão de afinidade contendo 1,5 mM imidazol) usada para concentrar a proteína renaturada por diluição. Eluições: frações de eluição (em tampão de afinidade contendo 200 mM imidazol) da proteína renaturada por diluição e concentrada em resina Ni-NTA. 10x D: fração renaturada por diálise concentrada dez vezes. D: fração renaturada por diálise não concentrada.

4.3.2. Testes de purificação de ISG95 e seus domínios em fusão a MBP (*Maltose Binding Protein*)

4.3.2.1. Cromatografia de afinidade à amilose

Com o objetivo de melhorar a solubilidade das proteínas recombinantes foram contruídos clones de fusão de ISG95 e de seus domínios à MBP (Kapust e Waugh, 1999). A expressão das fusões apresentou resultados positivos, com proteínas solúveis após indução a 25°C (Figura 18). O extrato de 1 litro de indução da proteína MBP-ISG95 foi submetido à purificação por afinidade em 1 mL de resina de amilose. Foram realizadas 20 eluições de 300 µL em tampão contendo 10 mM de maltose e duas eluições de 500 µL com 50 mM maltose. Como se pode observar (Figura 19) a proteína de fusão não elui eficientemente e permanece ligada à resina.

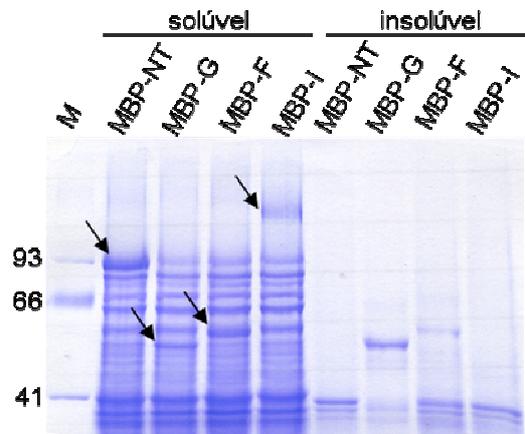


Figura 18: Gel de poliacrilamida 8% corado com azul de coomassie para análise da expressão a 25 °C em BL21-DE3 das proteínas de interesse fusionadas a MBP. As bandas de expressão solúvel são indicadas por setas. M: marcador de peso molecular (kDa). MBP-NT: fusão MBP-Nterminal de ISG95. MBP-G: fusão MBP-domínio guanililtransferase. MBP-F: fusão MBP-domínio FtsJ. MBP-I: fusão MBP-ISG95.

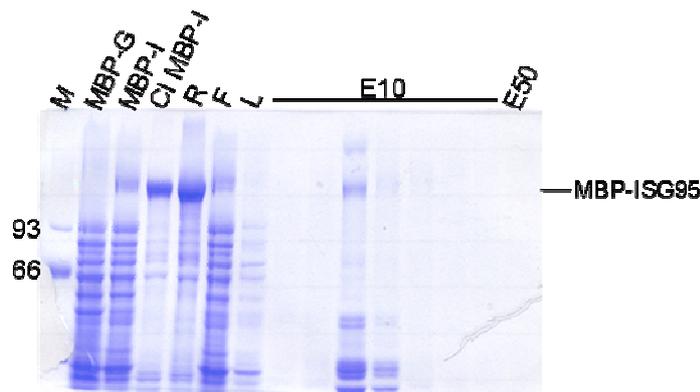


Figura 19: Gel de poliacrilamida 8% corado com azul de coomassie para análise da cromatografia de afinidade a amilose. MBP-G: extrato de expressão de MBP-guanililtransferase. MBP-I: extrato de indução de MBP-ISG95. CI MBP-I: fração insolúvel da expressão de MBP-ISG95. R: resina de amilose após eluições. F: fração sem interação com a resina. L: fração de lavagem da resina. E10: eluições com 10 mM de maltose. E50: eluição com 50 mM de maltose. A maior parte da proteína de fusão permanece ligada à resina após as eluições.

A proteína de fusão contém um sítio de reconhecimento para a protease TEV entre a sequência de MBP e ISG95. Devido a isso a resina contendo a proteína de fusão foi submetida a uma reação de digestão com a protease do vírus TEV (*tobacco etch virus*) com o objetivo de se liberar no tampão de reação a proteína ISG95, permanecendo aderido à resina apenas a MBP. Porém, após a clivagem uma parte da proteína de fusão permaneceu aderida à resina, sendo que a

fração liberada no tampão após a clivagem com TEV precipita e não fica visível no sobrenadante de clivagem (Figura 20A e 20B). Ainda com o objetivo de dissociar a proteína de fusão da resina de afinidade, realizou-se um teste de eluição em concentrações crescentes de maltose. O volume total de resina (1 mL) foi incubado sucessivamente em 2 mL de tampão de eluição (contendo de 100 mM a 500 mM de maltose) à temperatura ambiente em agitador giratório (Figura 20B).

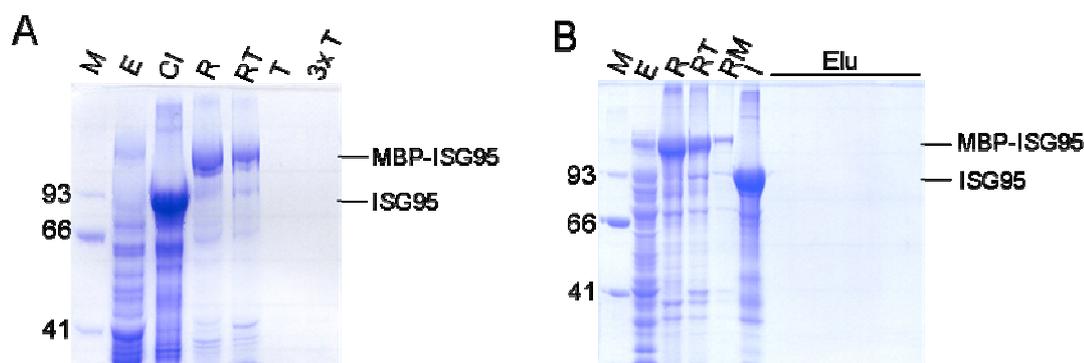


Figura 20: **A)** Gel de poliacrilamida 8% corado com azul de coomassie para análise da clivagem com a protease do vírus TEV da proteína de fusão MBP-ISG95 ligada à resina de amilose. M: marcador de peso molecular (kDa). E: extrato MBP-ISG95. CI: corpos de inclusão ISG95. R: resina de amilose antes da digestão com TEV. RT: resina de amilose após digestão com TEV. T: sobrenadante de digestão com TEV. 3xT: sobrenadante de digestão com TEV concentrado três vezes. Como se observa R e RT boa parte da proteína de fusão permanece associada à resina após a clivagem. **B)** Gel de poliacrilamida 8% corado com azul de coomassie para análise dos testes de eluição com concentrações crescentes de maltose da proteína de fusão MBP-ISG95 retida na resina de amilose após teste de clivagem com TEV. E: extrato MBP-ISG95. R: resina de amilose antes da digestão com TEV. RT: resina de amilose após digestão com TEV. RM: resina de amilose após eluição com maltose. I: fração insolúvel após clivagem com TEV. Elu: eluições com concentrações crescentes de maltose (100, 200, 300, 400 e 500 mM).

4.3.2.2. Cromatografia de afinidade a níquel da proteína de fusão MBP-ISG95

Foi realizado um teste de purificação por afinidade a níquel da proteína de fusão MBP-ISG95 em coluna *HiTrap Chelating* (Figura 21). Isso porque a proteína de fusão é constituída uma hexa-histidina (6-His), seguida de um sítio de reconhecimento para TEV, a MBP, um outro sítio de reconhecimento para a protease TEV e finalmente a proteína de interesse, ISG95. Como se observa na análise em gel de poliacrilamida a proteína interage com a resina, porém a alta degradação, evidente nas frações de eluição, não permitiu sua a purificação.

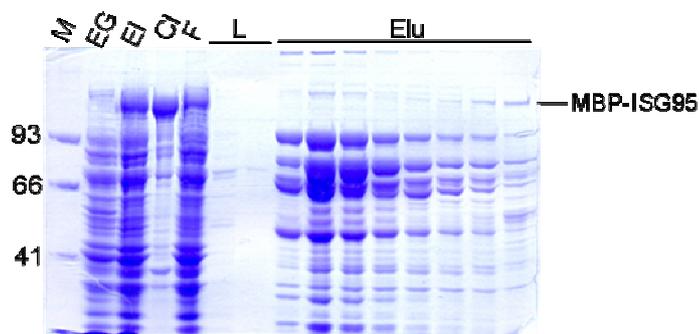


Figura 21: Gel de poliacrilamida 8% corado com azul de coomassie para análise do fracionamento de MBP-ISG95 por afinidade em coluna *HiTrap Chelating*. A grande quantidade de proteína degradada é visível nas frações de eluição. M: marcador de peso molecular (kDa). EG: extrato MBP-guanililtransferase. EI: extrato MBP-ISG95. CI: corpos de inclusão MBP-ISG95. F: fração sem interação com a resina. L: frações de lavagem da resina. Elu: frações de eluição.

Tendo em vista a dificuldade em se obter a dissociação das proteínas de fusão da resina de amilose e a ineficiência do fracionamento por afinidade a níquel foram feitas tentativas de purificação utilizando cromatografia de troca iônica e interação hidrofóbica. Como primeiro passo realizou-se um teste de purificação em coluna DEAE-Sepharose (troca aniônica). Um grande número de proteínas de *E. coli* foi retido pela coluna de DEAE e a fração que não interagiu com a resina contém grande proporção da MBP-ISG95 (Figura 22).

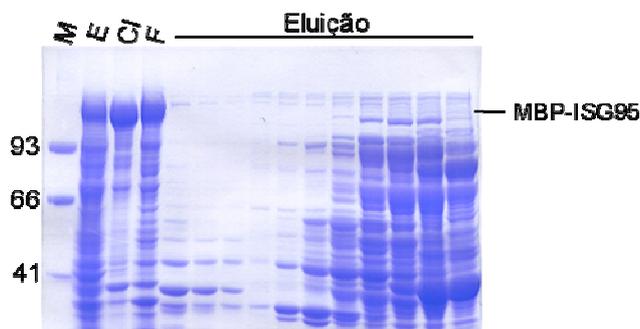


Figura 22: Gel de poliacrilamida 8% corado com azul de coomassie para análise do fracionamento em coluna DEAE-Sepharose do extrato referente à expressão de MBP-ISG95. A proteína de interesse não interagiu com a resina de troca aniônica nas condições testadas. M: marcador de peso molecular (kDa). E: extrato MBP-ISG95. CI: corpos de inclusão MBP-ISG95. F: fração sem interação com a resina.

Insistiu-se mais uma vez na utilização de resinas de troca iônica optando pela modificação das condições de purificação e utilizando-se um trocador de ânions mais forte como a Q-Sepharose como primeiro passo. Nesse caso o extrato de indução da proteína MBP-ISG95 foi preparado em tampão CAPS pH 10,1 na ausência de sal e injetado em uma coluna Q-Sepharose, porém nessas condições a proteína de fusão não foi capaz de interagir com a resina. Diante desses resultados realizou-se um teste de purificação em resina de troca catiônica. Para tanto o extrato da indução da proteína de fusão MBP-ISG95 foi injetada em uma coluna SP-Sepharose em tampão contendo 20 mM de acetato de sódio pH 5,0, também não se observando a interação da proteína de interesse com a resina em questão.

4.3.2.3. Testes de renaturação e cromatografia de exclusão molecular

Dados da literatura indicam que é possível fazer a renaturação *in vitro* de proteínas fusionadas a MBP (Reddy et al., 1998). Parte da expressão das proteínas de fusão a MBP se dá na forma de corpos de inclusão e esta fração já está parcialmente pura devido à forma de isolamento dos mesmos. No intuito de tentar aproveitar essa vantagem foram realizados testes de renaturação dos corpos de inclusão de MBP-ISG95. Para isso os corpos de inclusão foram lavados em tampão contendo triton X-100 e posteriormente em tampão contendo 1 M de uréia. Essas lavagens têm o objetivo de limpar ainda mais os corpos de inclusão de contaminantes como membranas e proteínas de maior sensibilidade à desnaturação por uréia. Após as lavagens dissolve-se os corpos de inclusão em 8 M de uréia e a fração desnaturada é submetida à renaturação em tampão. Nas condições utilizadas boa parte da proteína de fusão MBP-ISG95 foi capaz de se manter solúvel após o processo de renaturação.

Uma vez obtida a fusão MBP-ISG95 solúvel e parcialmente pura após a renaturação foi realizada uma purificação por gel filtração em coluna Superdex 200 16/60 já que a proteína de fusão possui 130 kDa, o que facilita sua separação por tamanho dos demais contaminantes. Para isso as amostras provenientes da renaturação foram concentradas a 9,5 mg/mL e injetadas na coluna. A análise de suas frações em gel de poliacrilamida (Figura 23) mostra que tanto a proteína de interesse quanto todos os demais contaminantes são eluídos em um mesmo pico, embora os contaminantes possuam peso molecular muito inferior ao da MBP-ISG95. É possível que após o processo de renaturação ISG95 tenha agregado aos contaminantes, e por outro lado, é

possível também que estes não sejam contaminantes, mas sim produtos de degradação da proteína ISG95. De qualquer maneira, não foi possível purificá-la através deste procedimento.

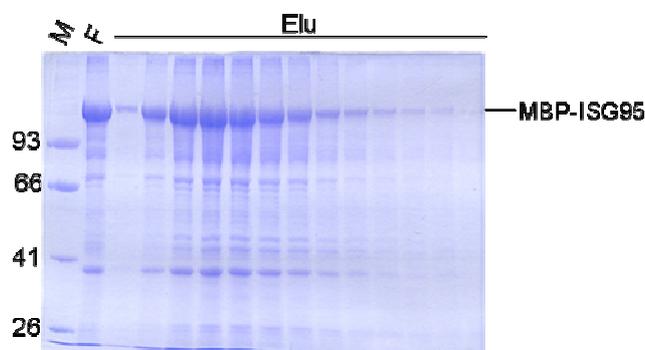


Figura 23: Gel de poliacrilamida 8% corado com azul de coomassie para análise da purificação por exclusão molecular em resina Superdex 200 de MBP-ISG95 após a renaturação. M: marcador de peso molecular (kDa). F: MBP-ISG95 renaturada. Elu: frações de eluição.

4.4. Expressão de ISG95 em células de inseto Sf9

4.4.1. Determinação das condições ótimas de expressão

Após a geração dos baculovírus recombinantes durante a transfecção do DNA *Baculogold* (BD Biosciences) e do plasmídeo de transferência recombinante pVL1393-HisISG95, foram realizados cinco passos de amplificação da população infecciosa antes da análise da expressão da proteína recombinante. Para isso o sobrenadante da primeira passagem foi utilizado para a infecção de um número maior de células na segunda passagem e assim por diante. Os extratos de Sf9 foram então preparados como descrito em materiais e métodos e realizou-se um *immunoblot* com anticorpo que reconhece a hexa-histidina presente na proteína de fusão (Figura 24). A expressão de ISG95 foi confirmada, embora sua maior parte apareça associada ao *pellet* após a preparação do extrato. A presença de ISG95 no *pellet* após a lise celular provavelmente se deve a um processo ineficiente de preparação de extrato. Porém, no extrato solúvel da quinta passagem (EI 5p), foi possível detectar uma banda de tamanho esperada, que embora muito fraca demonstra a expressão solúvel da proteína de ISG95.

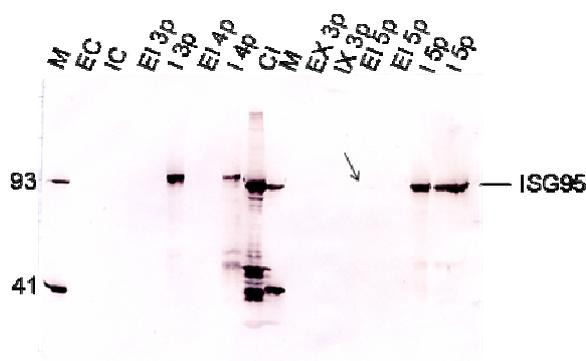


Figura 24: *Immunoblot* com anticorpo para hexa-histidina para análise dos extratos de células Sf9 infectadas com baculovírus recombinante codificando para ISG95. M: marcador de peso molecular. EC: extrato de Sf9 não infectada. IC: fração insolúvel de Sf9 não infectada. EI 3p, EI 4p e EI 5p: extrato de expressão ISG95 de terceira, quarta e quinta passagens respectivamente. I 3p, I 4p e I 5p: fração insolúvel da expressão de ISG95 de terceira, quarta e quinta passagens respectivamente. EX 3p: extrato de expressão de XylE de terceira passagem. IX 3p: fração insolúvel da expressão de XylE de terceira passagem. CI: corpos de inclusão de ISG95 expressos em *E. coli*. As bandas referentes à expressão da proteína de interesse em Sf9 aparecem na terceira, quarta e quinta passagens testadas, porém na fração associada ao *pellet*. É possível detectar uma banda bastante tênue de expressão solúvel de ISG95 em EI 5p (indicada pela seta). Como controles negativos usaram-se células não infectadas e células infectadas expressando a proteína controle XylE.

Uma vez confirmada a geração do baculovírus recombinante e expressão da proteína de interesse nas células infectadas seguiu-se com a determinação da concentração viral ótima para infecção, ou seja, a proporção entre sobrenadante de infecção, contendo as partículas virais, e número de células infectadas, ou mesmo área de infecção. Os testes foram feitos utilizando-se o mesmo número de células e diferentes volumes de sobrenadante de infecção. Os extratos foram analisados por *immunoblot* com anticorpo para a hexa-histidina (Figura 25). Os resultados obtidos sugerem que a infecção com 100 μ L do sobrenadante de infecção é a mais apropriada, já que deu origem a uma banda de expressão solúvel e a uma banda de expressão insolúvel não muito inferior à obtida com 200 μ L. Dessa forma define-se que 100 μ L do sobrenadante de infecção devem ser usados para cada $3,2 \times 10^5$ células ou para cada 10 cm^2 de área de infecção.

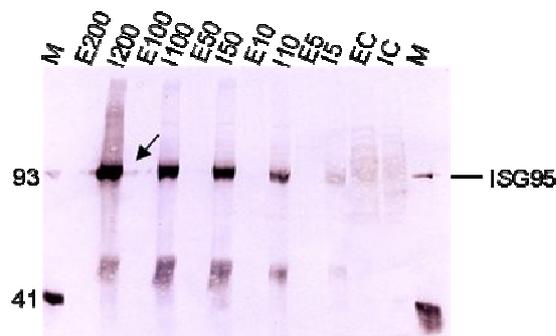


Figura 25: *Immunoblot* com anticorpo para hexa-histidina para análise dos extratos de Sf9 infectadas com diferentes volumes do sobrenadante de infecção contendo baculovírus recombinante codificando para ISG95. E200, E100, E50, E10: extrato de expressão de ISG95 em células infectadas com 200, 100, 50 e 10 μ l de sobrenadante de infecção. I200, I100, I50, I10: fração associada ao *pellet* da expressão de ISG95 em células infectadas com 200, 100, 50 e 10 μ l de sobrenadante de infecção. EC: extrato de células Sf9 não-infectadas. IC: fração associada ao *pellet* de células não-infectadas. Em E100 é possível identificar uma banda tênue de expressão solúvel de ISG95.

Uma vez determinada a proporção entre área a ser infectada e volume de sobrenadante de infecção foi realizado o teste referente ao período ótimo de incubação após a infecção para a expressão da proteína recombinante. Para isso quatro garrafas de 25 cm^2 de área foram infectadas com 250 μ L de sobrenadante de infecção. Foram coletadas as células de uma garrafa por dia durante 4 dias sendo a análise dos extratos realizada através de *immunoblot* com anticorpo para a hexa-histidina. Através dessa análise se determinou que o tempo ótimo de expressão de ISG95 em células Sf9 é de 2 dias.

4.4.2. Infecção de células Sf9 em larga escala e purificação de ISG95

A infecção em larga escala para expressão de ISG95 e do controle negativo STC1 foi realizada num sistema de rotação contínua a 27°C por 2 dias. Após esse período as células são coletadas, lisadas e o extrato utilizado em cromatografia de afinidade a níquel em coluna *HisTrap Crude* (Figura 26).

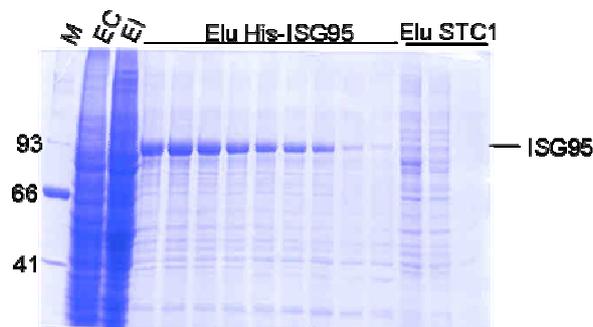


Figura 26: Gel de acrilamida 8% corado com azul de coomassie para análise da purificação de ISG95 e do controle negativo STC1 em coluna *HisTrap Crude* 1mL. M: marcador de peso molecular (kDa). EC: extrato de expressão do controle negativo STC1. EI: extrato de indução de ISG95. Elu ISG95: frações de eluição de ISG95. Elu STC1: frações de eluição STC1.

As frações de eluição de ISG95 foram agrupadas e dialisadas em tampão com menor conteúdo de sal para a cromatografia de troca iônica seguinte. As frações do controle negativo STC1 correspondentes àquelas dialisadas na purificação de ISG95 também foram submetidas à diálise. Em seguida as amostras foram fracionadas em coluna Mono Q e analisadas em gel SDS-PAGE (Figura 27). As frações mais concentradas foram aliquotadas e estocadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior utilização nos testes de atividade.

O grau de pureza obtido foi relativamente baixo e durante o processo de purificação ocorreu degradação da proteína. No entanto, sendo ISG95 a banda principal da amostra e o controle negativo sendo feito em paralelo, consideramos a amostra adequada para os ensaios funcionais.

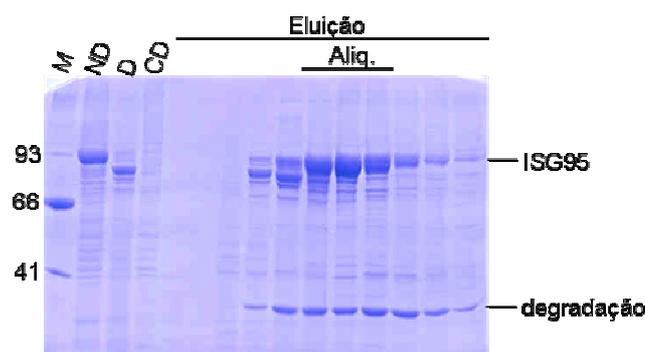


Figura 27: Gel de acrilamida 8% corado com azul de coomassie para análise da purificação de ISG95 em coluna Mono Q. M: marcador de peso molecular (kDa). ND: amostra de ISG95 não-dialisada. D: amostra de ISG95 dialisada e injetada na coluna Mono Q. CD: amostra do controle negativo STC1 dialisada. Eluição: frações da eluição da purificação de ISG95 em coluna Mono Q. Aliq: frações de eluições com maior concentração de ISG95 aliquotadas e congeladas para posteriores utilização em ensaios de atividade.

4.5. Caracterização Bioquímica de ISG95 recombinante

4.5.1. Ensaios de atividade guanililtransferase

O ensaio de atividade de guanililtransferase tem por objetivo a detecção da ligação covalente da proteína em teste com o $\alpha^{32}\text{P}$ -GTP. O teste foi realizado no gelo por 30 minutos com 2,5 μCi do isótopo e também na presença de diferentes inibidores como EDTA e ATP, CTP e GTP. Observa-se o aparecimento de uma banda inespecífica, que além de não possuir o tamanho esperado de ISG95 aparece também no ensaio com extrato de Sf9 não-infectada, referente ao controle negativo (Figura 28A). Esta provavelmente é uma guanililtransferase co-purificada com a proteína de interesse, e embora não tenha havido a marcação de ISG95 e, portanto não tendo sido demonstrada a atividade de guanililtransferase para a mesma, o ensaio em si demonstra ser eficiente. Observa-se a inibição da interação na presença de EDTA e de GTP o mesmo não ocorrendo na presença de ATP e CTP.

Como não se observou a ligação covalente de ISG95 à GMP realizou-se um teste de *crosslinking* para a detecção, mesmo que não covalente, da interação entre elas (Figura 28B). No ensaio observa-se a banda referente à ISG95 apenas após a irradiação da reação com luz ultravioleta, o que indica que ISG95 interage com GTP, porém não-covalentemente.

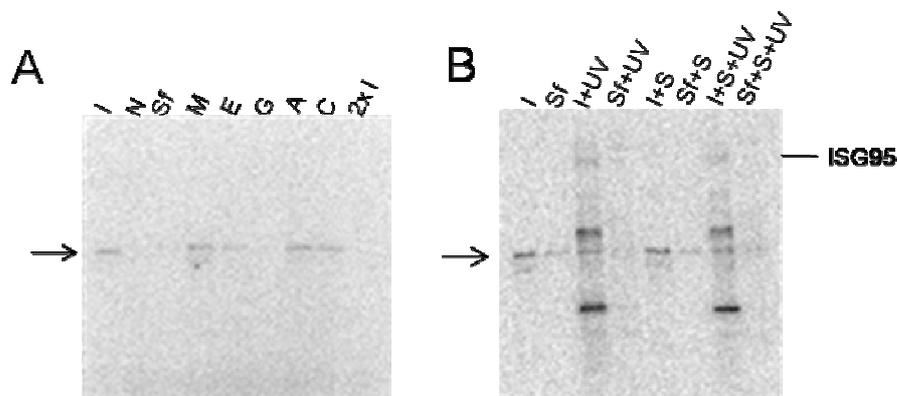


Figura 28: **A)** Auto-radiografia do gel seco do ensaio de atividade de guanililtransferase. A banda observada (indicada pela seta) com atividade de guanililtransferase não confere com o tamanho esperado para a ISG95, além de aparecer, embora de forma bastante suave, também no ensaio com o controle negativo (Sf). I: ensaio com ISG95. N: ensaio sem proteína. Sf: ensaio com extrato total de células Sf9 não-infectadas. M: ensaio com fração de eluição da cromatografia em coluna Mono Q sem a proteína de interesse. E: ensaio com 2,5 mM EDTA. G: ensaio com 30 μ M de GTP. A: ensaio com 30 μ M de ATP. C: ensaio com 30 μ M de CTP. 2xI: ensaio com o dobro da concentração de ISG95. **B)** Auto-radiografia do gel seco do ensaio de GTP *crosslinking*. O teste foi realizado na presença ou ausência de SAM (S-adenosilmetionina) e na presença ou ausência de luz ultravioleta (UV). I: ensaio com ISG95. Sf: ensaio com extrato total de células Sf9 não-infectadas. I+UV: ensaio com ISG95 e luz ultravioleta. Sf+UV: ensaio com extrato de Sf9 e luz ultravioleta. I+S: ensaio com ISG95 e SAM. Sf+S: ensaio com extrato de Sf9 e SAM. I+S+UV: ensaio com ISG95, SAM e luz ultravioleta. Sf+S+UV: ensaio com extrato de Sf9, SAM e luz ultravioleta. Observa-se a banda de ISG95 marcada pela ligação ao GTP radioativo apenas na presença de luz ultravioleta. As bandas de menor tamanho observadas correspondem provavelmente a degradações da proteína de interesse.

4.5.2. Ensaio de atividade de trifosfatase

O primeiro ensaio de atividade de trifosfatase foi realizado a 37°C por 30 minutos para comparação da atividade de ISG95, seu controle negativo STC1 e inibidores competitivos (Figura 29A). ISG95 possui atividade de trifosfatase, estando os valores de radiação liberados por ela próximos aos obtidos com o controle positivo do teste, realizado com 1 Unidade de CIAP (*calves intestinal alkaline phosphatase*). A atividade de trifosfatase observada é diminuída conforme se aumenta a quantidade de ATP (competidor não radioativo), o que demonstra a especificidade do teste. Observa-se que GTP também compete com o $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, porém de forma mais discreta, indicando que o sítio ativo da proteína possui maior afinidade por ATP que por GTP. O controle negativo STC1 mostrou ter um valor de radiação liberada muito inferior ao de ISG95 e mais próximo ao nível basal do experimento, determinado pela realização do

experimento na ausência de proteína. Esses resultados indicam que a atividade observada provavelmente deriva de ISG95, embora não se possa excluir definitivamente a possibilidade de serem oriundos de uma trifosfatase co-purificada.

Em seguida realizou-se um experimento de cinética de hidrólise de ATP para melhor avaliação da atividade de trifosfatase de ISG95 buscando afastar a possibilidade da atividade observada na amostra com a proteína de interesse estar sendo gerada por contaminantes. Para isso utilizou-se apenas 0,75 μCi de $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ e 10 vezes menos proteína do que no ensaio descrito anteriormente. Isso foi necessário para que fosse possível acompanhar a fase logarítmica de liberação de ^{32}Pi pela atividade de ISG95. Assim, foram retiradas amostras do ensaio com ISG95 e com o controle negativo STC1 em diferentes tempos, tendo os valores obtidos sido utilizados para a confecção de um gráfico (Figura 29B). Os valores encontram-se normalizados pela repetição de uma mesma amostra em todas as placas TLC quantificadas.

Conforme se observa (Figura 29B) a radiação liberada no ensaio com ISG95 aumenta rapidamente de 0 a 20 minutos e se mantém em níveis altos após esse período, já a atividade do controle negativo se mantém em níveis basais. Esses resultados, obtidos com baixa concentração de proteína (0,08 μg), indicam que a atividade de trifosfatase exibida no experimento com ISG95 provavelmente se deve à atividade da proteína de interesse e não a contaminantes, presentes também no ensaio com o controle negativo e cuja concentração na fração de ISG95 utilizada no ensaio é extremamente baixa.

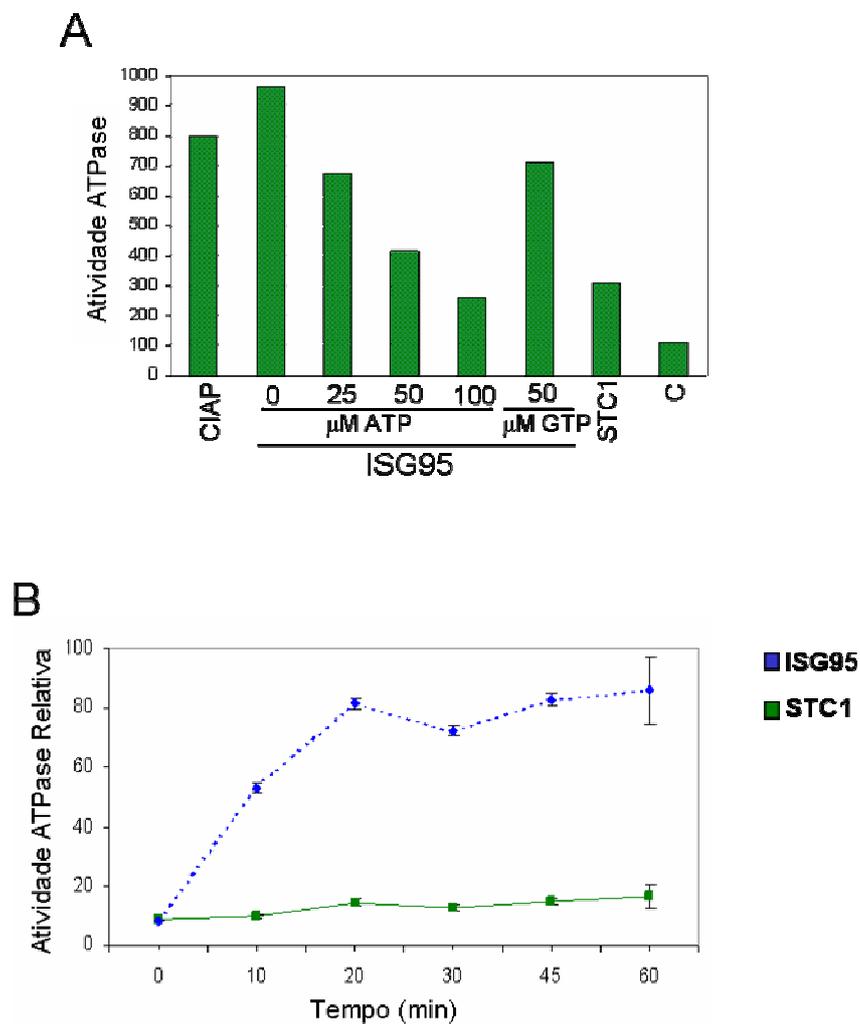


Figura 29: **A)** Gráfico de atividade de trifosfatase. ISG95 demonstra ser capaz de liberar $^{32}\text{P}_i$ pela clivagem do substrato o $\gamma^{32}\text{P}\text{-ATP}$, estando seu valor de radiação liberada acima do controle positivo realizado com 1 UI de CIAP. A atividade é proporcionalmente reduzida pela adição de quantidades crescentes de inibidores, sendo o ATP mais eficiente que o GTP na competição pelo sítio ativo da proteína. Os valores obtidos para o controle negativo (STC1) estão próximos ao basal do experimento (C). **B)** Gráfico de cinética de hidrólise de $\gamma^{32}\text{P}\text{-ATP}$ por ISG95. A liberação de P_i marcado radioativamente no ensaio com ISG95 confira sua atividade trifosfatase. A hidrólise de $\gamma^{32}\text{P}\text{-ATP}$ pelo controle negativo STC1 se mantém em níveis basais.

4.5.3. Ensaios de interação com RNA

4.5.3.1. Ensaio de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA) e RNA *crosslinking*

O primeiro teste para detecção de interação entre ISG95 e RNA foi um ensaio de retardo de mobilidade eletroforética realizado com RNA transcrito com $\alpha^{32}\text{P}$ -GTP. Não foi possível determinar se ISG95 interage com o RNA marcado, embora tenha havido interação RNA-proteína em todas as condições, pois as proteínas não migraram no gel de acrilamida não desnaturante, permanecendo nos poços de aplicação (com exceção da sonda livre, que migrou normalmente).

O ensaio de RNA *crosslinking* foi realizado com exposição à luz ultravioleta por 30 minutos a 10 cm de distância da fonte sendo em seguida as amostras submetidas à eletroforese em gel desnaturante 8%. Observou-se uma banda, cujo tamanho não coincide com o de ISG95, marcada em todas as condições, inclusive no controle negativo realizado com STC1, sendo esta um contaminante do processo de purificação. Não foi possível identificar a banda referente à ISG95, não sendo demonstrada nessas condições a interação de ISG95 com RNA.

4.5.3.2. Ensaio de interação com RNA biotilado

A interação de ISG95 com RNA foi demonstrada *in vitro* através da interação da proteína recombinante com RNA biotilado ligado a uma resina de Streptavidina-Sepharose (Figura 30).

A banda detectada por *Western Blot* usando o anticorpo para KIAA0082 (ISG95) observada na canaleta correspondente à eluição da resina Streptavidina-Sepharose na presença de RNA biotilado em conjunto com a ausência de banda da proteína de interesse na eluição do controle negativo (resina na ausência de RNA biotilado) demonstra a interação específica de ISG95 ao RNA utilizado. Embora não tenha sido testada utilizando-se mutantes de deleção, a interação de ISG95 ao RNA deve ocorrer através do domínio G-patch identificado na análise de sua sequência primária e presente em outras proteínas de ligação a RNA.

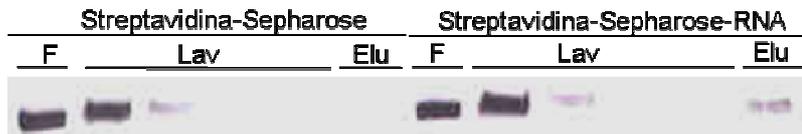


Figura 30: *Western Blot* para análise do ensaio de interação de ISG95 a RNA biotilado em resina de Streptavidina-Sepharose. A proteína ISG95 purificada foi capaz de se associar ao RNA biotilado preso à resina, conforme se observa pela presença da banda da proteína de interesse na fração de eluição da resina na presença de RNA biotilado. No controle negativo, ou seja, na ausência de RNA, ISG95 não aparece na fração de eluição, demonstrando não interagir com a resina inespecificamente. F: fração sem interação com a resina. Lav: frações de lavagem da resina. Elu: frações de eluição.

4.5.3.3. Ensaio de interação com snRNA U2

Tendo em vista a interação de ISG95 com RNA-biotilado e o fato de já ter sido demonstrada a interação de domínios WW (presente na extremidade C-terminal de ISG95) com snRNA U2 (Lin et al., 2004) buscamos identificar uma possível interação de ISG95 com esse snRNA especificamente. Para testar a interação de ISG95 com snRNA U2 foram utilizados dois protocolos. Inicialmente imobilizou-se a proteína de interesse ao anticorpo para KIAA0082 (ISG95) em resina proteína A-Sepharose e em seguida incubou-se com o extrato nuclear de HeLa com o objetivo de co-imunoprecipitar o snRNA U2 presente no extrato. Outro protocolo buscou co-imunoprecipitar o possível complexo ISG95-snRNA U2 diretamente do extrato nuclear de HeLa. Nesse caso o anticorpo para KIAA0082 (ISG95) foi incubado diretamente com o extrato nuclear na presença de resina proteína A-Sepharose. Em ambos os casos a fração ligada à resina teve seu conteúdo de RNA extraído, separado em gel de agarose e então submetido à *Northern Blot* com sonda contra o snRNA U2. Nos dois protocolos testados os resultados obtidos não demonstraram a presença de U2 na imunoprecipitação de ISG95. Porém esses dados não são conclusivos já que não há um controle positivo do teste, ou seja, não se realizou em paralelo uma reação de imunoprecipitação de uma proteína que sabidamente interage com snRNA U2, como SmD1 ou U2AF65.

4.5.4. Ensaio de atividade de metiltransferase

4.6.4.1. Ensaio de ligação a SAM (S-adenosilmetionina) *in vitro*

Com o objetivo de demonstrar a possível atividade de metiltransferase de ISG95, indicada pela presença do domínio FtsJ identificado na análise de sua sequência primária, foi realizado um teste de ligação a SAM (S-adenosilmetionina), substrato de metiltransferases e doadora do

grupo metil (Brahms et al., 2001). O ensaio (Figura 31) foi realizado através do acoplamento de SAM à resina EAH-Sepharose 4B, o bloqueio de interações inespecíficas à resina com BSA e finalmente a adição de ISG95 purificada e sua posterior eluição na presença de S-adenosil-L-homocisteína, um competidor da ligação a SAM. O controle negativo é realizado da mesma maneira, porém em resina sem acoplamento de SAM. A ligação de ISG95 à resina é analisada por *immunoblot* com anticorpo para KIAA0082 (ISG95). A banda de ISG95 é identificada apenas na fração de eluição da resina acoplada a SAM, e não na eluição do controle negativo, na ausência de SAM, o que demonstra que a proteína de interesse interage de maneira específica com o substrato S-adenosilmetionina.



Figura 31: *Western Blot* para análise do ensaio de interação de ISG95 com SAM (S-adenosilmetionina) em resina de EAH-Sepharose 4B. A interação da proteína a SAM é confirmada pela presença da banda da proteína de interesse na fração de eluição da resina acoplada a SAM assim como pela sua ausência na eluição no controle negativo, ou seja, na ausência de SAM. F: fração sem interação com a resina. Lav: frações de lavagem da resina. Elu: frações de eluição.

4.6.4.2. Ensaio de atividade de metiltransferase

Para confirmar a atividade de metiltransferase de ISG95 foram realizados ensaios de metilação *in vitro* utilizando como substratos a MyBP (*myelin basic protein*) e a GST-SmD1. O ensaio foi realizado após a ligação de ISG95 ou da fração correspondente da purificação de STC1 em resina Heparina-Sepharose. Após a incubação da resina com as proteínas associadas em tampão de reação na presença de cada um dos substratos e de H^3 -SAM foram analisados em gel de poliacrilamida tanto o sobrenadante da reação, as frações de lavagem da resina após o ensaio e as proteínas que permaneceram associadas à resina após sua lavagem, embora a Figura 32 apresente apenas as frações que permanecem associadas à resina. O gel foi secado e exposto em filme para a detecção de bandas marcadas radioativamente. Como se observa na Figura 32 é possível identificar a banda de MyBP marcada apenas na fração correspondente à reação na presença de ISG95 que permanece associada à resina de heparina e não na fração de controle negativo, contendo a fração de purificação de STC1.

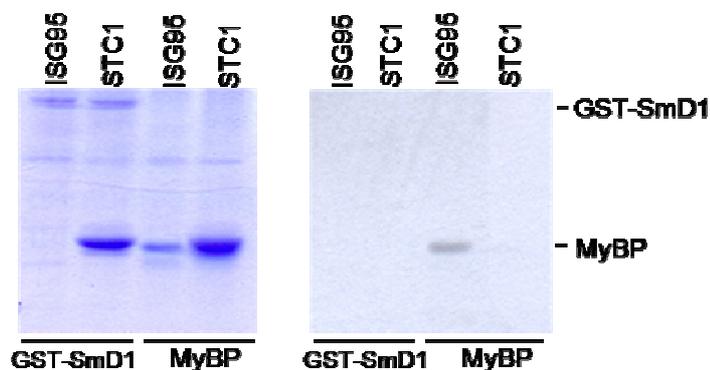


Figura 32: Análise da atividade de metiltransferase de ISG95. À esquerda o gel de poliacrilamida corado com azul de coomassie das frações associadas à resina de heparina das reações de metilação com ISG95 e com o controle negativo (fração correspondente da purificação de STC1) tanto com o substrato MyBP quanto GST-SmD1. À direita o filme exposto com a banda de MyBP marcada radioativamente apenas na reação com ISG95 e não com o controle negativo STC1. GST-SmD1 não serviu como substrato de metilação para ISG95, não tendo sido marcada radioativamente.

Testes de metilação utilizando moléculas de RNA como substrato também foram realizados. Foram testados o RNA AdML transcrito *in vitro* e RNA total de células HEK293, porém nenhum deles foi metilado por ISG95, demonstrando que a atividade da enzima é restrita à substratos protéicos.

4.6. Teste de complementação em levedura

4.6.1. Construção das cepas para teste de complementação

Os genes *ABD1*, *CET1* e *CEG1* codificam para proteínas essenciais envolvidas na formação do *cap* de mRNAs em *S. cerevisiae*, apresentando atividades de RNA-metiltransferase, RNA-trifosfatase e RNA-guanililtransferase, respectivamente. A construção de cepas condicionais para essas três enzimas, ou seja, cujos genes selvagens sejam expressos apenas de forma condicional (no caso através da indução do promotor *GAL1* por galactose), permite que se teste a possibilidade de complementação dessas atividades por enzimas codificadas por genes heterólogos, no caso ISG95.

As cepas condicionais foram geradas a partir de cepas heterozigotas de *S. cerevisiae* (*ABD1/kan::abd1*; *CET1/kan::cet1* e *CEG1/kan::ceg1*) adquiridas do projeto de deleção sistemática de ORFs (*Saccharomyces Genome Deletion Project*) através da empresa EUROSCARF (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>). Os critérios de seleção das

cepas condicionais haplóides são: resistência a geneticina, susceptibilidade a 5-FOA e dependência de galactose.

Para a construção das cepas haplóides condicionais inicialmente transformou-se os plasmídeos YCp33-*ABD1*, YCp33-*CET1* e YCp33-*CEG1* respectivamente nas cepas diplóides *ABD1/Δabd1*, *CET1/Δcet1* e *CEG1/Δceg1*. As células transformadas foram plaqueadas em meio seletivo SC contendo 0,02 mg/mL histidina, 0,03 mg/mL de leucina e 0,2 mg/mL de geneticina. As cepas diplóides transformadas foram então esporuladas e os esporos obtidos foram testados quanto a seu genótipo inicialmente em placas com meio YPD contendo 0,2 mg/mL de geneticina. Nesse meio os esporos de interesse, ou seja, que possuem a cópia genômica do gene de interesse deletada e uma cópia selvagem no plasmídeo, crescem mais lentamente que os controles positivos diplóides (C1 e C2), isso porque os genes em estudo são essenciais e a dextrose contida no meio reprime a expressão dos genes selvagens sob o controle do promotor *GAL1* (Figura 33).

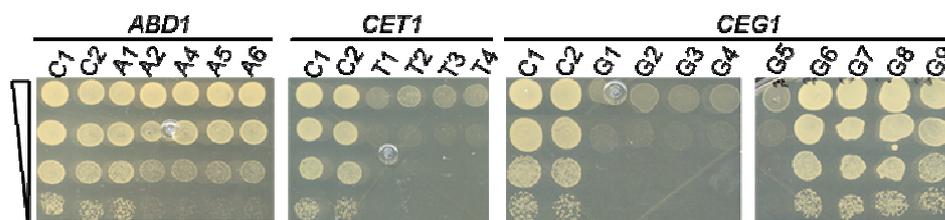


Figura 33: Testes de crescimento em meio YPD contendo 0,2 mg/mL de geneticina para confirmação dos genótipos dos clones haplóides de *S. cerevisiae* desenvolvidos para a utilização em testes de complementação. Cada coluna representa um clone derivado de esporos da cepa heterozigota para o gene *ABD1* (A1, A2, A4, A5 e A6), *CET1* (T1 a T4) e *CEG1* (G1 a G9). C1: cepa diplóide transformada com o respectivo plasmídeo. C2: Cepa diplóide não-transformada. As diluições são decrescentes 1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000. O padrão de crescimento observado indica que os esporos A2, A4, A5, A6, T1, T2, T3, T4, G1, G2, G3, G4 e G5 possuem o genótipo desejado.

Esses resultados indicam que os clones A2, A4, A5, A6, T1, T2, T3, T4, G1, G2, G3, G4 e G5 são haplóides e contém o plasmídeo que codifica a cópia selvagem do gene *ABD1* (clones A2, A4, A5 e A6), *CET1* (T1, T2, T3 e T4) e *CEG1* (G1, G2, G3, G4 e G5) já que seu crescimento demonstra ser dependente de galactose (crescimento lento em meio contendo dextrose, que reprime o promotor *GAL1*). No caso dos clones G6, G7, G8 e G9 o crescimento observado é semelhante ao dos diplóides, o que indica que talvez tenham sido selecionadas acidentalmente algumas células diplóides durante a separação dos esporos no micromanipulador.

Para confirmar seu genótipo os clones de interesse foram plaqueados em meio mínimo SC-GAL contendo 0,02 mg/mL de histidina e metionina, 0,03 mg/mL de leucina e lisina e 0,2 mg/mL de geneticina para o teste dos marcadores de auxotrofia a uracila e resistência a geneticina (Figura 34). Os resultados dos testes em meio mínimo indicam que todos os clones provenientes da esporulação da cepa heterozigota para o gene *CET1* e da cepa heterozigota para o gene *CEG1* contém o alelo em questão deletado (ao crescem em meio mínimo com geneticina demonstram possuir a deleção de um dos alelos, já que a marca *kanMX4*, que confere a resistência ao antibiótico, foi usada na construção da cepa heterozigota para deletar um dos alelos) e possuem o plasmídeo correspondente (ao crescerem em meio sem uracila, demonstram possuir a marca *URA3* plasmídeo). O clone A3 proveniente da esporulação da cepa heterozigota para o gene *ABD1* não acompanha o ritmo de crescimento do controle positivo e dos outros clones, tendo sua taxa mais próxima a do controle negativo, e dessa forma não é confiável para adoção como cepa para complementação.

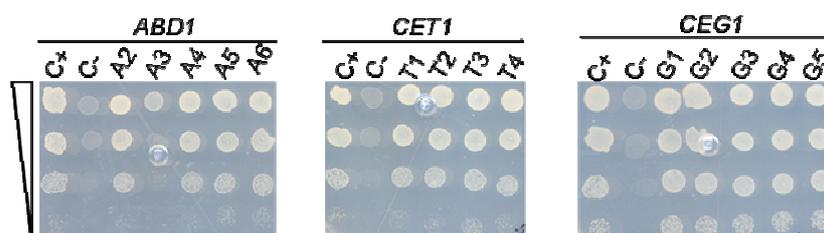


Figura 34: Testes para confirmação do genótipo *URA3* dos clones haplóides de *S. cerevisiae* desenvolvidos para a utilização em testes de complementação. Cada coluna representa um clone derivado de esporos da cepa heterozigota para o gene *ABD1* (A2, A4, A5 e A6), *CET1* (T1 a T4) e *CEG1* (G1 a G5). C+: cepa diplóide transformada com o respectivo plasmídeo. C-: Cepa diplóide não-transformada. As diluições são decrescentes 1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000. Todos os clones confirmam a presença da deleção genômica e do plasmídeo com a marca *URA3*, com exceção do clone A3, cujo crescimento acompanha o do controle negativo, e por isso foi descartado.

A confirmação final dos genótipos das cepas haplóides construídas para os testes de complementação foi realizada por análise molecular através de PCR (Figura 35). Foram selecionados os clones A2, A4, T2, T4, G1 e G4 para a confirmação por PCR, juntamente com os controles diplóides transformados com os respectivos plasmídeos (A+1 para o diplóide *ABD1/Δabd1*, T+1 para *CET1/Δcet1*, e G+1 para *CEG1/Δceg1*). Para isso foram realizadas três reações de PCR para cada clone (conforme esquematizado na Figura 35A) utilizando como *template* o DNA total extraído dos clones em teste (Guthrie e Fink, 1991). Cada reação utiliza

pares de oligodesoxirribonucleotídeos específicos e as bandas esperadas variam de acordo com a reação e com o clone em questão. Assim, na reação 1 espera-se observar uma banda de 1606 pb para A+1, de 1990 pb para T+1 e de 1729 pb para G+1. Os clones haplóides deletados não devem originar bandas nessa reação de PCR já que ela amplifica a cópia genômica selvagem do gene em questão. Na reação 2 os clones A+1, A2 e A4 devem originar bandas de 596 pb, os clones T+1, T2 e T4 de 641 pb e os clones G+1, G1 e G4 de 650 pb, já que esta reação amplifica a cópia genômica deletada do gene em questão, e todos os clones em teste, tanto haplóides quanto controles diplóides possuem esse alelo. Na reação 3, que amplifica a cópia selvagem do gene em questão contida no plasmídeo recombinante, a banda referente à amplificação deve ser visível em todos os clones em teste, e nesse caso a banda esperada para A+1, A2 e A4 é de 1311 pb, a esperada para T+1, T2 e T4 é de 1650 pb e a de G+1, G1 e G4 é de 1380 pb. Como é possível observar (Figura 35B) foram confirmados os genótipos dos controles diplóides e dos clones haplóides A2, A4, T2 e G1, já que T4 e G4 não apresentaram bandas referentes às reações 2 e 3. Para os testes de complementação foram utilizados os clones A2, T2 e G1, com os seus respectivos controles positivos.

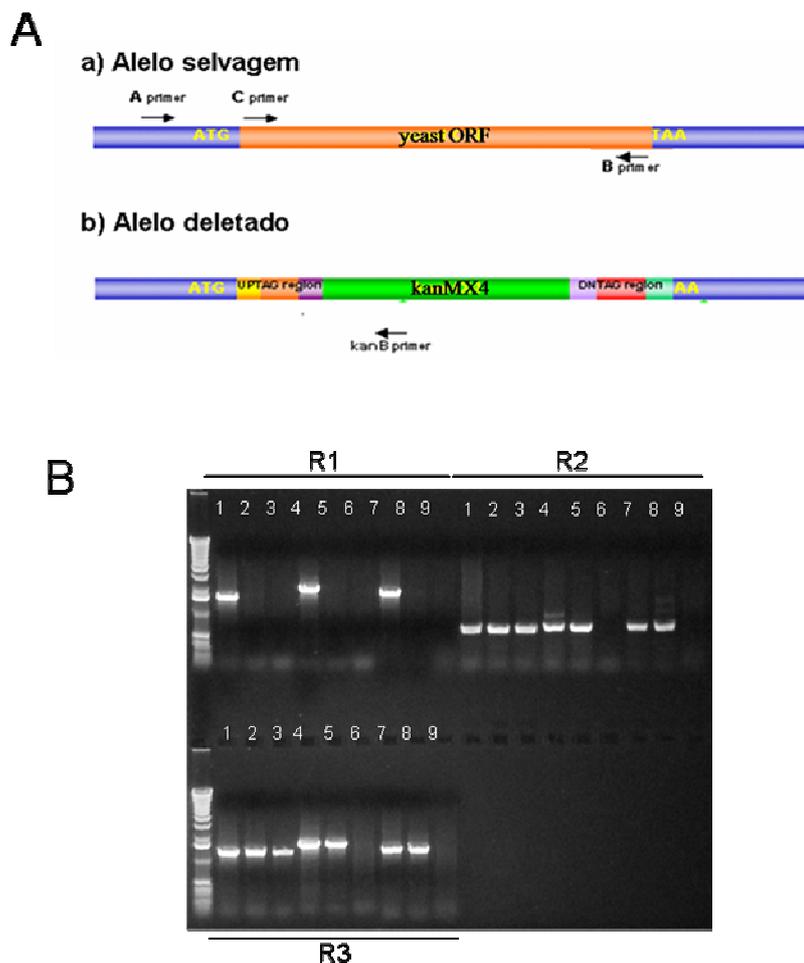


Figura 35: Caracterização molecular das cepas condicionais. **A)** Esquema representando a cópia selvagem (a) e deletada (b) dos genes-alvo nos clones heterozigotos utilizados para a construção das cepas condicionais para *ABD1*, *CET1* e *CEG1* e os sítios de anelamento dos oligodesorribonucleotídeos utilizados nas diferentes reações de PCR. **B)** Gel de agarose 0,8% para análise das reações de PCR para confirmação do genótipo dos clones de levedura construídos para os testes de complementação. R1: amplificação da cópia genômica selvagem. R2: amplificação da deleção. R3: amplificação da cópia selvagem plasmidial. 1: cepa diplóide *ABD1/Δabd1* transformada com YCpGAL-ABD1. 2: clone haplóide deletado A2 (*Δabd1*) transformado com YCpGAL-ABD1. 3: clone haplóide deletado A4 (*Δabd1*) transformado com YCpGAL-ABD1. 4: cepa diplóide *CET1/Δcet1* transformada com YCpGAL-CET1. 5: clone haplóide deletado T2 (*Δabd1*) transformado com YCpGAL-CET1. 6: clone haplóide deletado T4 (*Δabd1*) transformado com YCpGAL-CET1. 7: cepa diplóide *CEG1/Δceg1* transformada com YCpGAL-CEG1. 8: clone haplóide deletado G1 (*Δceg1*) transformado com YCpGAL-CEG1. 9: clone haplóide deletado G4 (*Δceg1*) transformado com YCpGAL-CEG1. Observam-se as bandas correspondentes à amplificação da cópia genômica selvagem apenas nos controles diplóides (R1 canaletas 1, 4 e 7). As bandas correspondentes à cópia genômica deletada aparecem em todos os clones em teste (R2), exceto por T4 e G4, o mesmo ocorrendo com relação às cópias plasmidiais (R3). Assim, foi possível selecionar os clones A2, T2 e G1 para os testes de complementação.

4.6.2. Ensaio de complementação das atividades formadoras de *cap* de pré-mRNA

Os clones hapóides selecionados, juntamente com seus controles positivos, foram transformados com o plasmídeo YEp-ISG95 para a realização dos testes de complementação das atividades de metiltransferase (cepa condicional A2), trifosfatase (cepa condicional T2) e guanililtransferase (cepa condicional G1). Os testes de complementação foram realizados através de diluições das culturas em meio SC-GAL contendo 0,02 mg/mL de histidina, uracila e metionina, 0,03 mg/mL de lisina, 0,2 mg/mL de geneticina e 1 mg/mL de 5-FOA. Como controle positivo de crescimento as cepas foram plaqueadas em paralelo em meio SC-GAL contendo 0,02 mg/mL de histidina e metionina, 0,03 mg/mL de lisina e 0,2 mg/mL de geneticina. (Figura 36A). Se a complementação das atividades formadoras de *cap* em questão estivesse sendo realizada por ISG95 os clones condicionais haplóides deveriam ser capazes de crescer no meio teste contendo 5-FOA, onde a ausência total da expressão dos genes *ABDI*, *CET1* ou *CEG1*, causada pela perda da cópia plasmideal como resultado da ação do 5-FOA, estaria sendo suprida pela proteína ISG95. Porém como é possível observar (Figura 36A) nenhum dos clones em teste foi capaz de crescer em meio seletivo sem a cópia selvagem dos genes *ABDI*, *CET1* e *CEG1*, o que demonstra que ISG95 não foi capaz de desempenhar a atividade desses genes, ou seja, não houve complementação das atividades de metiltransferase, trifosfatase e guanililtransferase por ISG95.

Havia ainda a possibilidade da proteína ISG95 não estar sendo endereçada corretamente para o complexo de iniciação da transcrição. Para excluir essa possibilidade foi construído um clone para expressão da fusão de ISG95 com *ceg1*^{K70A}. Este mutante de *CEG1* não apresenta a atividade de guanililtransferase, porém possivelmente endereçará a fusão ao complexo onde as atividades formadoras de *cap* são necessárias (Ho et al., 2000). Dessa forma ISG95 estará em contato com os pré-mRNAs nascentes, e caso tenha atividade de guanililtransferase, trifosfatase ou metiltransferase poderá desempenhá-las no local apropriado.

Assim, o segundo teste de complementação foi realizado com os plasmídeos YEpISG95-*ceg1*^{K70A} e YEp*ceg1*^{K70A} (controle negativo) através de seu plaqueamento em meio seletivo SC-GAL contendo 0,02 mg/mL de histidina, uracila e metionina, 0,03 mg/mL de lisina, 0,2 mg/mL de geneticina e 1 mg/mL de 5-FOA (Figura 36B). A fusão ISG95-*ceg1*^{K70A} não foi capaz de crescer em meio seletivo contendo 5-FOA, condição em que o gene endógeno está ausente pela

perda do plasmídeo contendo a marca *URA3* que o continha. Isso indica que ISG95 não é capaz de complementar a função dos genes de levedura envolvidos na formação de *cap* de mRNA. Esta abordagem foi utilizada com sucesso no caso de proteínas formadoras de *cap* de vírus de insetos (Martins e Shuman, 2002), do vírus vaccinia (Ho et al., 2000; Saha et al., 2003), *C. elegans* (Takagi et al., 2003), para ensaios de interação entre Cet1p e Ceg1p (Hausmann et al., 2001) e também para as proteínas formadoras de *cap* de mamíferos (Saha et al., 1999). Estes resultados, embora negativos, indicam que ISG95 não deve funcionar como uma proteína clássica de síntese de *cap* de pré-mRNAs em eucariotos.

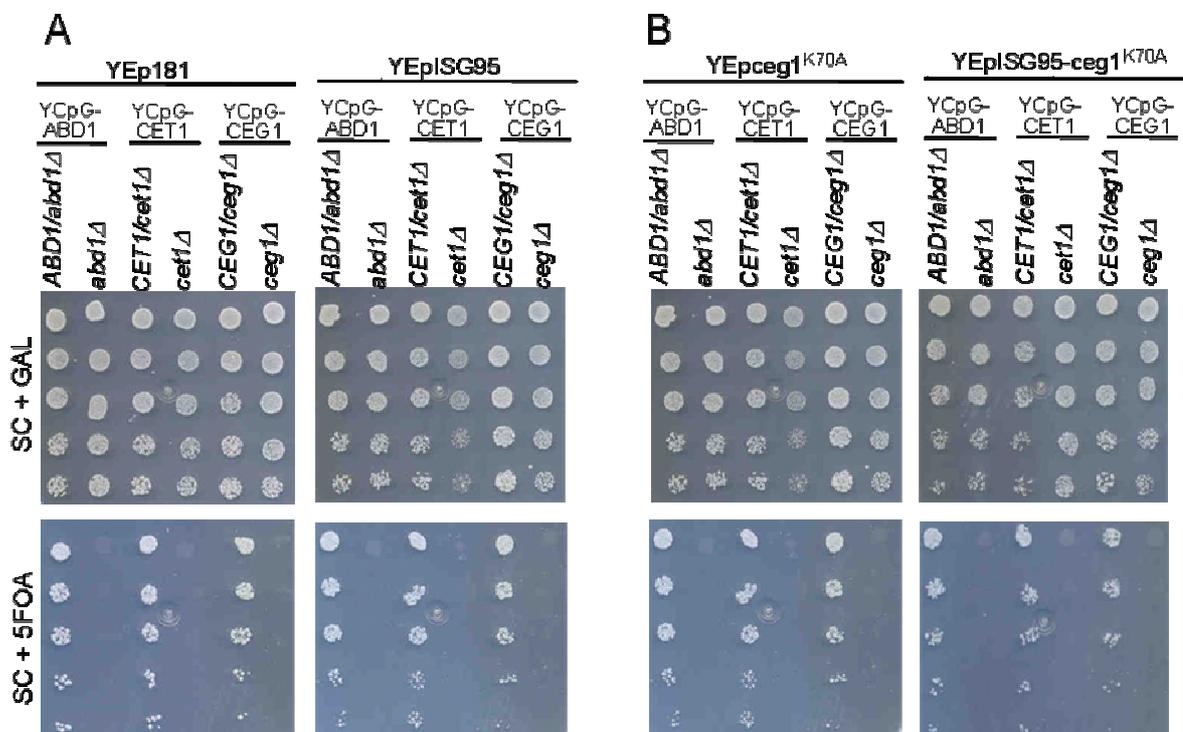


Figura 36: Teste de complementação das atividades de metiltransferase (codificada pelo gene *ABD1*), trifosfatase (codificada pelo gene *CET1*) e guanililtransferase (codificada pelo gene *CEG1*) por ISG95. O teste é realizado em meio contendo 5-FOA, onde a cópia plasmidial do gene cuja atividade está em teste é perdida. O controle negativo para cada um das atividades em teste é realizado através da transformação dos haplóides condicionais com o vetor YEp181 (A) ou YEpcg1^{K70A} (B). Os controles positivos utilizados (A+1, T+1 e G+1) são as cepas diplóides heterozigotas para cada um dos genes em teste e são capazes de crescer independentemente do plasmídeo com que foram transformadas por possuírem uma cópia gênica selvagem dos genes *ABD1*, *CET1* e *CEG1* respectivamente. As cepas condicionais A2, T2 e G1 transformadas com YEp-ISG95 (A) ou YEpISG95-ceg1^{K70A} (B) não foram capazes de crescer em meio seletivo, contendo 5-FOA, o que indica que a perda dos genes essenciais em cada um dos casos não pode ser complementada pela expressão de ISG95 (A) ou mesmo pela fusão ISG95-ceg1^{K70A} (B).

4.7. Ensaio de duplo-híbrido de levedura

4.7.1. Teste de auto-ativação da isca

Após a construção do vetor pTL1-ISG95 este foi co-transformado com pACT2 na cepa L40 para confirmar que somente a expressão da fusão *lexA-ISG95* não levaria à transcrição dos genes repórteres *HIS3* e *LacZ*. Para isso a cepa co-transformada foi plaqueada em meio SC contendo 0,02 mg/mL de adenina e em meio SC contendo 0,02 mg/mL de adenina e histidina (apenas como controle positivo para o crescimento das cepas co-transformadas) (Figura 37). Como se observa pelo não crescimento em meio sem histidina, a isca *lexA-ISG95* não é capaz de auto-ativar os genes repórteres, sendo portanto adequada para o ensaio de duplo-híbrido. Utilizou-se como controle positivo a cepa co-transformada com os vetores pBTM-NIP7 e pACT-NOP8, uma interação já descrita (Zanchin et al., 1999).



Figura 37: Teste de auto-ativação da isca *lexA-ISG95* (DB-SG95) em meio SC contendo 0,02 mg/mL de adenina. Controle de crescimento em meio SC contendo 0,02 mg/mL de adenina e histidina. A fusão DB-ISG95 não é capaz de ativar o gene repórter *HIS3* (não cresce em meio sem histidina) o que permite sua utilização para o ensaio de duplo-híbrido. O controle positivo utilizado para o ensaio é a interação já descrita DB-NIP7 e AD-NOP8.

4.7.2. Rastreamento em larga escala pelo sistema duplo-híbrido de levedura

O rastreamento da biblioteca de cDNA de cérebro fetal com a isca *lexA-ISG95* resultou na obtenção de $8,5 \times 10^6$ colônias transformantes, das quais 123 foram selecionadas por se mostrarem positivas para interação devido ao seu crescimento em meio seletivo sem histidina, o que indica a expressão do gene repórter *HIS3*. Após a coleta das colônias da placa original de duplo-híbrido, estas foram replaqueadas em meio seletivo e 102 colônias tiveram seu crescimento confirmado. Em seguida, realizou-se o teste de atividade de β -galactosidase para confirmação da ativação do segundo gene repórter *lacZ*. A expressão do gene repórter é evidenciada pela coloração azul das colônias no teste. O teste excluiu algumas colônias, restando 60 positivas para ambos os genes repórteres (Figura 38).

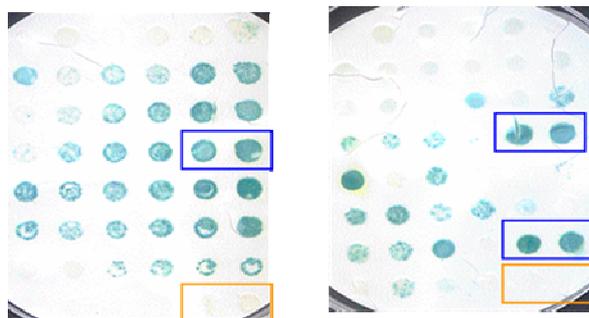


Figura 38: Membranas de nitrocelulose utilizadas no teste de atividade de β -galactosidase. Cada ponto corresponde a uma colônia testada. A coloração azul evidencia expressão do gene *LacZ*, segundo marcador do teste duplo-híbrido, em consequência da atividade de β -galactosidase. As colônias marcadas com retângulo azul correspondem aos controles positivos do teste (cepa L40 co-transformada com pBTM-NIP7 e pACT-NOP8, interação já descrita) e as colônias marcadas com retângulo laranja correspondem aos controles negativos do teste (cepa L40 co-transformada com pTL1-ISG95 e pACT).

O teste de atividade dos dois genes repórteres apontou 60 clones dos quais 42 foram sequenciados. Algumas das proteínas identificadas nesse rastreamento interagindo com ISG95 estão envolvidas no metabolismo de RNA como SmD1, a subunidade 5 do fator de *splicing* 3B e a subunidade maior da RNA polimerase II.

4.7.3. Mapeamento das interações identificadas no rastreamento de duplo-híbrido e teste de auto-ativação das iscas e presas

No intuito de mapear as regiões de ISG95 responsáveis pelas interações com os clones mais interessantes identificados no ensaio de duplo-híbrido foram construídos clones truncados de *ISG95* em fusão a *lexA* no vetor pTL1. As regiões de *ISG95* expressas em fusão a *lexA* em cada um dos clones truncados contruídos, assim como a sequência completa da proteína, estão esquematizados na Figura 39. Os clones escolhidos para o teste de mapeamento da interação foram: SmD1, o CTD da RNA polimerase II, a proteína contendo o domínio CCHC7, Sf3b5, a enzima conjugadora de ubiquitina E2 e uma proteína não caracterizada com domínios de quinase e 3'-5' exonuclease.

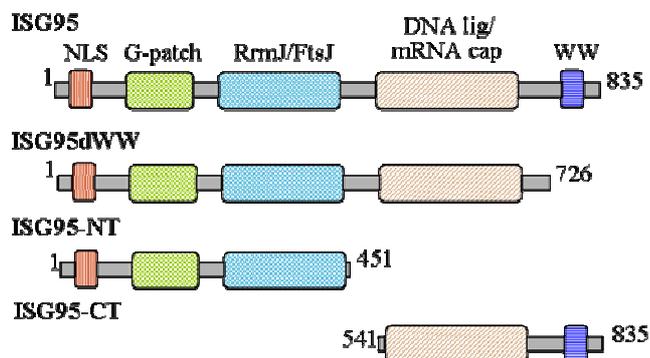


Figura 39: Esquema das regiões de *ISG95* fusionadas à *lexA* no vetor pTL1 e utilizadas para mapear as regiões responsáveis pelas interações com as presas identificadas no duplo-híbrido realizado em larga escala utilizando *ISG95* como isca.

Para o mapeamento das regiões de interação, cada uma das presas de interesse foi co-transformada com as diferentes construções de *ISG95* fusionada à *lexA* no vetor pTL1, ou seja, separadamente com pTL1-*ISG95*, pTL1-*ISGNT*, pTL1-*ISGCT* e pTL1-*ISGdWW*. Inicialmente foi realizado o teste de auto-ativação das iscas para excluir a possibilidade de auto-ativação do gene *HIS3*. Para isso as diferentes iscas (pTL1-*ISG95*, pTL1-*ISGNT*, pTL1-*ISGCT* e pTL1-*ISGdWW*) foram co-transformadas com pACT-NOP8 e plaqueadas em meio seletivo sem histidina. O resultado do teste demonstra (Figura 40) que apenas a construção pTL1-NT apresentava um nível basal de auto-ativação do repórter *HIS3*, porém a adição de apenas 2 mM de 3-AT é capaz de controlar o crescimento da cepa co-transformada, de forma que todas as iscas demonstram ser apropriadas para o rastreamento das regiões de interação com as presas a partir de 2 mM de 3-AT. Como controle positivo do teste utilizou-se a cepa co-transformada com pBTM-NIP7 e pACT-NOP8, uma interação já descrita.

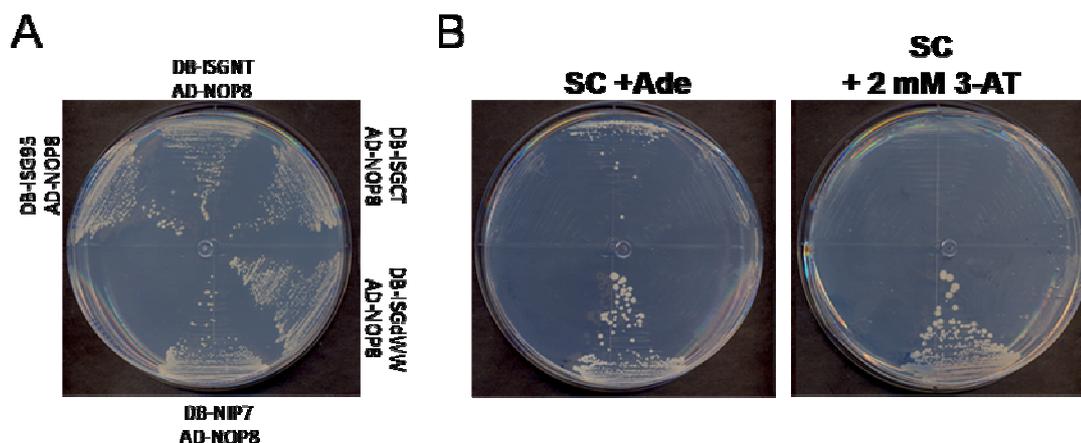
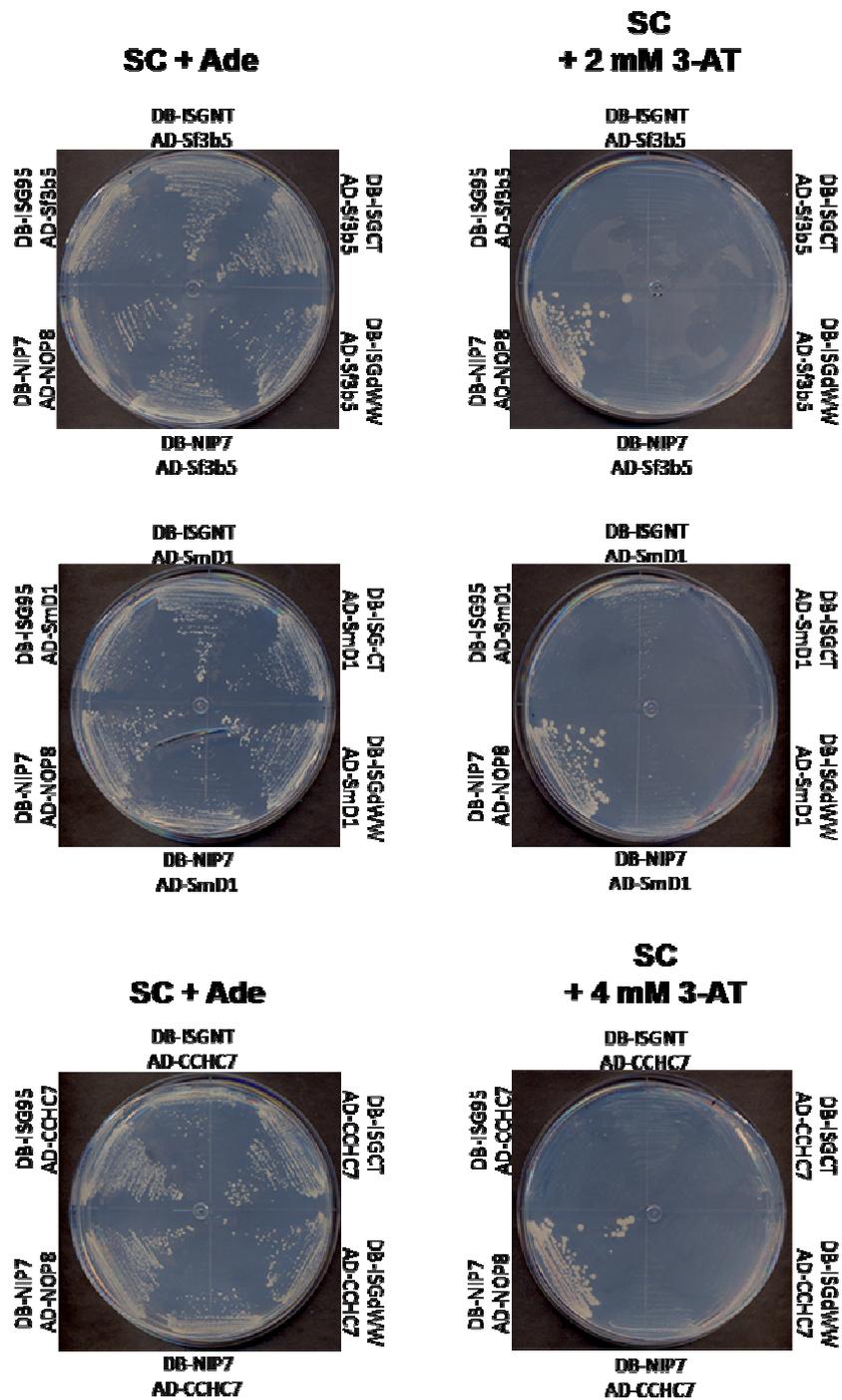


Figura 40: Teste de auto-ativação das iscas utilizadas para o ensaio de mapeamento das interações identificadas no rastreamento em larga-escala. **A)** Cepas co-transformadas com pACT-NOP8 (AD-NOP8) e as diferentes iscas pTL1-ISG95 (DB-ISG95), pTL1-ISGNT (DB-ISGNT), pTL1-ISGCT (DB-ISGCT) e pTL1-ISGdWW (DB-ISGdWW), crescendo em meio contendo 0,02 mg/mL de adenina e histidina. Como controle positivo utilizou-se a cepa co-transformada com pBTM-NIP7 (DB-NIP7) e pACT-NOP8 (AD-NOP8). **B)** Teste de auto-ativação das iscas em meio seletivo SC contendo 0,02 mg/mL de adenina e em meio SC contendo 0,02 mg/mL de adenina e 2 mM 3-AT. A fusão DB-ISGNT demonstra um nível baixo de auto-ativação do gene repórter, que é controlada pela adição de 2mM de 3-AT à placa. Apenas o controle positivo DB-NIP7 e AD-NOP8, cuja interação já foi descrita, continua crescendo em meio contendo 3-AT.

Uma vez demonstrada a adequação das iscas para o ensaio de ativação do repórter *HIS3*, estas foram co-transformadas com as presas de interesse e plaqueadas em meio seletivo para o ensaio de mapeamento das regiões de interação (Figura 41). O controle negativo do ensaio, que funciona como teste de auto-ativação das presas, foi feito através da co-transformação das presas com pBTM-NIP7. A cepa co-transformada com pBTM-NIP7 e pACT-NOP8 foi utilizada como controle positivo do teste.



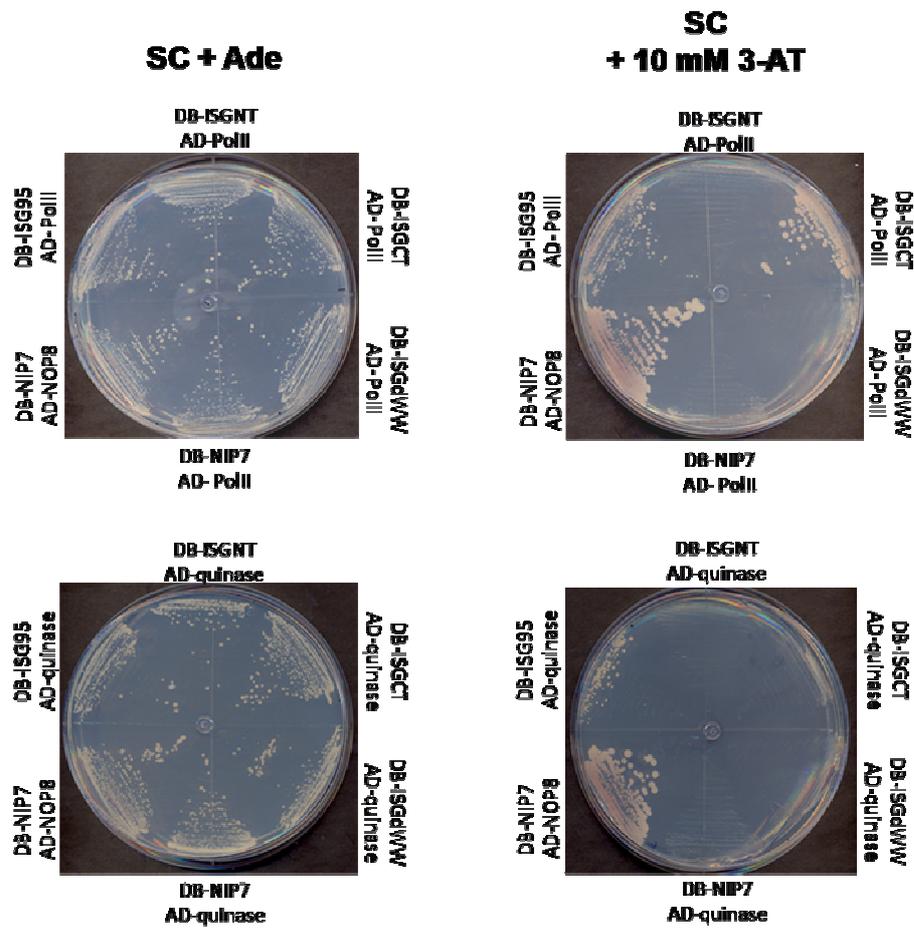


Figura 41: Ensaio de mapeamento dos domínios de ISG95 responsáveis por algumas das interações identificadas no rastreamento de duplo-híbrido em larga escala. O ensaio de mapeamento foi realizado com as presas Sf3b5 (AD-Sf3b5), SmD1(AD-SmD1), CCHC7 (AD-CCHC7), domínio CTD da RNA polimerase II (AD-polII) e a proteína com o domínio quinase/exonuclease (AD-quinase) co-transformadas com cada uma das iscas pTL1-ISG95 (DB-ISG95), pTL1-ISGNT (DB-ISGNT), pTL1-ISGCT (DB-ISGCT) e pTL1-ISGdWW (DB-ISGdWW). Cada linha corresponde ao teste com uma presa e as diferentes iscas, sendo que à esquerda está a placa de crescimento em meio mínimo SC contendo 0,02 mg/mL de adenina e a direita a placa teste de interação. No caso dos clones cuja interação não foi confirmada (onde após a retransformação não houve mais o crescimento em meio seletivo) utilizou-se a concentração de 3-AT suficiente para cessar o crescimento do controle negativo da presa co-transformada com pBTM-NIP7 (2 ou 4 mM de 3-AT). No caso dos clones em que houve confirmação da interação (CTD da RNA polimerase II e proteína quinase/exonuclease) o teste foi realizado em meio SC contendo 10 mM de 3-AT.

O ensaio de mapeamento das interações resultou na exclusão de 4 das 6 interações em teste, previamente identificadas no rastreamento em larga escala. É o caso da interação com a proteína que contém o domínio CCHC7, a Sf3b5, enzima conjugadora de ubiquitina E2 e a SmD1. Essas proteínas não foram mais capazes de interagir com a proteína ISG95 e com nenhum dos clones truncados após a re-transformação em L40, o que fica evidente por sua incapacidade em crescer em meio seletivo com 3-AT. Assim, provavelmente na placa de rastreamento inicial estes clones na verdade se tratavam de falso-positivos. Já o domínio CTD da RNA polimerase II confirmou a interação com a proteína ISG95 inteira e, além disso, interagiu com o domínio C-terminal da proteína, mas não com a construção sem o domínio WW, o que demonstra que a interação entre as duas proteínas ocorre através do domínio WW de ISG95. A proteína não caracterizada com domínios de quinase e 3'-5' exonuclease manteve o crescimento em meio seletivo apenas com a proteína ISG95 completa, não interagindo com nenhum dos clones truncados.

4.7.4. Confirmação da interação com RNA polimerase II por co-Imunoprecipitação

Para confirmar a interação entre ISG95 e a RNA polimerase II identificada através de duplo-híbrido realizou-se um ensaio de co-imunoprecipitação, que confirma a existência das interações *in vivo*. A co-imunoprecipitação foi realizada a partir de extrato nuclear de HeLa em resina proteína A-Sepharose com o anticorpo para KIAA0082 (ISG95). Como controle negativo realizou-se em paralelo uma imunoprecipitação com anticorpo para MafB, uma proteína não relacionada. Observa-se a banda referente à RNA polimerase II apenas no ensaio realizado com o anticorpo para KIAA0082 (ISG95) (Figura 42), o que confirma a existência *in vivo* de interação entre as duas proteínas.

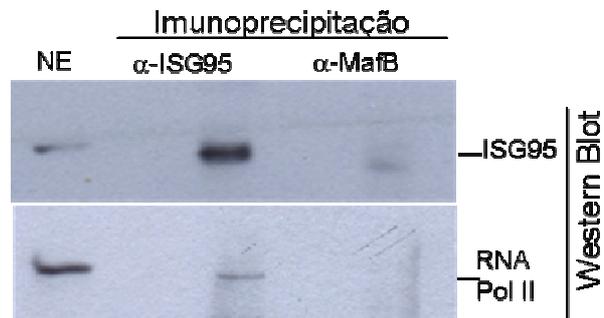


Figura 42: Co-imunoprecipitação a partir de extrato nuclear de HeLa. O anticorpo para ISG95 é capaz de co-imunoprecipitar ISG95 (painel de cima, *Western Blot* com anticorpo para KIAA0082 (ISG95) juntamente com a RNA polimerase II (painel de baixo, *Western Blot* com anticorpo para RNA polimerase II). O controle negativo realizado com anticorpo para MafB não co-imunoprecipita a RNAPolimerase II. NE: extrato nuclear utilizado para o ensaio.

4.8. Ensaio de *splicing* de pré-mRNA *in vitro*

Com base na interação de ISG95 com o CTD da RNA polimerase II e de sua interação com RNA levantou-se a hipótese de que sua função poderia estar relacionada ao processamento de pré-mRNA, mais especificamente ao processo de *splicing*. Com o objetivo de explorar essa hipótese utilizou-se o plasmídeo *template* para síntese do pré-mRNA AdML, cedido pela Dr. Robin Reed, da Harvard Medical School. O ensaio realizado para detectar a possível participação de ISG95 no processo de *splicing* utiliza o pré-mRNA AdML marcado radioativamente e após a incubação e processamento deste segue-se a imunoprecipitação do complexo de *splicing* através de anticorpos específicos. A análise do RNA extraído das imunoprecipitações em gel de acrilamida desnaturante permite acompanhar o processamento do pré-mRNA, com os intermediários e produto de *splicing*. No caso, como controles positivos do teste foram utilizados para a imunoprecipitação os anticorpos para hnRNPA1 e para SmD1 (contra proteínas que sabidamente fazem parte do complexo de *splicing*), e como controles negativos anticorpos para MafB e para SBDS, além do teste com o anticorpo para KIAA0082 (ISG95).

O ensaio realizado (Figura 43) não permitiu a observação das bandas relativas ao processamento do pré-mRNA AdML após a imunoprecipitação com anticorpo para KIAA0082 (ISG95), porém tão pouco foi possível a observação das bandas esperadas nas canaletas referentes à imunoprecipitação dos controles positivos SmD1 a hnRNPA1. Dessa forma com base apenas nesses resultados não é possível confirmar nem tão pouco refutar a hipótese de ISG95 esteja associada ao complexo responsável pela realização do *splicing*. Possivelmente a

ausência de bandas no teste com ISG95 e nos controles positivos se deva à baixa eficiência durante a imunoprecipitação. Contudo, embora não de maneira nítida, é possível observar bandas na canaleta referente à extração de RNA do sobrenadante da imunoprecipitação de MafB (F MafB). Essas bandas referem-se ao processamento do pré-mRNA AdML e demonstram que embora as imunoprecipitações não tenham sido eficientes, o extrato nuclear de HeLa preparado é competente para a realização de *splicing*.

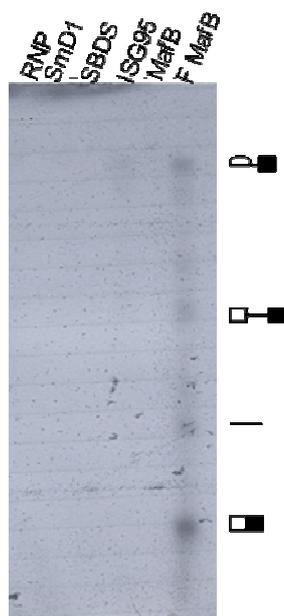


Figura 43: Teste de associação ao complexo de *splicing* através de imunoprecipitação e análise do RNA associado em gel de acrilamida 5,6% desnaturante. As bandas correspondentes ao *splicing* do pré-mRNA AdML só são visíveis na canaleta correspondente ao sobrenadante da imunoprecipitação de MafB (F MafB), não podendo ser observadas no teste com ISG95 e nem mesmo com os controles positivos hnRNPA1 (RNP) e SmD1 e também nos controles negativo MafB e SBDS. ■ Intron + exon 2. □ pré-mRNA AdML — Intron □ RNA AdmL

5. DISCUSSÃO

Durante uma infecção viral, o primeiro mecanismo de defesa do hospedeiro a responder é a via dos interferons. Em resposta à infecção, as células passam a produzir essas moléculas sinalizatórias, que por sua vez estimulam diferentes procesos celulares, como a expressão de genes específicos, chamados ISGs (*interferon stimulated genes*), responsáveis pela determinação de um estado celular antiviral, que limita a replicação viral. Os interferons também regulam a sobrevivência e morte celular, além de possuírem papel estimulatório da resposta imunológica, através da indução da expressão de moléculas de MHC nas células infectadas (o que aumenta a eficiência de apresentação de antígenos), também auxiliam na ativação de células NK (*natural killer*), promovem a proliferação de linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos e a maturação de células dendríticas (Borden et al., 2007).

Durante o processo de determinação de um estado antiviral centenas de ISGs têm sua expressão induzida em resposta à via de sinalização iniciada pela ligação dos interferons a seus receptores na superfície celular. Embora possuam importante papel protegendo a célula da infecção e limitando a replicação e conseqüentemente a dispersão viral, muitos dos produtos da expressão de ISGs ainda não têm função conhecida. Num primeiro esforço para identificar o conjunto de ISGs expressos durante a determinação do estado antiviral, diversos estudos de análise global da expressão gênica vêm sendo conduzidos analisando as alterações de expressão gênica em resposta ao tratamento celular com interferons ou em resposta a infecção por vírus específicos. Numa revisão desses artigos identificamos KIAA0082/ISG95. Sua expressão é induzida durante a resposta à infecção por HCV (vírus da hepatite C) (Su et al., 2002) e por VACV (vírus vaccinia) (Guerra et al., 2003), após o tratamento com interferon em diferentes tipos celulares (Geiss et al., 2003), em resposta ao tratamento com oligodeoxinucleotídeos CpG em células PBMC (células mononucleadas de sangue periférico) (Kato et al., 2003) e também em linfócitos T ativados (Holmes et al., 2005) e em células leucêmicas (Einav et al., 2005). A análise da estrutura primária de KIAA0082/ISG95 levou à identificação de quatro domínios: o domínio G-patch, indicativo de uma possível função de ligação a ácidos ribonucleicos, o domínio FtsJ que indica atividade metiltransferase (embora seja distinto dos domínios dessa classe encontrados no homem), o domínio de DNA ligase/proteínas de *capping* que sugere uma função relacionada ao processamento de pré-mRNAs, especificamente *capping*, e por fim o domínio WW relacionado a

interações proteína-proteína. Foi identificado também em sua extremidade N-terminal um sinal de localização nuclear.

O conjunto de domínios identificados em KIAA0082/ISG95, que indicavam para uma possível função da proteína durante o processamento de pré-mRNA, assunto de interesse em nosso laboratório, aliado ao sinal de localização nuclear e aos dados de expressão gênica, que indicavam uma possível associação entre KIAA0082/ISG95 e a resposta celular à infecção viral, nos motivaram a buscar caracterizar sua função biológica. Para isso realizamos diversos experimentos com o objetivo de demonstrar nossa hipótese, onde KIAA0082/ISG95 faria parte da resposta celular a interferon, com função possivelmente associada à maturação de pré-mRNAs (inicialmente se propôs que estivesse associada ao processo de *capping* e posteriormente, como base nos resultados obtidos, ao processo de *splicing*).

A análise da sequência promotora do gene KIAA0082/ISG95 não permitiu a identificação de nenhum elemento de resposta a interferon (ISRE, *interferon-stimulated response element*). Com o objetivo de determinar se KIAA0082/ISG95 realmente se tratava de uma ISG, ou seja, de um gene cuja expressão é estimulada em resposta a interferon, elaborou-se um ensaio de atividade promotora. Esse ensaio foi realizado em células Vero, que não possuem os genes que codificam os interferons α e β (Diaz et al, 1988), para assegurar que a resposta observada fosse devida ao interferon adicionado ao meio de cultura, e não ao produzido em resposta à transfecção celular. O ensaio se baseou na análise da expressão da proteína repórter SEAP (*secreted alkaline phosphatase*) clonada sob o controle de diferentes extensões do promotor de KIAA0082/ISG95 após a adição de interferon ao meio. As regiões promotoras utilizadas no ensaio foram determinadas após a identificação de regiões conservadas evolutivamente através do alinhamento com diversos ortólogos, utilizando-se para isso a ferramenta mVISTA (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>). Os resultados obtidos demonstraram que o promotor de KIAA0082/ISG95 responde à estimulação com interferon α em níveis bastante semelhantes ao do controle positivo utilizado (a sequência ISRE de ISG15). Além disso, demonstraram que a sequência mínima utilizada no ensaio, constituída de 185 pares de bases *upstream* ao sítio de início da transcrição, é suficiente para a resposta, indicando que o elemento de resposta a interferon se localiza nesse intervalo do promotor de KIAA0082/ISG95. A partir desses resultados, a proteína até então

conhecida por KIAA0082, passou a ser chamada de ISG95, devido ao acrônimo utilizado para proteínas dessa família (ISGs) e ao seu peso molecular aparente de 95 kDa.

A sequência de 185 pares de bases identificada, suficiente para a resposta ao tratamento com interferon, foi submetida à análise para identificação de sítios reconhecidos por fatores de transcrição. A análise foi realizada através da ferramenta TFSearch (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) e identificou sequências reconhecidas pelos fatores AML-1a, Sp1, CREB, CBP/p300, GATA-1, v-Jun, cREL, CP2, E2F e SRY. O fator de transcrição AML-1a tem importante papel na hematopoiese e o gene que o codifica frequentemente é alterado por fusões gênicas ou mutações pontuais em indivíduos leucêmicos (Song et al., 1999; Downing et al., 2000; Lorsbach e Downing, 2001; Speck e Gilliland, 2002). A deleção desse gene em camundongos é letal, sendo que nos embriões há total ausência de células eritróides, mielóides e megacariócitos, o que indica um bloqueio completo no processo hematopoiético (Okuda et al., 1996; Sasaki et al., 1996; Wang et al., 1996; Georges et al., 2002). O fator Sp1 faz parte da família Krüppel-like com papel na regulação de um grande número de genes envolvidos em praticamente todos os processos celulares. Sp1 especificamente possui atividade transcricional ativadora (Suske, 1999; Ryu et al., 1999), interage com CBP/p300 (Kaczynski et al., 2003) e desempenha importante papel durante a embriogênese (Marin et al., 1997; Black et al., 2001; Lomber e Urrutia, 2005). O fator CREB (*cyclic AMP response element binding protein*) foi inicialmente identificado como alvo da via de sinalização do cAMP, porém atualmente sabe-se que é alvo de diversas vias de sinalização, iniciadas por diferentes estímulos. Esse fator é crítico para diversos processos celulares como proliferação, diferenciação e para o desenvolvimento de respostas adaptativas (Shaywitz e Greenberg, 1999). Em camundongos, demonstrou-se que também é necessário durante o desenvolvimento para a geração do repertório normal de linfócitos T (Barton et al., 1996). O fator CBP/p300 (*CREB binding protein*) se liga especificamente a CREB fosforilado e é essencial para sua ativação estímulo induzida. CBP/p300 interage diretamente com fatores da maquinaria basal de transcrição, como RHA, TFIID e TFIIB e evidências sugerem que ele funcione como uma ponte, que permite que CREB recrute e estabilize a maquinaria basal de transcrição na região promotora (Kee et al., 1996; Nakajima et al., 1997; Cho et al., 1998). Além disso, CBP/p300 possui atividade acetiltransferase agindo tanto sobre as histonas (Ito et al., 2000; Zhang et al., 2000), induzindo a configuração aberta da cromatina, o que facilita a transcrição,

quanto sobre alguns fatores de transcrição, tendo efeito direto sobre a atividade dos mesmos (Waltzer et al., 1998; Chen et al., 1999). Sabe-se que CBP/p300 interage com o *enhanceossomo* no promotor do gene de interferon β , criando uma superfície de interação para o recrutamento da maquinaria basal de transcrição (Wathelet et al., 1998). O fator GATA-1 é expresso principalmente em células do sistema hematopoiético, possuindo papel essencial para a eritropoiese (Pevny et al., 1995; Ferreira et al., 2005). GATA-1 interage com o fator Sp1 (Gregory et al., 1996) e comumente os sítios de ligação para esses fatores se encontram próximos no promotor de diversos genes (como ocorre no caso do promotor de ISG95), o que indica uma cooperação funcional entre eles. O fator GATA-1 é acetilado por CBP/p300 (Blobel et al., 1998; Boyes et al., 1998), cuja sequência alvo de ligação também está presente no promotor de ISG95. Estudos sugerem que esse fator de transcrição possui papel tipo celular-específico na indução de genes de MHC mediada por interferon γ e que também possuem papel no desenvolvimento de linfócitos do tipo Th2 (Ranganath e Murphy, 2001). O fator cREL faz parte da família Rel/NF-kappa B de fatores de transcrição, envolvida no controle de diversos processos celulares como a resposta imune e inflamatória, desenvolvimento, crescimento celular e apoptose, sendo que a maior parte dos alvos dos fatores de transcrição dessa família são citocinas, receptores de citocinas e moléculas imuno-modulatórias (Grossmann et al., 1999). Fatores de transcrição dessa família ligam-se ao DNA na forma de dímeros, e a diversidade combinatória entre membros da família contribui para a regulação de conjuntos distintos de genes (Ghosh et al., 1998). São responsáveis pela indução de IRFs (*interferon responsive factor*) que são fatores de transcrição com papel central na via de sinalização dos interferons. Além disso, são essenciais para a ativação de linfócitos e atividade imune (Gerondakis et al., 1998). CP2 é um fator de transcrição de expressão ubíqua e se associa a GATA-1 na regulação de promotores eritróides (Bose et al., 2006). E2F faz parte de uma família de fatores de transcrição com importante papel no controle do ciclo celular regulando a transcrição de genes necessários para a transição G1/S (Lam e LaThangue, 1994). Estudos mostram que a supressão do crescimento celular em células hematopoiéticas tratadas com interferon α é mediada pela regulação da atividade de E2F (Iwase et al., 1997). Embora não possamos afirmar qual desses fatores de transcrição está envolvido na ativação do promotor de *ISG95* em resposta a interferon, uma breve revisão das atividades relacionadas a cada um deles permite a identificação da importância desses fatores para a

hematopoiese, desenvolvimento do repertório de linfócitos, regulação da proliferação celular e durante o estabelecimento da resposta imunológica, o que condiz com os dados de expressão de *ISG95*.

Para determinação da localização sub-celular de *ISG95* e a funcionalidade de seu sinal de localização nuclear realizou-se sua fusão à GFP (*green fluorescent protein*) seguida pela análise de sua localização em células HeLa. A proteína de fusão GFP-*ISG95* se localizou no núcleo, aparentemente excluída do nucléolo, o que é coerente com seu sinal de localização e com a função hipotetizada para ela no processo de maturação de pré-mRNAs. A localização nuclear foi confirmada por *Western Blot* com anticorpo para KIAA0082 (*ISG95*) em extrato nuclear de HeLa.

Para a realização de ensaios funcionais com o objetivo de determinar a atividade dos domínios identificados em *ISG95* foi necessária a produção da proteína recombinante. Inicialmente tentou-se a expressão da proteína em um sistema procariótico, utilizando-se para isso diversas cepas de *E. coli*. A expressão da proteína e de diferentes construções truncadas em fusão a hexa-histidina demonstrou ser essencialmente insolúvel em todas as cepas e condições de indução testadas. Com o objetivo de melhorar a solubilidade da proteína recombinante foram construídos clones de *ISG95* e de seus domínios em fusão à MBP (*maltose binding protein*). As proteínas de fusão apresentaram grande melhora com relação à solubilidade, porém a purificação demonstrou ser um passo limitante. O fracionamento por afinidade em resina de amilose apresentou resultados inesperados no sentido de que a proteína de fusão se liga à resina, porém não elui na presença de maltose. Isso indica que a interação entre a proteína de fusão e a resina ocorre através de mecanismos outros que o esperado entre MBP e a amilose imobilizada na resina. Buscando eluir a proteína de interesse da resina, foi realizada a digestão da proteína de fusão com a protease TEV. Porém, uma vez liberada no tampão de reação sem a fusão à MBP ocorreu a precipitação de *ISG95*. Isso ocorre provavelmente devido à desestabilização da estrutura terciária obtida por *ISG95* em fusão à MBP, de forma que, uma vez desfeita a fusão, a conformação de *ISG95* deixa de ser estável e as moléculas de proteína agregam e precipitam no tampão. Os fracionamentos por afinidade a níquel e por troca iônica da fusão MBP-*ISG95* apresentaram resultados melhores, porém a forte degradação impediu a obtenção da proteína de interesse através dessas estratégias. Foi realizada também a renaturação da fração insolúvel da

expressão da fusão MBP-ISG95 seguida por fracionamento por exclusão molecular. Observou-se, porém, a eluição da proteína de interesse juntamente com os demais contaminantes em um único pico, o que pode indicar agregação ou degradação da proteína durante o processo de fracionamento. Partiu-se então para a expressão da proteína recombinante em um sistema eucariótico, através do sistema baculovírus em células de inseto Sf9. Nesse sistema ISG95 foi expressa em fusão a hexa-histidina e dois dias após a infecção as células são coletadas e o extrato submetido a dois passos de purificação: o primeiro por afinidade a níquel e o segundo por troca aniônica em resina Mono Q. Não foi possível obter alto grau de pureza através do método cromatográfico desenvolvido e por isso optamos por realizar em paralelo a expressão e purificação da proteína não relacionada STC1, também em fusão a hexa-histidina. Através dessa estratégia buscamos obter frações correspondentes de eluição a partir da expressão de uma proteína não-relacionada nas mesmas condições de ISG95 com o objetivo de utilizar como controle negativo nos ensaios de atividade, partindo do princípio de que a maior parte dos contaminantes presentes na purificação de ISG95 estaria presente também na purificação realizada em paralelo.

Uma vez possuindo ISG95 parcialmente pura e a fração de contaminantes controle obtida pela purificação de STC1 nas mesmas condições, foram iniciados os ensaios de atividade. ISG95 foi capaz de se ligar a RNA em um ensaio utilizando RNA marcado com biotina e resina Streptavidina-Sepharose. A proteína se associou à resina apenas na presença de RNA marcado, demonstrando a especificidade da interação com o RNA e não com a resina utilizada. A interação com RNA possivelmente se dá através do domínio G-patch de ISG95, cuja função é relacionada à interação com ácidos ribonucleicos. O RNA marcado utilizado no ensaio de interação possui uma sequência de nucleotídeos aleatória, derivada do vetor pET28a, o que indica que a interação de ISG95 com RNA não é sequência-específica.

ISG95 interagiu também com S-adenosilmetionina (SAM) acoplada à resina EAH-Sepharose 4B, possivelmente através do domínio FtsJ. Demonstrou-se também a atividade de metiltransferase para a proteína ISG95 em um ensaio *in vitro*, sendo o receptor de grupo metil a proteína MyBP (*myelin basic protein*). Testou-se também a proteína GST-SmD1 como substrato para a reação de metilação, e para isso realizou-se a expressão em *E. coli* e purificação por afinidade à glutationa dessa proteína de fusão. A escolha dessa proteína para o teste de metilação

catalisado por ISG95 se baseia no fato de SmD1 ser parte do complexo *spliceossomo*, responsável pela reação de *splicing* de pré-mRNAs, e por seu estado de metilação estar intimamente relacionado à sua função. Como uma das funções propostas para ISG95 é a de atuar no processo de *splicing*, havia a possibilidade de fatores associados ao complexo *spliceossomo* serem substratos para sua atividade enzimática. Porém, ISG95 não foi capaz de utilizar SmD1 como substrato, metilando apenas MyBP, uma proteína frequentemente utilizada como substrato em ensaios de metilação. Além disso, os resultados negativos nos ensaios de metilação de RNA indicam que ISG95 tem como alvo apenas substratos protéicos. Dentre os domínios identificados em ISG95, o domínio FtsJ é o que possui maior conservação de sequência de aminoácidos (Figura 44A, alinhamento executado através da ferramenta ClustaW, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), o que indica que a atividade metiltransferase associada a ele foi mantida, em concordância com os dados obtidos para ISG95. Porém, esse domínio possui como substrato o RNA ribossomal 23S em *E. coli*, ao contrário do observado para ISG95, onde o substrato de metilação é protéico. Com relação ao tipo de metilação realizada por ISG95 não se demonstrou quais os aminoácidos são os aceptores do grupo metil, se a proteína alvo é mono ou dimetilada e, no caso de ser dimetilada, se isso ocorre de forma simétrica ou assimétrica, porém essas informações ainda podem ser obtidas através de espectrometria de massas.

Foi realizado também um ensaio de atividade de guaniltransferase, no intuito de demonstrar a atividade do domínio guaniltransferase/DNA ligase de ISG95. Esse ensaio se baseia na formação de um complexo estável entre a proteína com atividade guaniltransferase e GMP, o que ocorre através de uma ligação covalente. ISG95 não foi capaz de formar uma ligação covalente com GMP marcado, o que demonstra que ela não possui atividade guaniltransferase, esperada pela presença do domínio guaniltransferase/DNA ligase, encontrado em proteínas de *capping* de pré-mRNA, entre outras.

O ensaio de GTP *crosslinking* demonstrou que ISG95 se liga à GMP, porém não de forma covalente. Esse resultado se relaciona aos resultados obtidos no ensaio de atividade trifosfatase realizado com ISG95. Neste ensaio, ISG95 demonstrou ser capaz de clivar ATP, possuindo assim atividade ATPase. O ensaio mostrou também que GTP funciona como inibidor competitivo, porém a afinidade de ISG95 por ATP é maior que por GTP. O domínio guaniltransferase/DNA

ligase identificado em ISG95 é encontrado em proteínas de *capping* de pré-mRNA, em DNA ligases e RNA ligases (Sawaya e Shuman, 2003). No caso das RNA-ligases, ocorre a formação de um intermediário covalentemente ligado entre a proteína e o AMP (Ho e Shuman, 2002). A atividade de trifosfatase observada para ISG95 advém da liberação do fosfato γ do $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. Não foi possível (através do ensaio de trifosfatase realizado) determinar se ISG95 forma ou não um intermediário covalente com AMP, e para confirmar essa hipótese é necessária a realização de um novo ensaio, desta vez com $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP. Caso haja a formação deste intermediário com AMP é possível que o domínio guanililtransferase/DNA ligase identificado em ISG95 possua atividade RNA ligase. Proteínas com essa atividade são relacionadas ao reparo, *splicing* e edição de RNA (Ho e Shuman, 2002). Por outro lado, embora a fração correspondente da purificação realizada em paralelo com a proteína STC1 tenha sido usada como controle negativo para o ensaio de atividade de trifosfatase, e embora a reação realizada com o controle negativo tenha mantido níveis bastante baixos de liberação de Pi radioativo durante todo o tempo analisado não podemos excluir a possibilidade de que a atividade observada se deva a uma trifosfatase copurificada com ISG95 a partir de células Sf9, já que o domínio guanililtransferase/DNA ligase encontrado em ISG95 é o que apresenta menor conservação de seqüência, de forma que também é possível que tenha sido mantida apenas a função estrutural com perda de atividade biológica (Figura 44B, alinhamento executado através da ferramenta ClustaW, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

confirmação dos genótipos foi em última instância realizada através de três reações de PCR, uma para amplificação da cópia genômica selvagem do gene em questão (presente apenas nos controles diplóides heterozigotos), uma para a amplificação da deleção (presente nos diplóides e haplóides desejados para a construção da cepa condicional) e, por fim, uma reação para amplificação da cópia selvagem do gene em questão contida no plasmídeo transformado sob o controle do promotor *GALI* (presente tanto nos haplóides quanto nos diplóides). Uma vez com as cepas condicionais confirmadas foram realizados os ensaios de complementação das atividades de metiltransferase, trifosfatase e guanililtransferase por *ISG95*. Para isso as cepas condicionais foram transformadas com um plasmídeo codificando *ISG95* e plaqueadas em meio contendo 5-FOA, o que induz a perda da cópia do gene selvagem cuja atividade está em teste. *ISG95* não demonstrou possuir nenhuma das atividades em teste, não tendo sido capaz de complementar a perda de *ABD1*, *CET1* e *CEG1* em levedura. O ensaio de complementação das atividades de *capping* de pré-mRNA em levedura já foi utilizado com sucesso para diversas proteínas humanas, virais e de levedura (Saha et al., 1999; Changela et al., 2001; Saha et al., 2003; Takagi et al., 2003). Para excluir a possibilidade de que isso se devesse a um problema de endereçamento de *ISG95*, ou seja, de que ela não estivesse desempenhando as atividades em teste devido ao fato de não estar sendo localizada corretamente para o sítio onde essas atividades são requeridas, foi construída uma fusão entre *ISG95* e uma versão mutada de *CEG1*, chamada *ceg1^{K70A}*, onde a conversão da lisina na posição 70 por alanina causa a perda de sua atividade guanililtransferase (Shibagaki et al., 1995). A fusão também não foi capaz de complementar as atividades de *capping* em levedura. A estratégia de fusão também já foi utilizada com sucesso para outras proteínas (Ho et al., 2000; Hausmann et al., 2001; Martins e Shuman, 2002), embora nesses casos a fusão tenha sido realizada à clones truncados de *MCE1* (gene que codifica para a enzima com atividades guanililtransferase e trifosfatase de mamíferos) e não à *ceg1^{K70A}*. Com base nesses resultados concluímos que *ISG95* não possui atividade relacionada ao *capping* de pré-mRNAs, possivelmente estando relacionada a outros mecanismos de processamento de pré-mRNA, como o *splicing*.

Tendo em vista a dificuldade em se obter informações funcionais sobre *ISG95* optou-se por identificar as interações com outras proteínas através do método duplo-híbrido de levedura. Os resultados obtidos indicaram a interação de *ISG95* com o domínio CTD da RNA polimerase II e

com uma proteína ainda não caracterizada com domínios quinase e 5'-3' exonuclease. Não ficou claro porque as interações inicialmente identificadas com Smd1, Sf3b5, a proteína com domínio CCHC7 e a enzima conjugadora de ubiquitina E2 não se confirmaram após a re-transformação na cepa L40 de cada uma das presas separadamente com ISG95 ou com qualquer um dos clones truncados construídos para o mapeamento das regiões de interação. As interações com Smd1 e Sf3b5 eram de especial interesse, já que são componentes do complexo de *splicing*, e a interação direta de ISG95 com cada uma delas seria um forte indício de sua associação com o processo de *splicing*. A interação com o domínio CTD da RNA polimerase II ocorreu com os clones de ISG95 inteira e com o domínio C-terminal, mas não com o clone que codifica para a região C-terminal de ISG95 sem o domínio WW. Isso indica que a interação de ISG95 ao domínio CTD se dá através do domínio WW. Já a interação com a proteína não caracterizada com domínios quinase e exonuclease se dá apenas com o clone que codifica ISG95 completa, não tendo sido possível mapear a região responsável pela interação.

O domínio CTD (*C-terminal domain*) da RNA polimerase II é um domínio único, composto de 52 repetições do heptapeptídeo YSPTSPS em mamíferos. Esse domínio tem papel central no processo de transcrição e também coordena os eventos de maturação de pré-mRNAs através do recrutamento diferencial de fatores de acordo com seu estado de fosforilação, que se altera durante o ciclo de transcrição. A fosforilação do domínio CTD ocorre principalmente nos resíduos S2 e S5 e, dependendo do nível de fosforilação, é possível reconhecer duas formas da polimerase, uma hipofosforilada, conhecida como IIA, e outra hiperfosforilada, conhecida como IIO. Assim, no início da transcrição, em regiões próximas a promotores, a forma hipofosforilada (IIA) é recrutada, e durante a transição entre iniciação e alongação o CTD passa a ser fosforilado, preferencialmente nos resíduos S5, por ação da quinase CDK7 (parte do fator de transcrição TFIIH). Durante a alongação o padrão de fosforilação muda para o resíduo S2 por ação de quinases como a CDK9 (parte do fator de alongação p-TEFb). O padrão de fosforilação em S5 recruta fatores envolvidos no *capping* de pré-mRNAs em regiões próximas a promotores, e a fosfatase Fcp1 é necessária para a liberação das enzimas de *capping* durante a alongação. O CTD hiperfosforilado, característico da polimerase em processo de alongação da transcrição, funciona como plataforma para os fatores envolvidos em *splicing* de pré-mRNAs e por fim o padrão de fosforilação em S2, que aumenta à medida que a transcrição prossegue, é necessário para um

eficiente recrutamento de fatores envolvidos no processamento da extremidade 3' do pré-mRNA. Assim, os diferentes padrões de fosforilação recrutam diferentes fatores, envolvidos em diferentes processos de maturação do pré-mRNA (Orphanides e Reinberg, 2002; Bentley, 2005; Hirose e Ohkuma, 2007).

Estão sendo identificadas diversas proteínas com domínio WW interagindo com o CTD da RNA polimerase II (Gavva et al., 1997; Morris et al., 1999; Chang et al., 2000; Myers et al., 2001; Wu et al., 2001; Li et al., 2002; Fan et al., 2003). Além disso, muitas das proteínas identificadas interagindo com o CTD da RNA polimerase II apresentam também domínios de ligação a RNA, como os SR, encontrados em muitos dos fatores de *splicing* (Yuryev et al., 1996; Tanner et al., 1997; Hollingworth et al., 2006). Os domínios WW são classificados em quatro grupos, de acordo com sua especificidade para ligantes. Os domínios do grupo IV interagem especificamente com domínios fosfo-Ser/Thr-Pro (pS/T-P) (Sudol e Hunter, 2000). Esses domínios são encontrados em grande número no domínio CTD da RNA polimerase II, já que cada heptapeptídeo (YSPTSPS) contém dois possíveis sítios de ligação. Pin1, uma peptidil-prolil-isomerase, possui um domínio WW do tipo IV, e a resolução de sua estrutura tridimensional em conjunto com um heptapeptídeo do CTD da RNA polimerase II permitiu a identificação dos resíduos importantes para a interação (Verdecia et al., 2000). Um alinhamento entre o domínio WW de ISG95 e de Pin1 (executado através da ferramenta ClustaW, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) demonstra que boa parte dos resíduos importantes na interação com o ligante estão conservados em ISG95 (Figura 45). Com base na interação de ISG95 (através de seu domínio WW) com o domínio CTD da RNA polimerase II aqui identificada, e na conservação de resíduos importantes para interação com os resíduos fosforilados do heptapeptídeo do CTD da polimerase identificados por Verdecia e colaboradores, podemos propor que o domínio WW de ISG95 faz parte do grupo IV de domínios WW, que demonstram interação específica com o domínio CTD fosforilado e estão associados a domínios de interação à RNA em diferentes proteínas.

```

Pin WW domain   KLPPGWEKRSSSGRVTYFNHITNASQWERPSG
ISG95 WW domain TVNEPWTMGFSKSFKKIFFYNKKTKDSTFDLPAD
                . : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

Figura 45: Alinhamento entre os domínios WW de ISG95 e Pin1. Os aminoácidos identificados por Verdecia e colaboradores interagindo com a serina fosforilada do heptapeptídeo típico do CTD da RNA polimerase II estão destacados em caixas. Na sequência de ISG95 uma arginina é convertida para lisina e uma tirosina para fenilalanina, porém uma lisina é encontrada nessa posição no domínio WW de Ess1, o ortólogo de Pin1 em *Saccharomyces cerevisiae*, e a alteração de tirosina para fenilalanina não é muito brusca, já que ambos são hidrofóbicos e essa exata alteração em Pin1 causa diminuição na afinidade pelo ligante de apenas 2,5 vezes.

Assim, os dados de duplo-híbrido que indicam a interação de ISG95 com o CTD da polimerase através de seu domínio WW em conjunto com o papel do CTD como plataforma para o ancoramento de fatores relacionados à maturação de pré-mRNAs e a interação de ISG95 com RNAs de maneira independente da sequência nucleotídica levaram à formulação de uma hipótese onde ISG95 interagiria com o CTD da polimerase através do domínio WW e com o pré-mRNA em processo de transcrição através do domínio G-patch, ficando os domínios guanililtransferase e FtsJ livres para modificar seus alvos, provavelmente fatores envolvidos no processo de *splicing* de pré-mRNA. Uma representação gráfica dessa hipótese é apresentada na Figura 46.

A conclusão sobre o a função de ISG95 no processo de *splicing* de pré-mRNAs pode ser alcançada através da realização de ensaios de *splicing* na ausência de ISG95. Para isso ISG95 seria depletada do extrato nuclear de HeLa por imunoprecipitação e se analisaria o processamento do pré-mRNA AdML nessas condições. Um processamento alterado do substrato indicaria um papel de ISG95 no processo, e nesse caso, a adição da proteína recombinante ao ensaio restauraria o correto processamento do pré-mRNA AdML. Além disso, outro ensaio que poderia demonstrar a participação de ISG95 no complexo de *splicing* seria a co-imunoprecipitação dessa proteína em uma reação com anticorpos contra proteínas que sabidamente fazem parte do complexo, como a SmD1. Com relação ao papel desempenhado por ISG95 durante a resposta a infecção viral, seria interessante desenvolver uma linhagem celular com significativa diminuição da expressão de ISG95, obtida por RNAi, e analisá-la quanto a possíveis alterações na eficiência de infecção. A caracterização da função biológica de ISG95, embora não tenha sido concluída no decorrer do projeto, obteve um considerável avanço no período, e esperamos ainda aumentar nossa contribuição através dos experimentos acima citados.

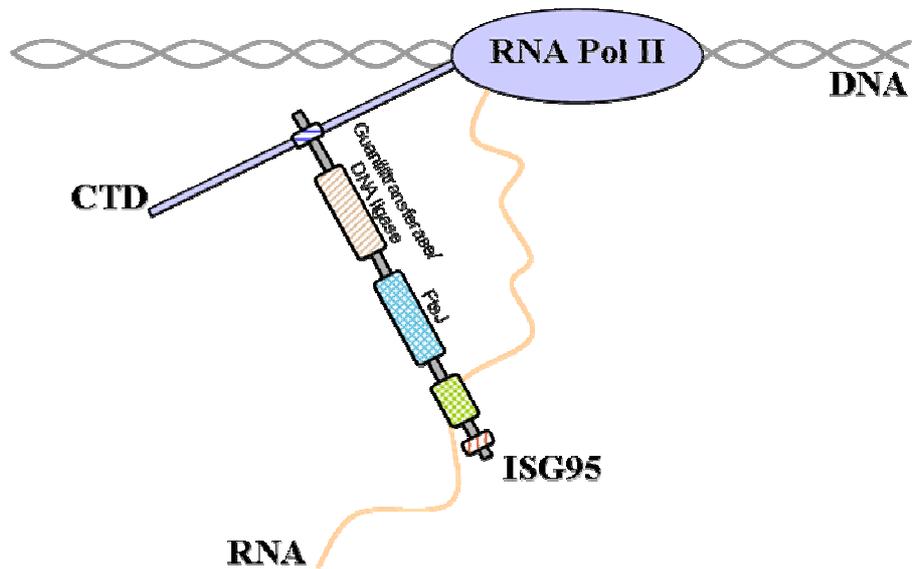


Figura 46: Representação esquemática para o possível papel de ISG95. A proteína interage com o domínio CTD da RNA polimerase II através de seu domínio WW e com RNA através do seu domínio G-patch. Nesse contexto ISG95 poderia desempenhar papel durante o processamento de pré-mRNAs, ficando os domínios guanililtransferase/DNA ligase e FtsJ livres para modificarem seus alvos, possivelmente fatores de *splicing* de pré-mRNA.

6. Conclusões

- ✓ O promotor de *KIAA0082* responde à estimulação por IFN- α em ensaio com a fosfatase secretada SEAP (*secreted alkaline phosphatase*) como repórter. Com base no acrônimo para genes que respondem a interferon e o peso molecular aparente da proteína (95 kDa), *KIAA0082* foi renomeada *interferon stimulated gene 95* (ISG95).
- ✓ Demonstrou-se a localização nuclear de ISG95, aparentemente excluída do nucléolo, através de ensaio de fusão à GFP (*green fluorescent protein*) e fracionamento celular.
- ✓ ISG95 não apresenta atividade guanililtransferase, uma das possíveis atividades relacionadas ao domínio guanililtransferase/DNA ligase.
- ✓ Os ensaios de complementação demonstram que ISG95 não apresenta atividade relacionada ao *capping*, o que indica que sua função deve estar associada a outro mecanismo de processamento de pré-mRNAs.
- ✓ ISG95 apresenta atividade ATPase. O domínio guanililtransferase/DNA ligase é encontrado também em RNA ligases e estas formam ligação covalente com AMP. Porém apenas com os resultados obtidos não é possível confirmar essa atividade para ISG95 e, além disso, não podemos excluir também a possibilidade da atividade trifosfatase observada ser derivada de um contaminante co-purificado, já que a conservação de seqüência do domínio é baixa.
- ✓ ISG95 interage com RNA *in vitro* de forma aparentemente independente de seqüência.
- ✓ ISG95 se liga à S-adenosilmetionina *in vitro*. Além disso, possui atividade de proteína-metiltransferase *in vitro*.
- ✓ Através do método duplo-híbrido de levedura identificaram-se as interações e ISG95 com o domínio CTD da RNA polimerase II e com uma proteína não-caracterizada com domínios quinase e 3'-5' exonuclease.

- ✓ Através do método duplo-híbrido de levedura demonstrou-se também que interação com o CTD da RNA polimerase II se dá através do domínio WW de ISG95, conhecido por mediar interações proteína-proteína.
- ✓ A interação de ISG95 com a RNA polimerase II foi confirmada *in vivo* através de co-immunoprecipitação.
- ✓ Os resultados indicam que a função de ISG95 está relacionada ao processamento de pré-mRNA, mais especificamente ao processo de *splicing*.

7. REFERÊNCIAS

- Ahola T, Kaariainen L. 1995. Reaction in alphavirus mRNA capping: formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl-GMP. *Proc Natl Acad Sci.*, 92(2):507-11.
- Alcamí A, Symons JA, Smith GL. 2000. The vaccinia virus soluble alpha/beta interferon (IFN) receptor binds to the cell surface and protects cells from the antiviral effects of IFN. *J Virol.*, 74(23):11230-9.
- Asaoka K, Ikeda K, Hishinuma T, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. 2005. A retrovirus restriction factor TRIM5alpha is transcriptionally regulated by interferons. *Biochem Biophys Res Commun.*, 338(4):1950-6.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston R, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struha K. 1998. *Currents Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Brooklyn, New York.
- Baculovirus Expression Vector System. Instruction Manual, 6th edition, May 1999*. BD Biosciences.
- Balachandran S, Kim CN, Yeh WC, Mak TW, Bhalla K, Barber GN. 1998. Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. *EMBO J.*, 17(23):6888-902.
- Barnard P, McMillan NA. 1999. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology*, 259(2):305-13.
- Barton K, Muthusamy N, Chanyangam M, Fischer C, Clendenin C, Leiden JM. 1996. Defective thymocyte proliferation and IL-2 production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of CREB. *Nature*, 379(6560):81-85.
- Baurén G, Wieslander L. 1994. Splicing of Balbiani ring 1 gene pre-mRNA occurs simultaneously with transcription. *Cell*, 76(1):183-92.
- Bentley DL. 2005. Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Curr Opin Cell Biol.*, 17(3):251-6.
- Berget S M. 1995. Exon recognition in vertebrate splicing. *J Biol Chem.*, 270(6):2411-4.
- Beyer AL, Osheim YN. 1988. Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts. *Genes Dev.*, 2(6):754-65.
- Bisaillon M, Shuman S. 2001. Functional groups required for the stability of yeast RNA triphosphatase in vitro and in vivo. *J Biol Chem.*, 276(32):30514-20.
- Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J. 2001. Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol.*, 188(2):143-160.
- Blobel GA, Nakajima T, Eckner R, Montminy M, and Orkin SH. 1998. CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95(5):2061-2066.

- Bolitho P, Voskoboinik I, Trapani JA, Smyth MJ. 2007. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Curr Opin Immunol.*, 19(3):339-47.
- Bonvin M, Achermann F, Greeve I, Stroka D, Keogh A, Inderbitzin D, Candinas D, Sommer P, Wain-Hobson S, Vartanian JP, Greeve J. 2006. Interferon-inducible expression of APOBEC3 editing enzymes in human hepatocytes and inhibition of hepatitis B virus replication. *Hepatology*, 43(6):1364-74.
- Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR, Stark GR. 2007. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov.*, 6(12):975-90.
- Bose F., Fugazza C., Casalgrandi M., Capelli A., Cunningham J. M., Zhao Q., Jane S. M., Ottolenghi S., Ronchi A. 2006. Functional Interaction of CP2 with GATA-1 in the Regulation of Erythroid Promoters. *Mol Cell Biol.*, 26(10):3942-54.
- Bouloy M, Janzen C, Vialat P, Khun H, Pavlovic J, Huerre M, Haller O. 2001. Genetic evidence for an interferon-antagonistic function of Rift Valley fever virus nonstructural protein NSs. *J Virol.*, 75(3):1371-7.
- Boyes J, Byfield P, Nakatani Y, and Ogryzko V. 1998. Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature*, 396(6711):594-8.
- Boyman O, Purton JF, Surh CD, Sprent J. 2007. Cytokines and T-cell homeostasis. *Curr Opin Immunol.*, 19(3):320-6.
- Brahms H, Meheus L, Brabandere V, UTZ Fischer U and Lührmann R. 2001. Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein. *RNA*, 7(11):1531-42.
- Bray M. 2001. The role of the Type I interferon response in the resistance of mice to filovirus infection. *J Gen Virol.*, 82(Pt 6):1365-73.
- Bryant HE, Wadd SE, Lamond AI, Silverstein SJ, Clements JB. 2001. Herpes simplex virus IE63 (ICP27) protein interacts with spliceosome-associated protein 145 and inhibits splicing prior to the first catalytic step. *J Virol.*, 75(9):4376-85
- Brzózka K, Finke S, Conzelmann KK. 2005. Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Virol.*, 79(12):7673-81.
- Bujnicki JM, Rychlewski L. 2001. Reassignment of specificities of two cap methyltransferase domains in the reovirus lambda 2 protein. *Genome Biol.*, 2(9).
- Carneiro FR, Silva TC, Alves AC, Haline-Vaz T, Gozzo FC, Zanchin NIT. 2006. Spectroscopic characterization of the tumor antigen NY-REN-21 and identification of heterodimer formation with SCAND1. *Biochem Biophys Res Commun.*, 343(1):260-8
- Castelli JC, Hassel BA, Wood KA, Li XL, Amemiya K, Dalakas MC, Torrence PF, Youle RJ. 1997. A study of the interferon antiviral mechanism: apoptosis activation by the 2-5A system. *J Exp Med.*, 186 (6) 967-972.

- Chang A, Cheang S, Espanel X, Sudol M. 2000. Rsp5 WW domains interact directly with the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem.*, 275(27):20562-71.
- Chang HW, Watson JC, Jacobs BL. 1992. The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci.*, 89(11):4825-9.
- Changela A, Ho CK, Martins A, Shuman S, Mondragon A. 2001. Structure and mechanism of the RNA triphosphatase component of mammalian mRNA capping enzyme. *EMBO J.*, 20(10):2575-86.
- Chen H, Lin RJ, Xie W, Wilpitz D, Evans RM. 1999. Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell*, 98(5):675-86.
- Chen YI, Moore RE, Ge HY, Young MK, Lee TD, Stevens SW. 2007. Proteomic analysis of in vivo-assembled pre-mRNA splicing complexes expands the catalog of participating factors. *Nucleic Acids Res.*, 35(12):3928-44.
- Chen Z, Li Y, Krug RM. 1999. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J.*, 18(8):2273-83.
- Chiu YL, Coronel E, Ho CK, Shuman S, Rana TM. 2001. HIV-1 Tat protein interacts with mammalian capping enzyme and stimulates capping of TAR RNA. *J Biol Chem.*, 276(16):12959-66.
- Cho EJ, Rodriguez CR, Takagi T, Buratowski S. 1998. Allosteric interactions between capping enzyme subunits and the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.*, 12(22):3482-7.
- Ciccaglione AR, Stellacci E, Marcantonio C, Muto V, Equestre M, Marsili G, Rapicetta M, Battistini A. 2007. Repression of interferon regulatory factor 1 by hepatitis C virus core protein results in inhibition of antiviral and immunomodulatory genes. *J Virol.*, 81(1):202-14.
- Cougot N, van Dijk E, Babajko S, Séraphin B. 2004. 'Cap-tabolism'. *Trends Biochem Sci.*, 29(8):436-44.
- Cuddihy AR, Wong AH, Tam NW, Li S, Koromilas AE. 1999. The double-stranded RNA activated protein kinase PKR physically associates with the tumor suppressor p53 protein and phosphorylates human p53 on serine 392 in vitro. *Oncogene*, 18(17):2690-702.
- de Almeida SF, Carmo-Fonseca M. 2008. The CTD role in cotranscriptional RNA processing and surveillance. *FEBS Lett.*, 582(14):1971-6.
- Decker T, Lew DJ, Darnell JE Jr. 1991. Two distinct alpha-interferon-dependent signal transduction pathways may contribute to activation of transcription of the guanylate-binding protein gene. *Mol Cell Biol.*, 11(10):5147-53.
- Deshpande T, Takagi T, Hao L, Buratowski S, Charbonneau H. 1999. Human PIR1 of the protein-tyrosine phosphatase superfamily has RNA 5'-triphosphatase and diphosphatase activities. *J Biol Chem.*, 274(23):16590-4.

- Diaz MO, Ziemin S, Le Beau MM, Pitha P, Smith SD, Chilcote RR, Rowley JD. 1988. Homozygous deletion of the alpha- and beta 1-interferon genes in human leukemia and derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci.*, 85(14):5259-63.
- Downing JR, Higuchi M, Lenny N, Yeoh AE. 2000. Alterations of the AML1 transcription factor in human leukemia. *Semin Cell Dev Biol.*, 11(5):347-60
- Einav U, Tabach Y, Getz G, Yitzhaky A, Ozbek U, Amariglio N, Izraeli S, Rechavi G, Domany E. 2005. Gene expression analysis reveals a strong signature of an interferon-induced pathway in childhood lymphoblastic leukemia as well as in breast and ovarian cancer. *Oncogene*, 24(42):6367-75.
- Epperson DE, Arnold D, Spies T, Cresswell P, Pober JS, Johnson DR. 1992. Cytokines increase transporter in antigen processing-1 expression more rapidly than HLA class I expression in endothelial cells. *J Immunol.*, 149(10):3297-301.
- Everett RD, Chelbi-Alix MK. 2007. PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie*, 89(6-7):819-30.
- Fan H, Sakuraba K, Komuro A, Kato S, Harada F, Hirose Y. 2003. PCIF1, a novel human WW domain-containing protein, interacts with the phosphorylated RNA polymerase II. *Biochem Biophys Res Commun.*, 301(2):378-85.
- Feng Z, Cerveny M, Yan Z, He B. 2007. The VP35 protein of Ebola virus inhibits the antiviral effect mediated by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *J Virol.*, 81(1):182-92.
- Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S. 2005. GATA1 Function, a Paradigm for Transcription Factors in Hematopoiesis. *Mol Cell Biol.*, 25(4):1215-27.
- Fields S, Song O. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340(6230):245-6.
- Floyd-Smith G, Slattery E, Lengyel P. 1981. Interferon action: RNA cleavage pattern of a (2'-5')oligoadenylatedependent endonuclease. *Science*, 212(4498):1030-2.
- Fortes P, Beloso A, Ortín J. 1994. Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *EMBO J.*, 13(3):704-12.
- Fukuhara T, Hosoya T, Shimizu S, Sumi K, Oshiro T, Yoshinaka Y, Suzuki M, Yamamoto N, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Hagiwara M. 2006. Utilization of host SR protein kinases and RNA-splicing machinery during viral replication. *Proc Natl Acad Sci.*, 103(30):11329-33.
- Gaddy DF, Lyles DS. 2007. Oncolytic vesicular stomatitis virus induces apoptosis via signaling through PKR, Fas, and Daxx. *J Virol.*, 81(6):2792-804.
- Garcia MA, Gil J, Ventoso I, Guerra S, Domingo E, Rivas C, Esteban M. 2006. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 70(4):1032-60.
- Gavutis M, Jaks E, Lamken P, Piehler J. 2006. Determination of the two-dimensional interaction rate constants of a cytokine receptor complex. *Biophys J.*, 90(9):3345-55.

- Gavva NR, Gavva R, Ermekova K, Sudol M, Shen CJ. 1997. Interaction of WW domains with hematopoietic transcription factor p45/NF-E2 and RNA polymerase II. *J Biol Chem.*, 272(39):24105-8.
- Geiss GK, Carter VS, He Y, Kwieciszewski BK, Holzman T, Korth MJ, Lazaro CA, Fausto N, Bumgarner RE, Katze MG. 2003. Gene expression profiling of the cellular transcriptional network regulated by alpha/beta interferon and its partial attenuation by the hepatitis C virus nonstructural 5A protein. *J Virol.*,77(11):6367-75.
- Georges Lacaud, Lia Gore, Marion Kennedy, Valerie Kouskoff, Paul Kingsley, Christopher Hogan, Leif Carlsson, Nancy Speck, James Palis, and Gordon Keller. 2002. Runx1 is essential for hematopoietic commitment at the hemangioblast stage of development in vitro. *Blood*, 100(2):458-66.
- Gerondakis S, Grumont R, Rourke I, and Grossmann M. 1998. The regulation and roles of Rel/NF-kappa B transcription factors during lymphocyte activation. *Curr. Opin. Immunol.*, 10(3):353-9.
- Gey GO, Coffman WD, and Kubicek MT. 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.*, 12: 264-265.
- Ghosh S, May MJ, and Kopp E B. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 16:225–260.
- Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D. 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci.*, 87(12):4645-9.
- Gietz RD, Sugino A. 1988. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, 74(2):527-34.
- Gong C, Shuman S. 2003. Mapping the active site of vaccinia virus RNA triphosphatase. *Virology*, 309(1):125-34.
- Gozani O, Patton JG, Reed R. 1994. A novel set of spliceosome-associated proteins and the essential splicing factor PSF bind stably to pre-mRNA prior to catalytic step II of the splicing reaction. *EMBO J.*, 13(14):3356-67.
- Gozani O, Potashkin J, Reed R. 1998. A potential role for U2AF-SAP 155 interactions in recruiting U2 snRNP to the branch site. *Mol Cell Biol.*, 18(8):4752-60.
- Great EscAPE SEAP User Manual*. 2005. Protocolo número PT3057-1. Versão número PR55697 Clontech
- Greaves MF, Alexander FE. 1993. An infectious etiology for common acute lymphoblastic leukemia in childhood? *Leukemia*, 7(3):349-60.
- Gregory RC, Taxman D J, D. Seshasayee MH, Kensinger JJ, Bieker, and D. M. Wojchowski. 1996. Functional interaction of GATA1 with erythroid Kruppel-like factor and Sp1 at defined erythroid promoters. *Blood*, 87(5):1793–1801.
- Grieder FB, Vogel SN. 1999. Role of interferon and interferon regulatory factors in early protection against Venezuelan equine encephalitis virus infection. *Virology*, 257(1):106-18.

- Grossmann M, Nakamura Y, Grumont R, Gerondakis S. 1999. New insights into the roles of Rel/NF-kappa B transcription factors in immune function, hemopoiesis and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.*, 31(10):1209-19.
- Guerra S, López-Fernández LA, Pascual-Montano A, Muñoz M, Harshman K, Esteban M. 2003. Cellular gene expression survey of vaccinia virus infection of human HeLa cells. *J Virol.*, 77(11):6493-506.
- Guo Z, Chen LM, Zeng H, Gomez JA, Plowden J, Fujita T, Katz JM, Donis RO, Sambhara S. 2007. NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 36(3):263-9.
- Guthrie C, Fink GR. 1991. *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. Methods in Enzymology.* V. 194.
- Hagglund R, Roizman B. 2004. Role of ICP0 in the strategy of conquest of the host cell by herpes simplex virus 1. *J Virol.*, 78(5):2169-78.
- Hagiwara M, Nojima T. 2007. Cross-talks between transcription and post-transcriptional events within a 'mRNA factory'. *J Biochem.*, 142(1):11-5.
- Hale BG, Jackson D, Chen YH, Lamb RA, Randall RE. 2006. Influenza A virus NS1 protein binds p85beta and activates phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Proc Natl Acad Sci.*, 103(38):14194-9.
- Haller O. 1981. Inborn resistance of mice to orthomyxoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 92:25-52.
- Haller O, Frese M, Kochs G. 1998. Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev Sci Tech.*, 17(1):220-30.
- Haller O, Kochs G, Weber F. 2006. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology*, 344(1):119-30.
- Haller O, Kochs G, Weber F. 2007. Interferon, Mx, and viral countermeasures. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 18 (5-6) 425-433.
- Hausmann S, Ho CK, Schwer B, Shuman S. 2001. An essential function of *Saccharomyces cerevisiae* RNA triphosphatase Cst1 is to stabilize RNA guanylyltransferase Ceg1 against thermal inactivation. *J Biol Chem.*, 276(39):36116-24.
- Hertel KJ. 2008. Combinatorial control of exon recognition. *J Biol Chem.*, 283(3):1211-5.
- Higman MA, Christen LA, Niles EG. 1994. The mRNA (guanine-7-)methyltransferase domain of the vaccinia virus mRNA capping enzyme. Expression in *Escherichia coli* and structural and kinetic comparison to the intact capping enzyme. *J Biol Chem.*, 269(21):14974-81
- Hilton L, Moganeradj K, Zhang G, Chen YH, Randall RE, McCauley JW, Goodbourn S. 2006. The NPro product of bovine viral diarrhoea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation. *J Virol.*, 80(23):11723-32.

- Hirose Y, Ohkuma Y. Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II plays central roles in the integrated events of eucaryotic gene expression. *J Biochem.* 2007 May;141(5):601-8.
- Ho CK, Martins A, Shuman S. 2000. A yeast-based genetic system for functional analysis of viral mRNA capping enzymes. *J Virol.*, 74(12):5486-94.
- Ho CK, Shuman S. 2002. Bacteriophage T4 RNA ligase 2 (gp24.1) exemplifies a family of RNA ligases found in all phylogenetic domains. *Proc Natl Acad Sci.*, 99(20):12709-14.
- Hollenberg SM, Sternglanz R, Cheng PF, Weintraub H. 1995. Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system. *Mol. Cell. Biol.*, 15(7):3813-22.
- Hollingworth D, Noble CG, Taylor IA, Ramos A. 2006. RNA polymerase II CTD phosphopeptides compete with RNA for the interaction with Pcf11. *RNA*, 12(4):555-60.
- Holmes S, He M, Xu T, Lee PP. 2005. Memory T cells have gene expression patterns intermediate between naive and effector. *Proc Natl Acad Sci.*, 102(15):5519-23.
- Hooker L, Sully R, Handa B, Ono N, Koyano H, Klumpp K. 2003. Quantitative analysis of influenza virus RNP interaction with RNA cap structures and comparison to human cap binding protein eIF4E. *Biochemistry*, 42(20):6234-40.
- House AE, Lynch KW. 2008. Regulation of alternative splicing: more than just the ABCs. *J Biol Chem.*, 283(3):1217-21.
- Hu X, Herrero C, Li WP, Antoniv TT, Falck-Pedersen E, Koch AE, Woods JM, Haines GK, Ivashkiv LB. 2002. Sensitization of IFN-gamma Jak-STAT signaling during macrophage activation. *Nat Immunol.*, 3(9):859-66.
- Huang TS, Nilsson CE, Punga T, Akusjarvi G. 2002. Functional inactivation of the SR family of splicing factors during a vaccinia virus infection. *EMBO Rep.*, 3(11):1088-93.
- Hui DJ, Bhasker CR, Merrick WC, Sen GC. 2003. Viral stress-inducible protein p56 inhibits translation by blocking the interaction of eIF3 with the ternary complex eIF2.GTP.Met-tRNAi. *J Biol Chem.*, 278(41):39477-82.
- Hwang SY, Hertzog POJ, Holland KA, Sumarsono SH, Tymms MJ, Hamilton JA, Whitty G, Bertoncello I, Kola I. 1995. A null mutation in the gene encoding a type I interferon receptor component eliminates antiproliferative and antiviral responses to interferons alpha and beta and alters macrophage responses. *Proc Natl Acad Sci.*, 92(24):11284-8.
- Ito T, Ikehara T, Nakagawa T, Kraus WL, Muramatsu M. 2000. p300-mediated acetylation facilitates the transfer of histone H2A-H2B dimers from nucleosomes to a histone chaperone. *Genes Dev.*, 14(15):1899-907.
- Iwai A, Hasumura Y, Nojima T, Takegami T. 2003. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 binds to Sm-D1, a small nuclear ribonucleoprotein associated with autoimmune disease. *Microbiol Immunol.*, 47(8):601-11.

- Iwase S, Furukawa Y, Kikuchi J, Nagai M, Terui Y, Nakamura M, Yamada H. 1997. Modulation of E2F Activity Is Linked to Interferon-induced Growth Suppression of Hematopoietic Cells. *J Biol Chem.*, 272(19):12406-14.
- Joo CH, Shin YC, Gack M, Wu L, Levy D, Jung JU. 2007. Inhibition of interferon regulatory factor 7 (IRF7)-mediated interferon signal transduction by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral IRF homolog vIRF3. *J Virol.*, 81(15):8282-92.
- Kaczynski J, Cook T, Urrutia R. 2003. Sp1- and Krüppel-like transcription factors. *Genome Biology*, 4(2):206.
- Kameoka S, Duque P, Konarska MM. 2004. p54(nrb) associates with the 5' splice site within large transcription/splicing complexes. *EMBO J.*, 23(8):1782-91.
- Kapust RB, Waugh DS. 1999. Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.*, 8(8):1668-74.
- Kato A, Homma T, Batchelor J, Hashimoto N, Imai S, Wakiguchi H, Saito H, Matsumoto K. 2003. Interferon-alpha/beta receptor-mediated selective induction of a gene cluster by CpG oligodeoxynucleotide. *BMC Immunol.*, 4:8.
- Katsoulidis E, Li Y, Mears H, Plataniias LC. 2005. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway in interferon signal transduction. *J Interferon Cytokine Res.*, 25(12):749-56.
- Katze MG, He Y, Gale M Jr. 2002. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol.*, 2(9):675-87.
- Kaur S, Uddin S, Plataniias LC. 2005. The PI3' kinase pathway in interferon signaling. *J Interferon Cytokine Res.*, 25(12):780-7.
- Kee BL, Arias J, Montminy MR. 1996. Adaptor-mediated recruitment of RNA polymerase II to a signal-dependent activator. *J Biol Chem.*, 271(5):2373-5.
- Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M. 2006. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 22:159-80.
- Khabar KS, Young HA. 2007. Post-transcriptional control of the interferon system. *Biochimie*, 89(6-7):761-9.
- Kinlen LJ. 1995. Epidemiological evidence for an infective basis in childhood leukaemia. *Br J Cancer.*, 71(1):1-5.
- Kochs G, Janzen C, Hohenberg H, Haller O. 2002. Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *Proc Natl Acad Sci.*, 99(5):3153-8.
- Kolumam GA, Thomas S, Thompson LJ, Sprent J, Murali-Krishna K. 2005. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Med.*, 202(5):637-50.
- Lam EW, LaThangue NB. 1994. DP and E2F proteins: coordinating transcription with cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol.*, 6(6):859-66.

- Lamb RA, and Krug RM. 2001. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication, in *Fields virology* (Knipe, D.M.; Howley, P.M.) Vol.1, pp 1487-1532. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
- Langland JO, Pettiford S, Jiang B, Jacobs BL. 1994. Products of the porcine group C rotavirus NSP3 gene bind specifically to double-stranded RNA and inhibit activation of the interferon-induced protein kinase PKR. *J Virol.*, 68(6):3821-9.
- Langland JO, Cameron JM, Heck MC, Jancovich JK, Jacobs BL. 2006. Inhibition of PKR by RNA and DNA viruses. *Virus Res.*, 119(1):100-10.
- Le Bon A, Tough DF. 2002. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol.*, 14(4):432-6.
- Le Bon A, Etchart N, Rossmann C, Ashton M, Hou S, Gewert D, Borrow P, Tough DF. 2003. Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol.*, 4(10):1009-15.
- Le Bon A, Durand V, Kamphuis E, Thompson C, Bulfone-Paus S, Rossmann C, Kalinke U, Tough DF. 2006. Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8+ T cell response during cross-priming. *J Immunol.*, 176(8):4682-9.
- Li J, Moazed D, Gygi SP. 2002. Association of the histone methyltransferase Set2 with RNA polymerase II plays a role in transcription elongation. *J Biol Chem.*, 277(51):49383-8.
- Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, Ray SC, Gale M Jr, Lemon SM. 2005. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci.*, 102(8):2992-7.
- Lin KT, Lu RM, Tarn WY. 2004. The WW domain-containing proteins interact with the early spliceosome and participate in pre-mRNA splicing in vivo. *Mol Cell Biol.*, 24(20):9176-85.
- Li Q, Means R, Lang S, Jung JU. 2007. Downregulation of gamma interferon receptor 1 by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K3 and K5. *J Virol.*, 81(5):2117-27.
- Lindenmann J. 1964. Inheritance of resistance to influenza virus in mice. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 116:506-9.
- Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E. *Molecular Cell Biology*. New York: W. H. Freeman & Co.; c1999
- Lomberk G, Urrutia R. 2005. The family feud: turning off Sp1 by Sp1-like KLF proteins. *Biochem J.*, 392(Pt 1):1-11.
- Lorsbach RB, Downing JR. 2001. The role of the AML1 transcription factor in leukemogenesis. *Int J Hematol.*, 74(3):258-65.
- Lu G, Reinert JT, Pitha-Rowe I, Okumura A, Kellum M, Knobloch KP, Hassel B, Pitha PM. 2006. ISG15 enhances the innate antiviral response by inhibition of IRF-3 degradation. *Cell Mol Biol.*, 52(1):29-41.

- Lu Y, Wambach M, Katze MG, Krug RM. 1995. Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology*, 214(1):222-8.
- Magden J, Takeda N, Li T, Auvinen P, Ahola T, Miyamura T, Merits A, Kääriäinen L. 2001. Virus-specific mRNA capping enzyme encoded by hepatitis E virus. *J Virol.*, 75(14):6249-55.
- Malakhov MP, Kim KI, Malakhova OA, Jacobs BS, Borden EC, Zhang DE. 2003. High-throughput immunoblotting. Ubiquitin-like protein ISG15 modifies key regulators of signal transduction. *J Biol Chem.*, 278(19):16608-13.
- Malathi K, Dong B, Gale M Jr, Silverman RH. 2007. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature*, 448(7155):816-9.
- Malim MH. 2006. Natural resistance to HIV infection: The Vif-APOBEC interaction. *C R Biol.*, 329(11):871-5.
- Marié I, Durbin JE, Levy DE. 1998. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J.*, 17(22):6660-9.
- Marin M, Karism A, Visser P, Grosveld F, Philipsen S. 1997. Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell*, 89(4):619-28.
- Marrack P, Kappler J, Mitchell T. 1999. Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med.*, 189(3):521-30.
- Martínez-Costas J, González-López C, Vakharia VN, Benavente J. 2000. Possible involvement of the double-stranded RNA-binding core protein sigmaA in the resistance of avian reovirus to interferon. *J Virol.*, 74(3):1124-31.
- Martins A, Shuman S. 2000. Mechanism of phosphoanhydride cleavage by baculovirus phosphatase. *J Biol Chem.*, 275(45):35070-6.
- Martins A, Shuman S. 2002. The domain order of mammalian capping enzyme can be inverted and baculovirus phosphatase can function in cap formation in vivo. *Virology*, 304(2):167-75.
- Martins A, Shuman S. 2003. Mapping the triphosphatase active site of baculovirus mRNA capping enzyme LEF4 and evidence for a two-metal mechanism. *Nucleic Acids Res.*, 31(5):1455-63.
- Mayeda A, Krainer A R. *RNA-Protein Interaction Protocols*. Methods in Molecular Biology Series. Humana Press, August 1999. Edited by Susan R. Haynes.
- Meinhart A, Kamenski T, Hoepfner S, Baumli S, Cramer P. 2005. A structural perspective of CTD function. *Genes Dev.*, 19(12):1401-15.
- Melroe GT, Silva L, Schaffer PA, Knipe DM. 2007. Recruitment of activated IRF-3 and CBP/p300 to herpes simplex virus ICP0 nuclear foci: Potential role in blocking IFN-beta induction. *Virology*, 360(2):305-21.

- Miller DM, Rahill BM, Boss JM, Lairmore MD, Durbin JE, Waldman JW, Sedmak DD. 1998. Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway. *J Exp Med.*, 187(5):675-83.
- Miroux B, Walker JE. 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol.*, 260(3):289-98.
- Morris DP, Phatnani HP, Greenleaf AL. 1999. Phospho-carboxyl-terminal domain binding and the role of a prolyl isomerase in pre-mRNA 3'-End formation. *J Biol Chem.*, 274(44):31583-7.
- Müller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, Aguet M. 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science*, 264(5167):1918-21
- Myers JK, Morris DP, Greenleaf AL, Oas TG. 2001. Phosphorylation of RNA polymerase II CTD fragments results in tight binding to the WW domain from the yeast prolyl isomerase Ess1. *Biochemistry*, 40(29):8479-86.
- Nakajima T, Uchida C, Anderson SF, Lee CG, Hurwitz J, Parvin JD, Montminy M. 1997. RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell*, 90(6):1107-12.
- Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei XQ, Liew FY, Caligiuri MA, Durbin JE, Biron CA. 2002. Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol.*, 169(8):4279-87.
- Noah DL, Twu KY, Krug RM. 2003. Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs. *Virology*, 307(2):386-95.
- Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. 1996. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*, 84(2):321-30.
- Okumura F, Zou W, Zhang DE. 2007. ISG15 modification of the eIF4E cognate 4EHP enhances cap structure-binding activity of 4EHP. *Genes Dev.*, 21(3):255-60.
- Orphanides G, Reinberg D. 2002. A unified theory of gene expression. *Cell*, 108(4):439-51.
- Patel AA, Steitz JA. 2003. Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 4(12):960-70.
- Patterson JB, Thomis DC, Hans SL, Samuel CE. 1995. Mechanism of interferon action: double-stranded RNA-specific adenosine deaminase from human cells is inducible by alpha and gamma interferons. *Virology*, 210(2):508-11.
- Paulus C, Krauss S, Nevels M. 2006. A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proc Natl Acad Sci.*, 103(10):3840-5.

- Pavlovic J, Arzet HA, Hefti HP, Frese M, Rost D, Ernst B, Kolb E, Staeheli P, Haller O. 1995. Enhanced virus resistance of transgenic mice expressing the human MxA protein. *J Virol.*, 69(7):4506-10.
- Petersen HH, Hilpert J, Jacobsen C, Lauwers A, Roebroek AJ, Willnow TE. 2004. Low-density lipoprotein receptor-related protein interacts with MafB, a regulator of hindbrain development. *FEBS Lett.*, 565(1-3):23-7.
- Pevny L, Lin C S, D'Agati V, Simon M C, Orkin SH, and Costantini F. 1995. Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development*, 121(1):163-72.
- Platanias LC. 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol.*, 5(5):375-86.
- Qing Y, Stark GR. 2004. Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma. *J Biol Chem.*, 279(40):41679-85.
- Randall RE, Goodbourn S. 2008. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol.*, 89(Pt 1):1-47.
- Ranganath S, Murphy KM. 2001. Structure and Specificity of GATA Proteins in Th2 Development. *Mol Cell Biol.*, 21(8):2716-25.
- Rani MR, Hibbert L, Sizemore N, Stark GR, Ransohoff RM. 2002. Requirement of phosphoinositide 3-kinase and Akt for interferon-beta-mediated induction of the beta-R1 (SCYB11) gene. *J Biol Chem.*, 277(41):38456-61.
- Reddy A, Grimwood BG, Plummer TH, Tarentino AL. 1998. High-level expression of the Endo-beta-N-acetylglucosaminidase F2 gene in E.coli: one step purification to homogeneity. *Glycobiology*, 8(6):633-6
- Reed R. 1996. Initial splice-site recognition and pairing during pre-mRNA splicing. *Curr Opin Genet Dev.*, 6(2):215-20.
- Reich N, Evans B, Levy D, Fahey D, Knight E Jr, Darnell JE Jr. 1987. Interferon-induced transcription of a gene encoding a 15-kDa protein depends on an upstream enhancer element. *Proc Natl Acad Sci.*, 84(18):6394-8.
- Roberts GC, Smith CW. 2002. Alternative splicing: combinatorial output from the genome. *Curr Opin Chem Biol.*, 6(3):375-83.
- Roberts WK, Hovanessian A, Brown RE, Clemens MJ, Kerr IM. 1976. Interferon-mediated protein kinase and low-molecular-weight inhibitor of protein synthesis. *Nature*, 264(5585):477-80.
- Ryman KD, Klimstra WB, Nguyen KB, Biron CA, Johnston RE. 2000. Alpha/beta interferon protects adult mice from fatal Sindbis virus infection and is an important determinant of cell and tissue tropism. *J Virol.*, 74(7):3366-78.
- Ryu S, Zhou S, Ladurner AG, Tjian R. 1999. The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer binding protein Sp1. *Nature*, 397(6718):446-50.

- Saha N, Schwer B, Shuman S. 1999. Characterization of human, *S. pombe*, and *C. albicans* mRNA cap-methyltransferases and complete replacement of the yeast capping apparatus by mammalian enzymes. *J. Biol. Chem.*, 274(23):16553-62.
- Saha N, Shuman S, Schwer B. 2003. Yeast-based genetic system for functional analysis of Poxvirus mRNA cap methyltransferase. *J Virol.*, 77(13):7300-7.
- Sakuma R, Mael AA, Ikeda Y. 2007. Alpha interferon enhances TRIM5alpha-mediated antiviral activities in human and rhesus monkey cells. *J Virol.*, 81(18):10201-6.
- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York (1989).
- Sarkis PT, Ying S, Xu R, Yu XF. 2006. STAT1-independent cell type-specific regulation of antiviral APOBEC3G by IFN-alpha. *J Immunol.*, 177(7):4530-40.
- Sasaki K, Yagi H, Bronson RT, Tominaga K, Matsunashi T, Deguchi K, Tani Y, Kishimoto T, Komori T. 1996. Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor beta. *Proc Natl Acad Sci.*, 93(22):12359-63.
- Sato M, Hata N, Asagiri M, Nakaya T, Taniguchi T, Tanaka N. 1998. Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett.*, 441(1):106-10.
- Satterly N, Tsai PL, van Deursen J, Nussenzveig DR, Wang Y, Faria PA, Levay A, Levy DE, Fontoura BM. 2007. Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci.*, 104(6):1853-8.
- Sawaya R, Shuman S. 2003. Mutational analysis of the guanylyltransferase component of Mammalian mRNA capping enzyme. *Biochemistry*, 42(27):8240-9.
- Schlender J, Hornung V, Finke S, Günthner-Biller M, Marozin S, Brzózka K, Moghim S, Endres S, Hartmann G, Conzelmann KK. 2005. Inhibition of toll-like receptor 7- and 9-mediated alpha/beta interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus. *J Virol.*, 79(9):5507-15.
- Shaywitz AJ, Greenberg ME. 1999. CREB: A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.*, 68:821-861.
- Shibagaki Y, Gotoh H, Kato M, Mizumoto K. 1995. Localization and in vitro mutagenesis of the active site in the *Saccharomyces cerevisiae* mRNA capping enzyme. *J Biochem.*, 118(6):1303-9.
- Silverman RH. 2007. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *J Virol.*, 81(23):12720-9.
- Simizu B, Rhim JS, and Wiebenga NH. 1967. Characterization of the Tacaribe group of arboviruses. Propagation and plaque assay of Tacaribe virus in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *Proc Soc Exp Biol Med.*, 125(1):119-23.
- Smith GL, Symons J, Alcami A. 1998. Poxviruses: Interfering with Interferon. *Semin Virology* 8, 409-418

- Smith MJ, Kulkarni S, Pawson T. 2004. FF domains of CA150 bind transcription and splicing factors through multiple weak interactions. *Mol Cell Biol.*, 24(21):9274-85.
- Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufrin D, Ratajczak J, Resende IC, Haworth C, Hock R, Loh M, Felix C, Roy DC, Busque L, Kurnit D, Willman C, Gewirtz AM, Speck NA, Bushweller JH, Li FP, Gardiner K, Poncz M, Maris JM, Gilliland DG. 1999. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet*, 23(2):166-75.
- Speck NA, Gilliland DG. 2002. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 2(7):502-13.
- Staheli P, Grob R, Meier E, Sutcliffe JG, Haller O. 1988. Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Mol Cell Biol.*, 8(10):4518-23.
- Studier FW, Moffatt BA. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.*, 189(1):113-30.
- Su AI, Pezacki JP, Wodicka L, Brideau AD, Supekova L, Thimme R, Wieland S, Bukh J, Purcell RH, Schultz PG, Chisari FV. 2002. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci.*, 99(24):15669-74.
- Sudol M, Hunter T. 2000. NeW wrinkles for an old domain. *Cell*, 103(7):1001-4.
- Surh CD, Boyman O, Purton JF, Sprent J. 2006. Homeostasis of memory T cells. *Immunol Rev.*, 211:154-63.
- Suske G. 1999. The Sp-family of transcription factors. *Gene*, 238(2):291-300.
- Tang X, Gao JS, Guan YJ, McLane KE, Yuan ZL, Ramratnam B, Chin YE. 2007. Acetylation-dependent signal transduction for type I interferon receptor. *Cell*, 131(1):93-105.
- Takagi T, Walker AK, Sawa C, Diehn F, Takase Y, Blackwell TK, Buratowski S. 2003. The *Caenorhabditis elegans* mRNA 5'-capping enzyme. In vitro and in vivo characterization. *J Biol Chem.*, 278(16):14174-84.
- Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, Stoiber D, Negishi H, Kikuchi H, Sasaki S, Imai K, Shibue T, Honda K, Taniguchi T. 2003. Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature*, 424(6948):516-23.
- Takaoka A, Yanai H. 2006. Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol.*, 8(6):907-22.
- Tallóczy Z, Jiang W, Virgin HW 4th, Leib DA, Scheuner D, Kaufman RJ, Eskelinen EL, Levine B. 2002. Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci.*, 99(1):190-5.
- Tanner S, Stagljar I, Georgiev O, Schaffner W, Bourquin JP. 1997. A novel SR-related protein specifically interacts with the carboxy-terminal domain (CTD) of RNA polymerase II through a conserved interaction domain. *Biol Chem.*, 378(6):565-71.
- Terada Y, Yasuda Y. 2006. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces G2 checkpoint activation by interacting with the splicing factor SAP145. *Mol Cell Biol.*, 26(21):8149-58.

- Terenzi F, Pal S, Sen GC. 2005. Induction and mode of action of the viral stress-inducible murine proteins, P56 and P54. *Virology*, 340(1):116-24.
- Thomas D, Blakqori G, Wagner V, Banholzer M, Kessler N, Elliott RM, Haller O, Weber F. 2004. Inhibition of RNA polymerase II phosphorylation by a viral interferon antagonist. *J Biol Chem.*, 279(30):31471-7.
- Tough DF, Borrow P, Sprent J. 1996. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science*, 272(5270):1947-50.
- Towers GJ. 2007. The control of viral infection by tripartite motif proteins and cyclophilin A. *Retrovirology*, 4:40.
- Uddin S, Sassano A, Deb DK, Verma A, Majchrzak B, Rahman A, Malik AB, Fish EN, Platanias LC. 2002. Protein kinase C-delta (PKC-delta) is activated by type I interferons and mediates phosphorylation of Stat1 on serine 727. *J Biol Chem.*, 277(17):14408-16.
- Uzé G, Monneron D. 2007. IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family. *Biochimie*, 89(6-7):729-34.
- Valadkhan S. 2007. The spliceosome: caught in a web of shifting interactions. *Curr Opin Struct Biol.*, 17(3):310-5.
- van Boxel-Dezaire AH, Rani MR, Stark GR. 2006. Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity*, 25(3):361-72.
- van den Broek MF, Müller U, Huang S, Aguet M, Zinkernagel RM. 1995. Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta and gamma interferon receptors. *J Virol.*, 69(8):4792-6.
- Vartiainen MK. 2008. Nuclear actin dynamics - From form to function. *FEBS Lett.*, 582(14):2033-40.
- Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P. 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 13(4):213-7.
- Verdecia MA, Bowman ME, Lu KP, Hunter T, Noel JP. 2000. Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains. *Nat Struct Biol.*, 7(8):639-43.
- Waltzer L, Bienz M. 1998. *Drosophila* CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling. *Nature*, 395(6701):521-5.
- Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA. 1996. Disruption of the *Cbfa2* gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci.*, 93(8):3444-9.
- Wathelet MG, Lin CH, Parekh BS, Ronco LV, Howley PM, Maniatis T. 1998. Virus Infection Induces the Assembly of Coordinately Activated Transcription Factors on the IFN- β Enhancer In Vivo. *Molecular Cell*, 1(4):507-18.
- Weber F, Haller O. 2007. Viral suppression of the interferon system. *Biochimie*. 89(6-7):836-42.
- Wu X, Chang A, Sudol M, Hanes SD. 2001. Genetic interactions between the ESS1 prolyl-isomerase and the RSP5 ubiquitin ligase reveal opposing effects on RNA polymerase II function. *Curr Genet.*, 40(4):234-42.

- Yan SZ, Beeler JA, Chen Y, Shelton RK, Tang WJ. 2001. The regulation of type 7 adenylyl cyclase by its C1b region and Escherichia coli peptidylprolyl isomerase, SlyD. *J Biol Chem.*, 276(11):8500-6.
- Ying S, Zhang X, Sarkis PT, Xu R, Yu X. 2007. Cell-specific regulation of APOBEC3F by interferons. *Acta Biochim Biophys Sin.*, 39(4):297-304.
- Yu L, Martins A, Deng L, Shuman S. 1997. Structure-function analysis of the triphosphatase component of vaccinia virus mRNA capping enzyme. *J Virol.*, 71(12):9837-43.
- Yuan W, Krug RM. 2001. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *EMBO J.*, 20(3):362-71.
- Yuryev A, Patturajan M, Litingtung Y, Joshi RV, Gentile C, Gebara M, Corden JL. 1996. The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II interacts with a novel set of serine/arginine-rich proteins. *Proc Natl Acad Sci.*, 93(14):6975-80.
- Zanchin NI, Goldfarb DS. 1999. Nip7p interacts with Nop8p, an essential nucleolar protein required for 60S ribosome biogenesis, and the exosome subunit Rrp43p. *Mol Cell Biol.*, 19(2):1518-25.
- Zhang P, Samuel CE. 2007. Protein kinase PKR plays a stimulus- and virus-dependent role in apoptotic death and virus multiplication in human cells. *J Virol.*, 81(15):8192-200.
- Zhang Q, Vo N, Goodman RH. 2000. Histone binding protein RbAp48 interacts with a complex of CREB binding protein and phosphorylated CREB. *Mol Cell Biol.*, 20(14):4970-8.
- Zhao C, Denison C, Huibregtse JM, Gygi S, Krug RM. 2005. Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci.*, 102(29):10200-5.
- Zhou Z, Hamming OJ, Ank N, Paludan SR, Nielsen AL, Hartmann R. 2007. Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases. *J Virol.*, 81(14):7749-58.
- Zou W, Kim JH, Handidu A, Li X, Kim KI, Yan M, Li J, Zhang DE. 2007. Microarray analysis reveals that Type I interferon strongly increases the expression of immune-response related genes in Ubp43 (Usp18) deficient macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.*, 356(1):193-9.

8. ANEXO



The human interferon-regulated ISG95 protein interacts with RNA polymerase II and shows methyltransferase activity

Thais Haline-Vaz, Tereza Cristina Lima Silva, Nilson I.T. Zanchin *

Center for Structural Molecular Biology, Brazilian Synchrotron Light Laboratory, LNLS P.O. Box 6192, CEP 13080-970, Campinas SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 May 2008

Available online 3 June 2008

Keywords:

Interferon stimulated genes
RNA Pol II CTD-interacting protein
WW domain
RrmJ/FtsJ3 domain
Yeast two-hybrid system
RNA processing

ABSTRACT

A major mechanism of cellular resistance to viral invasion involves genes from the interferon signaling pathway, called ISGs (interferon stimulated genes). Global transcriptional profiling studies have linked increased expression of ISG95 (KIAA0082) to response to interferon treatment and viral infection, suggesting that it may be part of the cellular defense against viral replication. In this work, we show that the ISG95 promoter can drive interferon-induced transcription of a reporter gene in Vero cells. Recombinant ISG95 shows RNA- and S-adenosyl-methionine binding and protein methyltransferase activity in vitro. ISG95 interacts with the C-terminal domain of RNA polymerase II, which is consistent with its nuclear localization and with the predicted function of the WW domain found in the C-terminal region of ISG95. The results presented in this work indicate that ISG95 is part of the interferon response pathway and functions in the pre-mRNA processing events mediated by the C-terminal domain of the RNA polymerase II.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Cells respond to viral infection by reprogramming the expression pattern of genes encoding proteins that have antiviral, anti-proliferative and immunomodulatory activities. The defense response activates a network of interferon stimulated genes, encoding proteins that act to restrict intracellular virus replication and to signal the presence of the virus to the immune response system [1,2]. Several genes have already been linked to cell resistance to virus replication. This includes the Mx family of large GTPases that interact with viral protein complexes, restricting their localization within the cell and thereby interfering with virus replication [3,4]. Another major virus resistance mechanism involves double-stranded RNA (dsRNA) activation of the interferon-inducible dsRNA-dependent protein kinase (PKR) [5] and the 2'-5' oligoadenylate synthetases [6–8]. Activated PKR phosphorylates the translation initiation factor eIF2 α , causing general translation arrest and activated 2'-5' oligoadenylate synthetases produce 2'-5' oligoadenylate, leading to activation of the RNaseL, which may act directly on the RNA of invading viruses [6–8].

Determining the function of proteins encoded by genes that respond to viral infection is essential to understand the networks that are activated to protect cells against viral induced stress.

* Corresponding author. Present address: Centro de Biologia Molecular Estrutural, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, R. Giuseppe Máximo Scofaro, 10.000, Campinas – SP, Caixa Postal (P.O. Box) 6192 – CEP 13084-971, Brazil. Fax: +55 19 3512 1004.

E-mail address: zanchin@lnls.br (N.I.T. Zanchin).

We have reviewed the literature on global gene expression reports searching for novel proteins containing conserved domains found in proteins involved in RNA metabolism that respond to viral infection. This review indicated that the uncharacterized protein KIAA0082 is up-regulated by viral infection both in chimpanzee and in various cell types [9–11]. Up-regulation of KIAA0082 was associated to increased expression of genes known to be induced by interferon and to exert antiviral activity [9–11]. In addition, up-regulation of KIAA0082 together with a group of interferon stimulated genes was observed in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) treated with CpG oligodeoxynucleotides [12] that are known to elicit T helper type-1 immune responses. Although the studies referred above strongly connect KIAA0082 expression levels to viral infection and interferon response, the promoter of the KIAA0082 gene does not contain a canonical interferon stimulated responsive element (ISRE). KIAA0082 is a modular protein containing both RNA and protein interaction domains and putative methyltransferase and DNA ligase/mRNA capping domains indicating that it might be involved in RNA modification. Therefore, the aims of this work are, first, to determine whether the promoter region of KIAA0082 is regulated by interferon and, second, to determine whether the conserved domains of the KIAA0082 protein are functional in regard to its putative function as an RNA modifying enzyme. Based on the results presented in this work, KIAA0082 was renamed ISG95 using the standard acronym for interferon stimulated genes and the molecular weight of the protein which is 95 kDa.

Materials and methods

Plasmid constructs. DNA fragments were amplified by using PCR with specific oligonucleotides to create restriction sites compatible with the destiny plasmids. All constructs were verified by DNA sequencing. The plasmid pVL1393-*ISG95* used for baculovirus recombination is a pVL1393 (BD Biosciences) derivative containing an N-terminally histidine-tagged *ISG95*. pGFP-*ISG95* containing a GFP (Green Fluorescent Protein)/*ISG95* fusion protein used in subcellular localization assays was constructed using pEGFP-C2 (BD Biosciences). The yeast two-hybrid vectors encoding *lexA* DNA binding domain fusions to the full-length *ISG95* (pTL1-*ISG95*), the N-terminal region (residues 1–451, pTL1-*ISG95*NT), the C-terminal region (residues 541–835, pTL1-*ISG95*CT) and the WW domain deletion of *ISG95* (residues 1–726, pTL1-*ISG95*dWW) were constructed by inserting the respective coding sequences into the plasmid pTL1 [13]. pACT-PolII was isolated in the yeast two-hybrid screen performed in this work using *ISG95* as bait. pTAL-SEAP (BD Biosciences) was used to construct four plasmids containing the reporter gene SEAP (secreted alkaline phosphatase) under the control of different extensions of the *ISG95* promoter, corresponding to 1551 (pP1551-SEAP), 1100 (pP1100-SEAP), 500 (pP500-SEAP) and 185 (pP185-SEAP) base pairs upstream to the *ISG95* transcription start site. pISG15-SEAP contains the SEAP reported gene under the control of the *ISG15* interferon responsive element.

Cell culture and subcellular localization assays. Vero cells were co-transfected with 0.2 μ g of pEGFP-C2 used to estimate transfection efficiency and 0.7 μ g of each of the reporter plasmids pP1551-SEAP, pP1100-SEAP, pP500-SEAP, pP185-SEAP, pISG15-SEAP or

pMARE-SEAP. The cells were treated with 1000 U/mL of *INF- α* (Bio-source) 24 h post-transfection and SEAP levels were determined 24 h after *INF- α* treatment. Analysis of *ISG95* subcellular localization was performed in HeLa cells at 80% confluency transfected with 4 μ g of plasmids pGFP-*ISG95* or pEGFP-C2. Nuclear extracts were isolated as previously described [14].

Expression and purification of recombinant *ISG95*. Expression of the fusion protein His-*ISG95* was performed in Sf9 insect cells using the Baculogold DNA system (BD Biosciences) co-transfected with pVL1393-*ISG95* according to the supplier's instructions. Sf9 whole cell extracts were prepared at 4 °C in 20 ml of Lysis Buffer (50 mM sodium phosphate pH 7.2, 250 mM NaCl, 1% v/v Igepal). Affinity chromatography was performed on a 1 ml His-Trap column (GE Healthcare) using Buffer A (50 mM sodium phosphate pH 7.2, 10% glycerol v/v, 100 mM NaCl, 0.5% Igepal v/v, 1 mM MgCl₂, 5 mM β -mercaptoethanol, 5 mM imidazole) for binding and a 5-to-350 mM imidazole gradient in Buffer A for elution. His-*ISG95* was purified further by ion exchange chromatography on a 1 ml MonoQ Sepharose column (GE Healthcare) equilibrated in Buffer B (20 mM sodium phosphate pH 7.2, 10% glycerol v/v, 50 mM NaCl, 0.5% Igepal v/v; 1 mM MgCl₂; 10 mM β -mercaptoethanol) and eluted with a gradient from 0-to-100% of Buffer C (Buffer B containing 1 M NaCl). As a control, STC1 (staniocalcin 1) was expressed in Sf9 cells and purified under the same conditions as for *ISG95*.

RNA and SAM interaction and methyltransferase assays. Biotinylated RNA was transcribed in vitro in a reaction containing 0.5 μ g of linearized DNA template, 1 mM ATP/GTP/UTP, 0.5 mM CTP, 0.5 mM biotin-14-CTP and 50 U of T7 RNA polymerase. For RNA binding as-

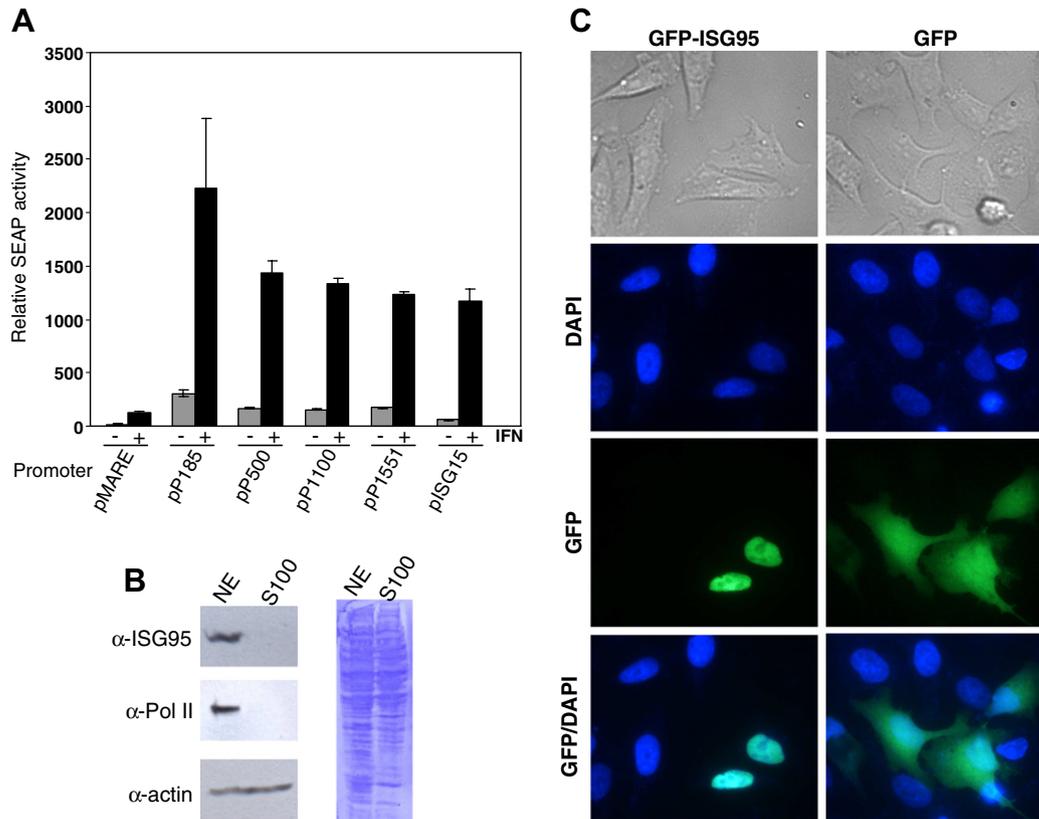


Fig. 1. Analysis of *ISG95* promoter and subcellular localization. (A) Analysis of *ISG95* promoter response to *INF- α* treatment in Vero cells transiently transfected with plasmids containing the SEAP reporter gene under the control of the indicated regions of the *ISG95* promoter. pISG15, positive control. pMARE, negative control. SEAP activity was measured before and 24 h after *INF- α* treatment. (B) Analysis of nuclear (NE) and cytoplasmic (S100) subcellular fractions by immunoblotting using antibodies for *ISG95*, RNA Pol II, and actin (left panel) and by coomassie blue staining (right panel). (C) Subcellular localization of the GFP-*ISG95* fusion protein in HeLa cells transfected with plasmid pGFP-*ISG95* (left panel). GFP alone was used as a control (right panel).

says, 50 pmol of His-ISG95 were incubated with 50 pmol of biotinylated RNA and 10 µl of streptavidin–sepharose beads (GE Healthcare) for 30 min at 4 °C. The fractions bound to the streptavidin–sepharose beads were eluted in SDS–PAGE loading buffer and analyzed by immunoblotting. For the *S*-adenosyl-methionine (SAM) interaction assay, SAM was initially coupled to EAH sepharose 4B beads (GE Healthcare) and 20 µl of the bead suspension were blocked with 0.2 mg/ml BSA in buffer containing 20 mM sodium phosphate pH 7.2, 10% v/v glycerol, 150 mM NaCl, 0.5% v/v Igepal, 1 mM MgCl₂ and 10 mM β-mercaptoethanol, for 16 h at 4 °C and, incubated with 5 µg of ISG95 for 2 h at 4 °C. Following extensive washing, bound ISG95 was eluted with 10 µl *S*-adenosyl-L-homocysteine (1 mg/ml). A negative control assay was performed with EAH Sepharose beads without coupling SAM. Methyltransferase assays were carried out for 90 min at 30 °C in 30 µl reactions containing 5 µg of ISG95, 25 mM Tris–HCl, pH 7.2, 2 mM EDTA, 0.5 µCi [methyl-³H]SAM and 10 µg de MBP (myelin basic protein) or GST-Smd1 as methyl group acceptors. Parallel negative control reactions contained 5 µg of STC1 instead of ISG95. The methylated proteins were analyzed by SDS–PAGE followed by autoradiography. RNA methylation assays were performed essentially as described previously [15].

Protein interaction assays. The yeast strain L40 [16] transformed with pTL1-*ISG95* was used to screen a human fetal brain cDNA library constructed in the pACT2 vector (BD Biosciences) for *ISG95*-interacting proteins. Approximately 8.5 × 10⁶ transformants were

tested for expression of the two-hybrid reporter genes (*HIS3* and *lacZ*). The interaction of full length and truncated forms of *ISG95* with the CTD of the RNA Pol II were tested by using the following L40 derivative strains: L40[pTL1-*ISG95*/pACT-PolII]; L40[pTL1-*ISG95NT*/pACT-PolIII]; L40[pTL1-*ISG95CT*/pACT-PolIII]; and L40[pTL1-*ISG95dWW*/pACT-PolIII]. A set of control strains contained pACT-NOP8 [17] instead of pACT-PolIII and the positive control strain contained plasmids pBTM116-NIP7 and pACT-NOP8 [17]. Yeast two-hybrid assays were performed in synthetic complete medium containing 10 mM 3-AT (3-amino-triazole). Co-immunoprecipitation assays were performed with nuclear extracts isolated from HeLa cells as described previously [14] using 1 µg of antisera for *ISG95*/KIAA0082 and MafB (Bethyl Labs) and 20 µl of Protein-A Sepharose (Ge-Healthcare). Immunoblots were performed with primary antibodies for *ISG95*/KIAA0082 and for the RNA Pol II (Santa Cruz Biotech). The secondary antibodies were specific for goat IgG or rabbit IgG and alkaline phosphatase linked or peroxidase linked.

Amino acid sequence analysis and alignment. Conserved domains of *ISG95* were identified using the SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) and EXPASY (<http://expasy.org/>) resources. Amino acid sequence alignment was performed using Clustalw (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). The amino acid sequence corresponding to the putative *S*-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase domain of *ISG95* (Accession No. CAI19603) was aligned with equivalent domains from the *Autogra-*

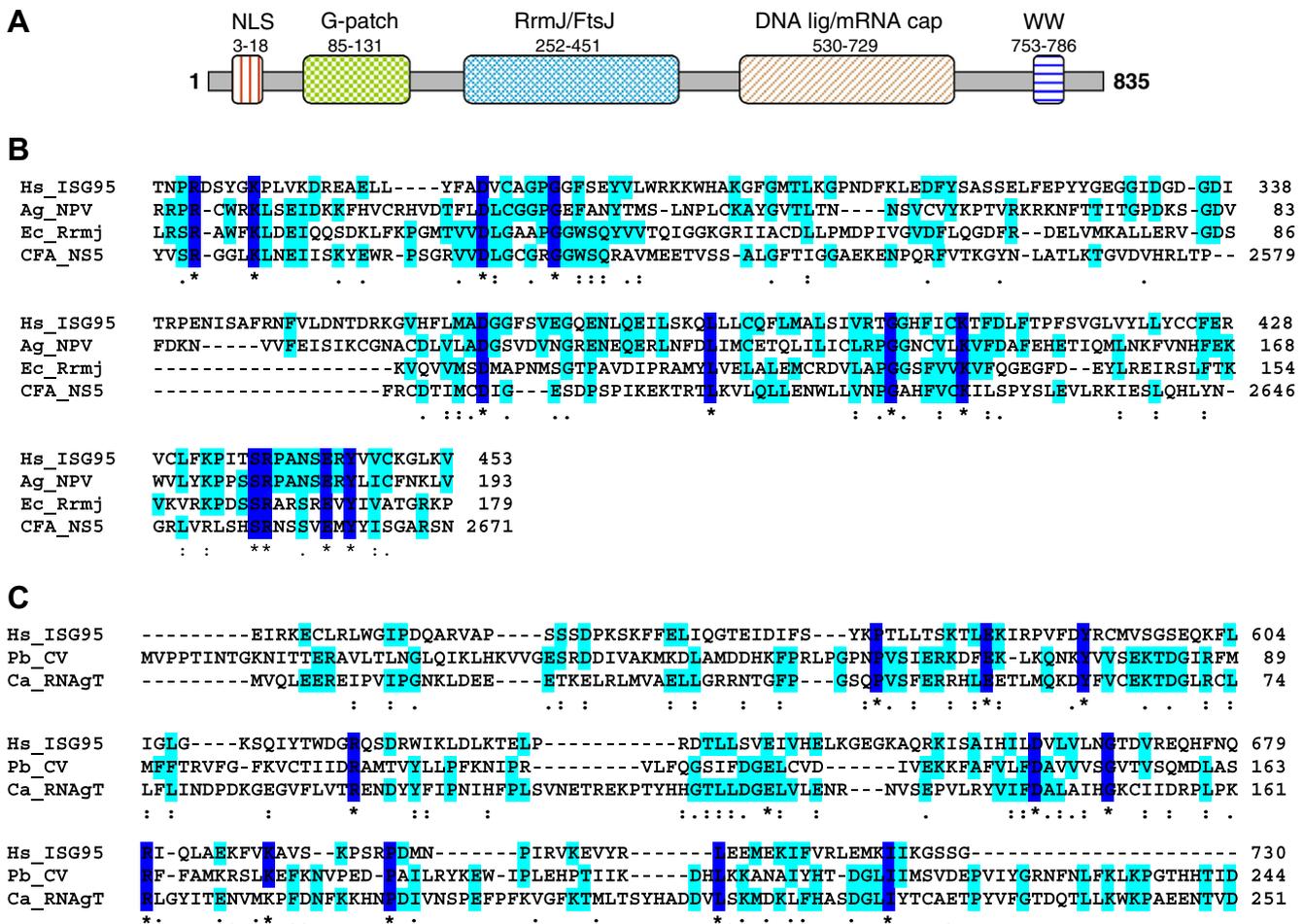


Fig. 2. Domain architecture of *ISG95*. (A) Scheme showing the relative position of the *ISG95* conserved domains. (B) Alignment of the human *ISG95* RrmJ/FtsJ domain region (Hs-*ISG95*) with equivalent domains of *A. californica* nucleopolyhedrovirus (Ag-NPV), *E. coli* Rrmj (Ec-Rrmj), and cell fusion agent virus non-structural protein 5 (NS5) (CFA-NS5). (C) Alignment of the human *ISG95* DNA ligase/mRNA capping putative domain (Hs-*ISG95*) with equivalent domains of the mRNA guanylyltransferases from *P. bursaria* Chlorella virus 1 (Pb_CV) and *C. albicans* Ca_RNAgT.

pha californica nucleopolyhedrovirus (Accession No. NP_054099), *E. coli* Rmj (Accession No. P28692) and flavivirus NS5 (Accession No. P33515). The putative DNA ligase/mRNA capping domain of ISG95 was aligned with the mRNA-capping enzymes from *Paramecium bursaria* chlorella virus 1 (Accession No. Q84424) and *Candida albicans* (Accession No. P78587).

Results and discussion

Analysis of the ISG95 promoter region and subcellular localization

We have identified from literature surveys up-regulation of ISG95 (KIAA0082) in response to viral infection both in chimpanzee [9] and in various cell types [10,11]. In addition, ISG95 was associated to genes up-regulated in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) treated with CpG oligodeoxynucleotides [12]. In order to demonstrate that the ISG95 promoter responds to interferon, we have constructed four plasmids where the SEAP reporter gene was placed under the control of different regions of the ISG95 promoter. The assay was performed in Vero cells, which do not produce endogenous interferon [18]. The promoter of ISG15 was used as a positive control and the Maf responsive element (MARE) that is recognized by the Maf family of transcription factors [19] was used as negative control. As observed in Fig. 1A, the ISG95 promoter is activated by IFN α treatment to levels similar to the level observed for the ISG15 promoter. This result confirms that although the ISG95 promoter does not contain a canonical interferon stimulated responsive element, it responds to interferon and is part of the interferon signaling network.

An indication of the ISG95 subcellular distribution comes from the nuclear localization signal found in the N-terminal region (Fig. 2A). As expected, cell fractionation and immunoblot analysis revealed the endogenous ISG95 protein is found in the nuclear fraction (Fig. 1B). This result was confirmed by the distribution of a GFP-ISG95 fusion protein expressed in HeLa cells, which was restricted to the nucleus (Fig. 1C).

ISG95 protein domain architecture

Primary sequence analysis of the human ISG95 protein identified a nuclear localization signal (residues 3–18) and four conserved domains including an RNA binding (G-patch, residues 85–131), a methyltransferase (Rmj/FtsJ, residues 252–451), a DNA ligase/mRNA capping family (residues 530–729) and a protein interaction domain (WW, residues 735–786) (Fig. 2A). Data base searches revealed that conserved orthologs showing the same domain architecture are found in all vertebrates while invertebrates show a higher conservation of the G-patch and methyltransferase domain regions, although the wasp *Nasonia vitripennis* contains also the WW domain in the C-terminal region. An alignment of the ISG95 Rmj/FtsJ domain with representative members of the methyltransferase protein family is shown in Fig. 2B. The DNA ligase/mRNA capping family domain of ISG95 is less conserved but can be identified by the SMART algorithm as showing similarity to guanylyltransferase domains (Fig. 2C).

The presence of both a methyltransferase and a DNA ligase/mRNA capping family domain raised the hypothesis that ISG95 might be involved in mRNA 5' cap formation. This hypothesis was addressed by using a strategy for complementation of yeast conditional mutants as described by Ho and co-workers [20]. In these assays, ISG95 did not complement yeast conditional mutants for the guanylyltransferase Ceg1p and the methyltransferase Abd1p (data not shown), indicating that its primary function does not involve mRNA 5' cap formation.

Biochemical characterization of recombinant ISG95

Recombinant ISG95 produced in insect cells was used to assay for the biochemical functions predicted from its conserved domains. Non-radioactive assays were used to test both the RNA- and SAM-binding activities of ISG95. For the RNA interaction assay, biotin-labeled RNA was incubated with recombinant ISG95 and subsequently immobilized onto streptavidin-sepharose beads in parallel with a control assay without biotinylated RNA. Following extensive washing, a sample of each fraction was analyzed by immunoblot using an antibody for ISG95, which revealed the presence of ISG95 in the fractions eluted from the streptavidin-sepharose beads loaded with RNA (Fig. 3A). This result shows that ISG95 can interact with RNA, possibly via G-patch domain, although it was not possible to determine whether it might interact with a specific RNA sequence *in vivo*. In addition to RNA, ISG95 interacts also with S-adenosyl-methionine coupled to EAH-sepharose beads (Fig. 3B), consistently with presence of a functional Rmj/FtsJ domain. Since ISG95 interacts both with RNA and SAM, we performed an RNA-methyltransferase assay using a synthetic RNA template. Surprisingly, ISG95 did not show RNA-methyltransferase activity in this assay (data not shown). A second methyltransferase assay was performed with ISG95 using the myelin basic protein (MBP) and Smd1 that have been used as methyl group acceptor proteins for other methyltransferases. Interestingly, MBP was methylated by the recombinant ISG95 (Fig. 3C). These findings indicate that ISG95 might not act directly on RNA molecules but through the modification of proteins that function in RNA processing and are also in agreement with the fact that ISG95 may not be a paralog of the

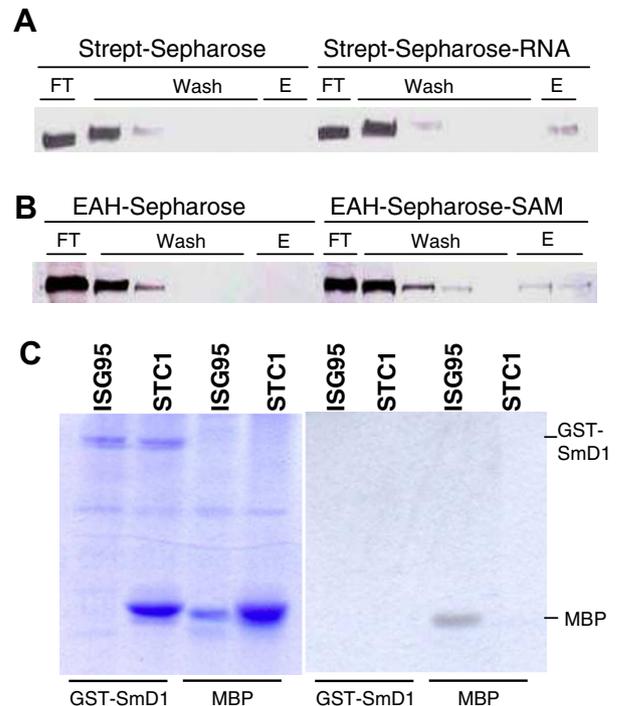


Fig. 3. Functional analysis of recombinant ISG95. (A) Analysis of ISG95 interaction with RNA. The ISG95 retained on streptavidin-sepharose beads by biotinylated RNA was detected by immunoblotting. The negative control (left) did not contain biotinylated RNA. (B) Analysis of ISG95 interaction with S-adenosyl-methionine. ISG95 was incubated with either EAH-sepharose or with S-adenosyl-methionine-sepharose beads and detected by immunoblotting. (C) Analysis of the ISG95 methyltransferase activity. Recombinant ISG95 was incubated with radioactively labeled S-adenosyl-methionine in the presence of GST-Smd1 and MBP as methyl group acceptors. STC1 indicates the control reactions performed in parallel with an unrelated protein.

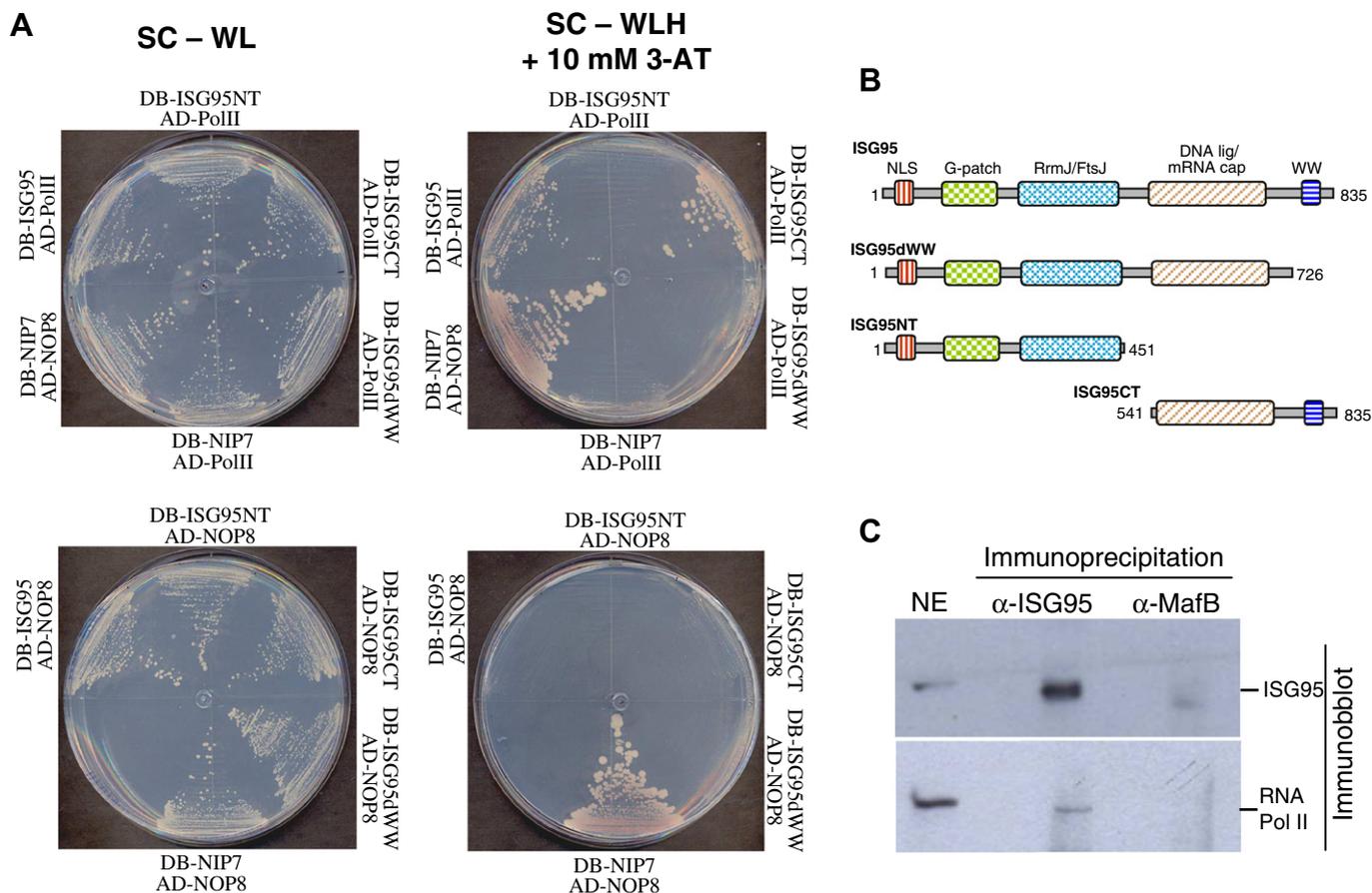


Fig. 4. Analysis of ISG95 interaction with the C-terminal domain of the RNA polymerase II. (A) Yeast two-hybrid assay showing positive interactions as determined by selection for expression of the *HIS3* reporter gene. This assay was performed in synthetic complete medium lacking tryptophan and leucine (SC-WL) or lacking tryptophan, leucine and histidine (SC-WLH). DB-ISG95, DB-ISG95NT, DB-ISG95CT, and DB-ISG95dWW indicate the DNA binding domain fusion proteins of ISG95 and its truncated forms. AD-PolIII, activation domain fusion to the CTD of RNA Pol II. AD-NOP8/DB-NIP7, positive control. Negative control assays with the activation domain fusion of NOP8 (AD-NOP8) were carried out in parallel. (B) Scheme of the truncated ISG95 constructs used in the assay shown in (A). (C) Co-immunoprecipitation assay. ISG95 was immunoprecipitated from HeLa nuclear extracts. The figure shows immunoblots analyses performed with antibodies for ISG95 (upper panel) and for the RNA polymerase II (lower panel). Lane NE indicates the nuclear extract used in the co-immunoprecipitation assay.

eukaryotic mRNA capping enzymes. In addition, ISG95 failed to interact with GTP and to form a stable complex with GMP *in vitro* (data not shown).

ISG95 interacts with the C-terminal domain of the RNA polymerase II

The results described above indicate that ISG95 does not function as an mRNA capping enzyme although three of its conserved domains point to a role in RNA metabolism. The fourth conserved domain, WW, is a protein interaction module that binds to a variety of peptides, including proline-rich motifs such as PPXY, PPLP, proline-arginine-rich sequences and phosphorylated serine/threonine-proline p(S/T)P [21,22]. The question whether ISG95 interacts with other proteins was addressed by using the yeast two-hybrid system to screen a human fetal brain cDNA library for ISG95 interacting partners. This screen identified the largest subunit of RNA polymerase II (RNA Pol II) as an ISG95 interacting protein (Fig. 4). The cDNA isolated in this screen comprises 455 amino acids of the C-terminal domain (CTD) of RNA Pol II. This interaction is supported by co-immunoprecipitation assays (Fig. 4C). Three truncated variants of ISG95 were constructed to map the region interacting with the CTD of RNA Pol II. The interacting region was mapped to residues 727–835 of ISG95 (Fig. 4A and B) which encompass the WW domain (residues 753–786, Fig. 2). The CTD of human RNA Pol II is formed by 52 heptapep-

tide repeats and is known to be regulated by phosphorylation of the Ser and Thr residues [23]. This finding indicates that ISG95 contains a group IV WW domain that recognizes phosphorylated serine/threonine-proline motifs [24] and links ISG95 with proteins such as PIN1 and PCIF1. PIN1 is a peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase, which is known to modulate the function of human RNA Pol II [25]. PCIF1, similarly to the yeast prolyl isomerase Ess1, are WW domain proteins that interact with phosphorylated CTD of RNA Pol II [26,27]. Unlike PIN1 that acts directly on the CTD of RNA Pol II to modulate its activity [25], the CTD of RNA Pol II may function as an adaptor for ISG95 binding via WW domain allowing for it to reach its targets that could be modified by the methyltransferase domain, which shows activity *in vitro*. Most probably, ISG95 acts both as a bifunctional adaptor and as an enzyme, interacting with RNA by the G-patch RNA-binding domain and with the CTD of RNA Pol II by the WW domain while the methyltransferase and the putative DNA ligase/mRNA capping domains are free to modify their targets. In conclusion, the interaction with the CTD of RNA Pol II functionally connects ISG95 with pre-mRNA processing. The findings that ISG95 does not complement the biochemical activities displayed by the yeast mRNA capping enzymes point to a role for ISG95 in pre-mRNA splicing or in 3'-end processing. ISG95 might have a function in regulating protein factors since it showed protein-substrate methyltransferase activity *in vitro*.

Acknowledgments

We are grateful to M.S. Viccari Gatti (Department of Microbiology and Immunology, UNICAMP), H.H. Petersen (Max-Delbrueck-Center for Molecular Medicine, Germany), D.M. Trindade and J. Kobarg (LNLS) for providing reagents and, to E.C. Teixeira, A.C. Alves, and M.E. Camargo for technical support. This work was supported by FAPESP, CBME/CEPID and CNPq.

References

- [1] E.C. Borden, G.C. Sen, G. Uze, R.H. Silverman, R.M. Ransohoff, G.R. Foster, G.R. Stark, Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine, *Nat. Rev. Drug Discov.* 6 (2007) 975–990.
- [2] R.E. Randall, S. Goodbourn, Interferons and viruses: an interplay between induction, signaling, antiviral responses and virus countermeasures, *J. Gen. Virol.* 89 (2008) 1–47.
- [3] G. Kochs, C. Janzen, H. Hohenberg, O. Haller, Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 3153–3158.
- [4] O. Haller, G. Kochs, F. Weber, Interferon, Mx, and viral countermeasures, *Cytokine Growth Factor Rev.* 18 (2007) 425–433.
- [5] M.A. Garcia, J. Gil, I. Ventoso, S. Guerra, E. Domingo, C. Rivas, M. Esteban, Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70 (2006) 1032–1060.
- [6] R.H. Silverman, Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response, *J. Virol.* 81 (2007) 12720–12729.
- [7] D.H. Wreschner, J.W. McCauley, J.J. Skehel, I.M. Kerr, Interferon action—sequence specificity of the ppp(A2'p)_nA-dependent ribonuclease, *Nature* 289 (1981) 414–417.
- [8] G. Floyd-Smith, E. Slattery, P. Lengyel, Interferon action: RNA cleavage pattern of a (2'-5')oligoadenylate dependent endonuclease, *Science* 212 (1981) 1030–1032.
- [9] A.I. Su, J.P. Pezacki, L. Wodicka, A.D. Brideau, L. Supekova, R. Thimme, S. Wieland, J. Bukh, R.H. Purcell, P.G. Schultz, F.V. Chisari, Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 15669–15674.
- [10] G.K. Geiss, V.S. Carter, Y. He, B.K. Kwieciszewski, T. Holzman, M.J. Korth, C.A. Lazaro, N. Fausto, R.E. Bumgarner, M.G. Katze, Gene expression profiling of the cellular transcriptional network regulated by alpha/beta interferon and its partial attenuation by the hepatitis C virus nonstructural 5A protein, *J. Virol.* 77 (2003) 6367–6375.
- [11] S. Guerra, L.A. López-Fernández, A. Pascual-Montano, M. Muñoz, K. Harshman, M. Esteban, Cellular gene expression survey of vaccinia virus infection of human HeLa cells, *J. Virol.* 77 (2003) 6493–6506.
- [12] A. Kato, T. Homma, J. Batchelor, N. Hashimoto, S. Imai, H. Wakiguchi, H. Saito, K. Matsumoto, Interferon-alpha/beta receptor-mediated selective induction of a gene cluster by CpG oligodeoxynucleotide 2006, *BMC Immunol.* 4 (2003) 1–10.
- [13] F.R. Carneiro, T.C. Silva, A.C. Alves, T. Haline-Vaz, F.C. Gozzo, N.I.T. Zanchin, Spectroscopic characterization of the tumor antigen NY-REN-21 and identification of heterodimer formation with SCAND1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343 (2006) 260–268.
- [14] A. Mayeda, A.R. Krainer, Preparation of HeLa cell nuclear and cytosolic S100 extracts for in vitro splicing, in: Susan R. Haynes (Ed.), *RNA-Protein Interaction Protocols. Methods in Molecular Biology Series*, Humana Press, Totowa, 1999, pp. 309–314.
- [15] N.M. Andersen, S. Douthwaite, YebU is a m5C methyltransferase specific for 16 S rRNA nucleotide 1407, *J. Mol. Biol.* 359 (2006) 777–786.
- [16] S.M. Hollenberg, R. Sternglanz, P.F. Cheng, H. Weintraub, Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system, *Mol. Cell. Biol.* 15 (1995) 3813–3822.
- [17] N.I. Zanchin, D.S. Goldfarb, Nip7p interacts with Nop8p, an essential nucleolar protein required for 60S ribosome biogenesis, and the exosome subunit Rrp43p, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 1518–1525.
- [18] M.O. Diaz, S. Zieminska, M.M. le Beau, P. Pitha, S.D. Smith, R.R. Chilcote, J.D. Rowley, Homozygous deletion of the alpha- and beta 1-interferon genes in human leukemia and derived cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 5259–5263.
- [19] K. Kataoka, M. Noda, M. Nishizawa, Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun, *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 700–712.
- [20] C.K. Ho, A. Martins, S. Shuman, A yeast-based genetic system for functional analysis of viral mRNA capping enzymes, *J. Virol.* 74 (2000) 5486–5494.
- [21] R.J. Ingham, K. Colwill, C. Howard, S. Dettwiler, C.S. Lim, J. Yu, K. Hersi, J. Raaijmakers, G. Gish, G. Mbamalu, L. Taylor, B. Yeung, G. Vassilovski, M. Amin, F. Chen, L. Matskova, G. Winberg, I. Ernberg, R. Linding, P. O'donnell, A. Starostine, W. Keller, P. Metalnikov, C. Stark, T. Pawson, WW domains provide a platform for the assembly of multiprotein networks, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 7092–7106.
- [22] P.J. Lu, X.Z. Zhou, M. Shen, K.P. Lu, Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules, *Science* 283 (1999) 1325–1328.
- [23] Y. Hirose, Y. Ohkuma, Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II plays central roles in the integrated events of eucaryotic gene expression, *J. Biochem.* 141 (2007) 601–608.
- [24] M.A. Verdecia, M.E. Bowman, K.P. Lu, T. Hunter, J.P. Noel, Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains, *Nat. Struct. Biol.* 7 (2000) 639–643.
- [25] Y.X. Xu, Y. Hirose, X.Z. Zhou, K.P. Lu, J.L. Manley, Pin1 modulates the structure and function of human RNA polymerase II, *Genes Dev.* 17 (2003) 2765–2776.
- [26] J.K. Myers, D.P. Morris, A.L. Greenleaf, T.G. Oas, Phosphorylation of RNA polymerase II CTD fragments results in tight binding to the WW domain from the yeast prolyl isomerase Ess1, *Biochemistry* 40 (2001) 8479–8486.
- [27] H. Fan, K. Sakuraba, A. Komuro, S. Kato, F. Harada, Y. Hirose, PCIF1, a novel human WW domain-containing protein, interacts with the phosphorylated RNA polymerase II, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301 (2003) 378–385.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de doutorado intitulada:
"Análise funcional da proteína humana codificada pelo novo gene de resposta a interferon ISG95".

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

(X) está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº NITZ03.01), intitulado "Caracterização da proteína humana KIAA0082: uma provável RNA-metil e guanililtransferase que responde a interferon e infecção viral".

() tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº _____).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).



Aluno: Thais Haline Vaz



Orientador: Nilson Ivo tonin Zanchin

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido



Nome:
Função:

Profa. Dra. HELENA COUTINHO F. DE OLIVEIRA
Presidente
Comissão Interna de Biossegurança
CIBio/IB - UNICAMP

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa para análise pela CIBio - Comissão Interna de Biossegurança da ABTLuS – Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron

Título do projeto: Caracterização da proteína humana KIAA0082: uma provável RNA-metil e guanililtransferase que responde a interferon e infecção viral

Pesquisador responsável: Prof. Dr. **Nilson Ivo Tonin Zanchin**

Experimentador: **Thais Haline Vaz**

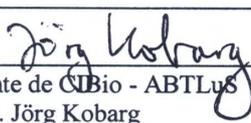
Nível do treinamento do experimentador: []-Iniciação científica, []-mestrado, []-doutorado, [x] -doutorado direto, []-pós-doutorado, []-nível técnico, []-outro, especifique: _____

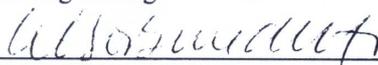
Resumo do projeto:

A resposta individual das células está na base da resistência do organismo à infecção viral. O principal mecanismo de resistência envolve a participação de inúmeros genes da via de sinalização dos interferons. Vários estudos estão sendo conduzidos em larga escala para identificar genes que respondem a interferon e infecção viral. A função do produto de muitos destes genes ainda não foi caracterizada. Numa ampla revisão destes artigos identificamos a proteína KIAA0082, a qual responde tanto a interferon como ao vírus da hepatite C (HCV). Esta proteína não possui função conhecida, mas possui quatro domínios encontrados em proteínas formadoras de cap de RNA. O presente projeto envolve a caracterização funcional e estrutural desta proteína através da sua expressão heteróloga e ensaios bioquímicos para confirmar a função dos domínios indicada pela seqüência primária. Além disso, serão realizados experimentos para determinar o contexto celular em que atua através da determinação de sua localização sub-celular e da identificação das proteínas que com ela interagem. A proteína recombinante será também submetida a ensaios de cristalização para posteriormente determinar sua estrutura tridimensional por cristalografia.

A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 27.08.2007.

Parecer final: [X]-projeto aprovado, []-projeto recusado, []-projeto com deficiências, favor comentários abaixo:


 Presidente de CIBio - ABTLuS
 Prof. Dr. Jörg Kobarg


 Membro da CIBio - ABTLuS
 Prof. Dr./Celso Eduardo Benedetti


 Membro da CIBio - ABTLuS
 Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin