

CARLOS EDUARDO BRANTIS DE CARVALHO

**Caracterização Funcional da Proteína MxA:  
Estudo do seu Envolvimento com a Maquinaria de  
SUMOilação**

Araraquara

2014

CARLOS EDUARDO BRANTIS DE CARVALHO

**Caracterização Funcional da Proteína MxA:  
Estudo do seu Envolvimento com a Maquinaria de  
SUMOilação**

Trabalho apresentado ao Instituto de  
Química, Universidade Estadual Paulista -  
UNESP, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Doutor em  
Biotecnologia.

**Orientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini**  
**Co-orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli**

Araraquara

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

C331c      Carvalho, Carlos Eduardo Brantis de  
              Caracterização funcional da proteína MxA: estudo do seu  
              envolvimento com a maquinaria de SUMOilação /  
              Carlos Eduardo Brantis de Carvalho. –  
              Araraquara : [s.n], 2014  
              130 f. : il.

              Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
              Instituto de Química  
              Orientador: Sandro Roberto Valentini  
              Coorientador: Cleslei Fernando Zanelli

              1. Biotecnologia. 2.Vírus. 3.Vírus da estomatite  
              vesicular. 4.Interferon. 5. Anticorpos policlonais. I. Título.

# CARLOS EDUARDO BRANTIS DE CARVALHO

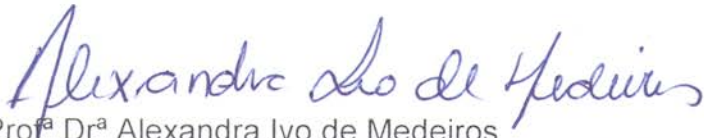
Tese apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Doutor em  
Biotecnologia.

Araraquara, 09 de maio de 2014.



## BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini (Orientador)  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Araraquara.



Prof.ª Dr.ª Alexandra Ivo de Medeiros  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP / Araraquara.



Prof.ª Dr.ª Andréia Machado Leopoldino  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP – Ribeirão Preto.



Prof.ª Dr.ª Mari Cleide Sogayar  
Instituto de Química, USP – São Paulo.



Prof. Dr. Érico Tosoni Costa  
Instituto Sírio-Libanês de Ensino e Pesquisa, Hospital Sírio-Libanês – São Paulo.

**Dedico este trabalho aos integrantes da Família Brantis, que se esforçaram para me proporcionar uma boa educação, respeitando e incentivando a realização das minhas decisões e de meus sonhos.**

|                                                                                                      |                                                                                                                                                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Nome do aluno:</b> Carlos Eduardo Brantis de Carvalho                                             | <b>Bolsista:</b><br><input type="checkbox"/> CAPES<br><input type="checkbox"/> CNPq<br><input checked="" type="checkbox"/> FAPESP<br><input type="checkbox"/> OUTRAS |
| <b>Vínculo empregatício:</b><br><input checked="" type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> SIM |                                                                                                                                                                      |
| <b>Nome do orientador:</b> Sandro Roberto Valentini                                                  |                                                                                                                                                                      |
| <b>Curso:</b> <input type="checkbox"/> Mestrado <input checked="" type="checkbox"/> Doutorado        | <b>Data de Ingresso:</b> 01/03/2010                                                                                                                                  |

### Formação Acadêmica

Doutorado em Biotecnologia: “Caracterização funcional da proteína MxA: Estudo do seu Envolvimento com a Maquinaria de SUMOilação “, no curso de pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Química-UNESP, a partir de março de 2010. Bolsa de Doutorado CNPq (01/03/2010 a 31/07/2010) e FAPESP Proc. nº 10/50908-0 (01/08/2010 a 31/03/2012 e 01/04/2013 a 28/02/2014). Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini. Bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior CAPES Proc. nº 122412-3 (01/04/2012 a 31/03/2013). Orientador: Mounira K. Chelbi-Alix.

Mestrado em Biotecnologia: “Busca de parceiros físicos por duplo-híbrido das proteínas ADAM23 e MX1, codificadas por genes metlados em câncer de cabeça e pescoço”, no curso de pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Química – UNESP. Bolsa de Mestrado FAPESP Proc. nº 07/52887-8 (01/09/07 a 31/08/09). Dissertação defendida em 15/12/09. Orientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

Bacharelado em Biotecnologia. Trabalho de Conclusão de Curso: “Avaliação da administração concomitante de três diferentes doses de sisal (Agave sisalana) na infecção por Leishmania braziliensis”, no Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências e Letras de Assis-UNESP. Orientadora: Regina Coeli Cunha Dórea

**Artigos completos publicados em periódicos**

BRANTIS-DE-CARVALHO, C.E.; BOLDRIN, P.E.G.; SILVA JUNIOR, W.A.; RAHAL, P.; TAJARA, E.H.; CARRARO, D.M.; CAMARGO, A.A.; ZANELLI, C.F. & VALENTINI, S.R. Papel da proteína Mx1 na resposta a IFNs e no processo neoplásico. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 32: 287-95, 2011.

**Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)**

BRANTIS DE CARVALHO, C.E.; ROSSETTO, D.B.; SILVA Jr., W.A.; CARRARO, D.M.; RAHAL, P.; TAJARA, E.H.; CAMARGO, A.A.; ZANELLI, C.F. & VALENTINI, S.R. – Searching for ADAM23 interacting proteins. Apresentado na XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq, Águas de Lindóia-SP, no período de 17 a 20 de maio de 2008. Livro Programa e Índices da XXXVII Reunião Anual da SBBq, G2.

ROSSETTO, D.B.; BRANTIS DE CARVALHO, C.E.; SILVA Jr., W.A.; CARRARO, D.M.; RAHAL, P.; TAJARA, E.H.; CAMARGO, A.A.; ZANELLI, C.F. & VALENTINI, S.R. – Searching for CRABP2 interacting proteins using yeast two-hybrid system. Apresentado na XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq, Águas de Lindóia-SP, no período de 17 a 20 de maio de 2008. Livro Programa e Índices da XXXVII Reunião Anual da SBBq, G12.

ROSSETTO, D.B.; BRANTIS DE CARVALHO, C.E.; KIYOMOTO, E.N.; BOLDRIN, P.E.G.; SILVA JR, W.A.; CARRARO, D.M.; RAHAL, P.; TAJARA, E.H.; CAMARGO, A.A.; ZANELLI, C.F. & VALENTINI, S.R. - Identification of CRABP2 ligands using yeast two-hybrid system. Apresentado na XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia-SP, no período de 16 a 19 de maio de 2009. Livro de Resumos da XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009. p. G39.

BRANTIS DE CARVALHO, C.E.; ROSSETTO, D.B.; BOLDRIN, P.E.G.; KIYOMOTO, E.N.; SILVA JR., W.A.; CARRARO, D.M.; RAHAL, P.; TAJARA DA SILVA, E.H.; CAMARGO, A.A.; ZANELLI, C.F. & VALENTINI, S.R. – MX1 epigenetic silencing in head and neck carcinoma: lessons from its putative two-hybrid interactors. Apresentado na XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e

Biologia Molecular, Foz do Iguaçu-PR, no período de 18 a 21 de maio de 2010. Livro de Resumos da XXXIX Reunião Anual da SBBq, 2010, p. B27.

ROSSETTO, D.B.; KYIOMOTO, E.N.; BRANTIS DE CARVALHO, C.E.; BOLDRIN, P.E.G.; SILVA JR., W.A.; CARRARO, D.M.; RAHAL, P.; TAJARA DA SILVA, E.H.; CAMARGO, A.A.; ZANELLI, C.F. & VALENTINI, S.R. – Searching for CRABP2 ligands using yeast two-hybrid system in the presence of retinoic acid. Apresentado na XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Foz do Iguaçu-PR, no período de 18 a 21 de maio de 2010. Livro de Resumos da XXXIX Reunião Anual da SBBq, 2010, p. G51.

BRANTIS DE CARVALHO, C.E.; ROSSETTO, D.B.; BOLDRIN, P.E.G.; TAJARA, E.H.; MEDEIROS, A.I.; ZANELLI, C.F. & VALENTINI, S.R. - Mapping MX1 protein domain-dependent interactions with its ligands. Apresentado na XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Foz do Iguaçu-PR, no período de 30 de abril a 03 de maio de 2011. Livro de Resumos da XL Reunião Anual da SBBq, p. I22

ROSSETTO, D.B.; BRANTIS DE CARVALHO, C.E.; COSTA, E.T.; CAMARGO, A.A.; ZANELLI, C.F. & VALENTINI, S.R. - New ligands of CRABP2 suggest a role for this protein in chromatin remodeling. Apresentado na “XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq”, Foz do Iguaçu – PR, no período de 19 a 22 de maio de 2012.

### **Outras atividades acadêmicas relevantes**

Colaborou na orientação do aluno Paulo Eduardo Gonçalves Boldrin, no desenvolvimento do projeto “Busca de parceiros físicos de ADAM23 e MX1, utilizando o sistema de duplo-híbrido em *Saccharomyces cerevisiae*”, no período de 12/08/08 a 31/09/11, num total de 2.040 horas. Bolsa de Iniciação Científica CNPQ/PIBIC (01/08/08 a 31/01/12).

## AGRADECIMENTOS

---

Aos meus avós, por serem a razão do meu viver e minha fonte de motivação, força e coragem. “NADA DISSO SERIA POSSÍVEL SEM VOCÊS”.

Aos meus pais, pelo dom da vida e pelo crescimento proporcionado.

Aos meus familiares, pelo amor, carinho e apoio incondicionais.

Ao professor Sandro, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela orientação, pelo estímulo de sempre ir além e pela grande amizade.

Ao professor Cleslei, pela co-orientação.

À professora Mounira K Chelbi-Alix, pela oportunidade de executar parte deste trabalho em seu laboratório na Université Paris René Descartes – Paris, França.

Às professoras Maria Célia Bertolini, do IQ-UNESP, e Andréia Machado Leopoldino, da FCFRP-USP, e ao Doutorando Mauro Junio de Vasconcelos Pereira, do IQ-/UNESP, pela participação e contribuição na análise do pedido de bolsa PDSE-CAPES.

À professora Alexandra Ivo de Medeiros, da FCFAR-UNESP, e ao pesquisador Érico Tosoni Costa, do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, pela participação na banca de qualificação.

Às professoras Eloiza Helena Tajara da Silva, da FAMERP, e Alexandra Ivo de Medeiros, da FCFAR-UNESP, e aos pesquisadores Anamaria Aranha Camargo e Érico Tosoni Costa, do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, pela colaboração no desenvolvimento e aprendizagem de técnicas aqui empregadas.

Aos companheiros de laboratório, Ana, Aninha, Arthur, Camila, Carolina, Cristina, Diana, Daniella, Danuza, Ejaz, Fábio, Fernando, Hermano, Juliana, Laura, Leonardo, Marco, Matheus, Natália, Paulinha, Paulo, Priscila, Oedem, Tatiana Watanabe, Tatiana Maria e Thaís, pelo convívio e aprendizado diário.

Às técnicas Mariana, Érika, Luana e Silvia “muiézinha” e aos técnicos Luciano e Victor pelo suporte nas atividades laboratoriais.

Aos funcionários da FCF-UNESP e do IQ-UNESP.

À FCF-UNESP, FAPESP, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro e institucional para a realização desse trabalho.

Aos amigos Adelino, Adolfo, Alex, Edimael, Paulo, Rafael e Sandro pelo

## AGRADECIMENTOS

---

companheirismo incondicional, pelas conversas, pelas festas e pelo aprendizado que me proporcionaram.

Aos amigos Franceses: Jean-Claude, Laurent, Sebastien, Jacques, Ophélie, Françoise e Isabelle; Maroquina: Ghizlane; Tunisianos: Faten e Mohamed; Libanês: Hany; Argelino: Abderezak; Holandesa: Nathalie; e Português: Vasco pelos momentos vividos e por me ensinarem que as diferenças de nacionalidades e credos não nos tornam diferentes na essência.

Aos amigos da Maison du Brésil, em especial aos moradores do “5<sup>é</sup> étage”, que foram minha família no período do doutorado sanduíche, e a direção e funcionários da Maison.

Aos demais amigos, pela companhia e dedicação nos mais diversos momentos vividos.

ALL I REALLY WANT - ALANIS MORISSETTE

Do I stress you out?  
My sweater is on backwards and inside  
out  
And you say: "how appropriate!"

I don't want to dissect everything today  
I don't mean to pick you apart, you see  
But I can't help it

And there I go, jumping before the gun-  
shot has gone off  
Slap me with a splintered ruler  
And it would knock me to the floor if I  
wasn't there already  
If only I could hunt the hunter

And all I really want is some patience  
A way to calm the angry voice  
And all I really want is deliverance

Do I wear you out?  
You must wonder why I'm relentless and  
all strung out  
I'm consumed by the chill of solitary

I'm like Estella  
I like to reel it in and then spit it out  
I'm frustrated by your apathy

And I am frightened by the corrupted  
ways of this land  
If only I could meet the Maker  
And I am fascinated by the spiritual man  
I am humbled by his humble nature

And what I wouldn't give to find a  
soulmate  
Someone else to catch this drift  
And what I wouldn't give to meet a  
kindred

Enough about me  
Let's talk about you for a minute  
Enough about you  
Let's talk about life for a while  
The conflicts, the craziness  
And the sound of pretenses falling  
All around, all around

Why am I so petrified of silence?  
Here, can you handle this?  
Did you think about your bills, your ex,  
your deadlines?  
Or when you think you're gonna die?  
Or did you long for the next distraction?

And all I need now is intellectual  
intercourse  
A soul to dig the hole much deeper  
And I have no concept of time, other  
than it is flying  
If only I could kill the killer

And all I really want is some peace, man  
A place to find a common ground  
And all I really want is a wave-length

And all I really want is some comfort  
A way to get my hands untied  
And all I really want is some justice

## RESUMO

A proteína MxA humana é membro da superfamília de GTPases dinaminas. De maneira geral, as chamadas proteínas Mx estão presentes na grande maioria dos organismos vertebrados, estudados até o momento, e possuem dois domínios estruturais, chamados GTPase e CID-GED (*stalk*), além da capacidade de homo-oligomerização e associação com membranas intracelulares. Além disso, as proteínas Mx são produzidas unicamente após a sensibilização celular por interferons do tipo I e III. Entre as propriedades funcionais de MxA, destaca-se a sua vasta atividade contra diferentes vírus de RNA e DNA, incluindo o vírus influenza e membros da família dos bunivírus. Além disso, o silenciamento gênico de MxA está associado ao fenótipo de imortalização celular em uma série de neoplasias. Assim, MxA desperta o interesse por ser uma das proteínas chave nas respostas mediadas por interferons e por estar envolvida no controle da proliferação celular. Recentemente, por meio de rastreamento de duplo-híbrido, utilizando uma biblioteca de cDNA preparada a partir de cérebro fetal humano, foi possível mostrar que MxA interage com fatores envolvidos no processo de SUMOilação de proteínas e na formação de corpúsculos nucleares denominados PML-NB e com uma série de proteínas relacionadas com o controle da transcrição e apoptose. Neste estudo, foi investigada a interação entre MxA e as proteínas envolvidas nos processo de SUMOilação. Assim, foi possível confirmar a interação física entre a proteína MxA e os ligantes Ubc9 e SUMO1, por ensaios de co-imunoprecipitação. A seguir, através de ensaios de duplo-híbrido, foi possível determinar que a região EIL (E67-interacting Loop) de SUMO1 e o domínio CID-GED de MxA estão envolvidos na interação entre essas proteínas e que esta interação independe de sequências SIM (SUMO-interacting motif) presentes em MxA. Ainda, foi possível determinar que Ubc9 interage diretamente com o domínio GTPase de MxA e que a homo-oligomerização de MxA é importante para a sua interação com Ubc9 e SUMO1. Foi demonstrado também, pela primeira vez, que a proteína MxA é alvo da modificação pós-traducional promovida pelas proteínas SUMO1, SUMO2 e SUMO3. Finalmente, foi possível demonstrar que o resíduo de lisina presente na posição 48 da sequência de MxA é um sítio aceptor da SUMOilação e que o mutante nesse resíduo de aminoácido (MxA<sub>K48R</sub>) não perde a capacidade de inibir a replicação do Vírus da Estomatite Vesicular (VSV). Os padrões de SUMOilação de MxA também não foram modificados pelo vírus VSV. Os resultados obtidos evidenciam o envolvimento de MxA com a maquinaria de SUMOilação.

Palavras-chave: MxA, Interferon, SUMO, Ubc9, SUMOilação e Atividade Antiviral.

**ABSTRACT**

The human MxA protein is a member of the superfamily of GTPases dynamins. The so called Mx proteins are present in the majority of the vertebrate organisms investigated so far and contain two structural domains, named GTPase and CID-GED (*stalk*), besides the capabilities of homo-oligomerization and association with intracellular membranes. Moreover, the Mx proteins are strictly produced upon cell sensibilization with type I and III interferons. The vast antiviral activity against RNA and DNA viruses, including the Influenza virus and members of the bunyaviridae family, is among the functional properties of MxA. Moreover, *MX1* epigenetic silencing is associated with cellular immortalization in neoplasias. Therefore, the study of MxA is of great interest as it is a key component of the Interferon-mediated pathways and cell proliferation control. Recently, in a two-hybrid screen using a fetal brain cDNA library, it was possible to reveal that MxA interacts with proteins related to the post-translational modification process named SUMOylation and to the assemble of the nuclear bodies named PML-NBs and with proteins implicated in the control of transcription and apoptose. In this study, it was investigated the interaction between MxA and the components of the protein SUMOylation pathway. It was possible to confirm the physical interaction between MxA and Ubc9 and SUMO1, using co-immunoprecipitation assay. Then, using the yeast two-hybrid system, it was possible to determine that the EIL (E67-interacting loop) region on SUMO1 interacts with the CID-GED domain of MxA without the requirement of the SIM sequences (SUMO-interacting motif) present in MxA. Moreover, it was determined that Ubc9 interacts with the GTPase domain of MxA and that MxA homo-oligomerization is important for its interaction with SUMO1 and Ubc9. Also, we were able to demonstrate for the first time that the protein MxA undergoes SUMOylation by SUMO1, SUMO2 and SUMO3. Finally, it was possible to demonstrate that the lysine residue on the position 48 in the MxA amino acid sequence is an acceptor site of the SUMOylation and that the mutant in this residue (MxA<sub>K48R</sub>) retains its antiviral activity against the Vesicular Stomatitis Virus (VSV). The VSV virus did not modify the SUMOylation pattern of MxA. The results obtained so far reveal the involvement of MxA with the machinery of protein SUMOylation.

Key-Words: MxA, Interferon, SUMO, Ubc9, SUMOylation and Antiviral Activity.

## LISTA DE FIGURAS

---

|                                                                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| FIGURA 1. Esquema da organização estrutural da proteína MxA de humanos e de outros membros da superfamília de GTPases dinamina. ....                                       | 30  |
| FIGURA 2. Comparação de proteínas Mx de diferentes organismos vertebrados. ....                                                                                            | 31  |
| FIGURA 3. Estrutura da proteína MxA e de seu oligômero. ....                                                                                                               | 32  |
| FIGURA 4. Mecanismos de indução da produção de interferons do tipo I e III (IFN-I e IFN-III) por PAMPs e ativação da resposta antiviral, incluindo a produção de MxA. .... | 33  |
| FIGURA 5. Diagrama de grupos dos ligantes prováveis de MxA de acordo com dados de ontologia genética. ....                                                                 | 34  |
| FIGURA 6. Comparação da estrutura de ubiquitina e SUMO2 e alinhamento múltiplo de SUMO1 e seus parálogos SUMO2/3/4. ....                                                   | 36  |
| FIGURA 7. Esquema da modificação pós-traducional por proteínas SUMO (SUMOilação) e de suas sequências de modificação e interação. ....                                     | 39  |
| FIGURA 8. Avaliação da produção e purificação da proteína de fusão GST-MxA. ....                                                                                           | 67  |
| FIGURA 9. Avaliação da produção e determinação do título do anticorpo policlonal anti-MxA ( $\alpha$ -pMxA). ....                                                          | 68  |
| FIGURA 10. Etapas da purificação do anticorpo policlonal anti-MxA ( $\alpha$ -pMxA). ....                                                                                  | 69  |
| FIGURA 11. Avaliação da qualidade do anticorpo policlonal anti-MxA ( $\alpha$ -pMxA). ....                                                                                 | 70  |
| FIGURA 12. Avaliação da interação física entre MxA e proteínas da maquinaria de SUMOilação (SUMO1, SUMO2, SUMO3 e Ubc9), por co-imunoprecipitação. ....                    | 74  |
| FIGURA 13. Confirmação da interação de MxA com Ubc9 e SUMO1 por co-imunoprecipitação. ....                                                                                 | 75  |
| FIGURA 14. Ensaio de co-localização de MxA com proteínas da maquinaria de SUMOilação. ....                                                                                 | 76  |
| FIGURA 15. Análise da conservação das regiões mutadas de MxA, bem como a localização das mutações em relação aos seus domínios. ....                                       | 81  |
| FIGURA 16. Ensaio de expressão e oligomerização dos mutantes de MxA. ....                                                                                                  | 82  |
| FIGURA 17. Análise da distribuição celular de MxA e seus mutantes. ....                                                                                                    | 83  |
| FIGURA 18. Confirmação da expressão das formas selvagens e mutadas de MxA, SUMO e Ubc9. ....                                                                               | 93  |
| FIGURA 19. Teste de autoativação das construções de MxA, SUMO1/2/3 e Ubc9. ....                                                                                            | 94  |
| FIGURA 20. Avaliação da interação física entre MxA e SUMO1/2/3 ou MxA e Ubc9 por duplo-híbrido. ....                                                                       | 95  |
| FIGURA 21. Avaliação do papel das sequências SIM de MxA na sua interação com SUMO1. ....                                                                                   | 96  |
| FIGURA 22. Mapeamento do domínio de interação de MxA com Ubc9 e SUMO1 e análise do impacto da oligomerização nessas interações. ....                                       | 97  |
| FIGURA 23. Avaliação da interação física de MxA com mutantes de SUMO e Ubc9. ....                                                                                          | 98  |
| FIGURA 24. Ensaio de SUMOilação de MxA por SUMO1 e seus parálogos SUMO2 e SUMO3. ....                                                                                      | 101 |
| FIGURA 25. Ensaio de SUMOilação do mutante MxA <sub>K48R</sub> . ....                                                                                                      | 102 |
| FIGURA 26. Avaliação da atividade antiviral de formas mutadas de MxA por imunofluorescência indireta. ....                                                                 | 105 |
| FIGURA 27. Avaliação da influência da infecção pelo vírus VSV na SUMOilação de MxA. ....                                                                                   | 106 |
| FIGURA 28. Mecanismos prováveis de SUMOilação da proteína MxA. ....                                                                                                        | 112 |

## LISTA DE TABELAS

---

|                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1 – Atividade antiviral das proteínas Mx de diferentes organismos .....                          | 35 |
| TABELA 2 - Principais proteínas semelhantes a ubiquitina incluindo suas características e funções ..... | 38 |
| TABELA 3 – Plasmídeos utilizados neste estudo. ....                                                     | 42 |
| TABELA 4 – Linhagens de leveduras utilizadas neste estudo.....                                          | 44 |
| TABELA 5 – Oligonucleotídeos utilizados neste estudo. ....                                              | 45 |
| TABELA 6 – Anticorpos utilizados neste estudo. ....                                                     | 47 |
| TABELA 7 – Predição de sítios de ligação a SUMO e SUMOilação em MxA. ....                               | 80 |

### Unidades de Medida

|               |                            |
|---------------|----------------------------|
| <b>°C</b>     | Celsius degrees            |
| <b>ABS/AB</b> | Optocal density/Absorbance |
| <b>S</b>      |                            |
| <b>kb</b>     | Kilobase                   |
| <b>kDa</b>    | Kilodalton                 |
| <b>kV</b>     | Kilovolt                   |
| <b>M</b>      | Molar                      |
| <b>mL</b>     | Milliliter                 |
| <b>mM</b>     | Millimolar                 |
| <b>ng</b>     | Nanogram                   |
| <b>nm</b>     | Nanometer                  |
| <b>pb</b>     | Base pair                  |
| <b>pH</b>     | Power of Hydrigen          |
| <b>q.s.p.</b> | Quantidade suficiente para |
| <b>U</b>      | Enzimatic unit             |
| <b>UV</b>     | Ultraviolet                |
| <b>V</b>      | Volt                       |
| <b>xg</b>     | Gravitational acceleration |
| <b>μF</b>     | Microfaraday               |
| <b>μg</b>     | Microgram                  |
| <b>μL</b>     | Microliter                 |
| <b>Ω</b>      | Ohm                        |

### Reagentes e Técnicas

|              |                                                            |
|--------------|------------------------------------------------------------|
| <b>YPD</b>   | Yeast cultivation media (Yeast extract, Peptone, Dextrose) |
| <b>ATP</b>   | Adenosine triphosphate                                     |
| <b>BSA</b>   | Bovine serum albumin                                       |
| <b>cDNA</b>  | Complementary DNA                                          |
| <b>DAPI</b>  | 4',6-diamidino-2-phenylindole                              |
| <b>DMEM</b>  | Dulbecco's Modified Eagle Media                            |
| <b>DMSO</b>  | Dimethyl sulfoxide                                         |
| <b>DNA</b>   | Deoxyribonucleic acid                                      |
| <b>dNTPs</b> | deoxynucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)     |
| <b>dsRNA</b> | Double-stranded RNA                                        |
| <b>DTT</b>   | Dithiothreitol                                             |
| <b>EDTA</b>  | Ethylenediaminetetraacetic acid                            |
| <b>IAC</b>   | 2-Iodoacetamide                                            |
| <b>IFN</b>   | Interferon                                                 |
| <b>IPTG</b>  | Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside                      |
| <b>LB</b>    | Luria-Bertani broth – Bacterial media                      |

## ABREVIATURAS

---

|                     |                                                                         |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>NEM</b>          | <i>N</i> -Ethylmaleimide                                                |
| <b>PBS</b>          | Phosphate buffered saline                                               |
| <b>PBST</b>         | Phosphate buffered saline add of tween 20                               |
| <b>PCI</b>          | Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (24:25:1)                             |
| <b>PCR</b>          | Polymerase Chain Reaction                                               |
| <b>PEG</b>          | Polyethylene glycol                                                     |
| <b>PEI</b>          | Polyethylenimine                                                        |
| <b>PLAC</b>         | Protease inhibitors (Pepstatina, Leupeptina, Aprotinina e Quimostatina) |
| <b>PMSF</b>         | phenylmethylsulfonyl fluoride                                           |
| <b>RNA</b>          | Ribonucleic Acid                                                        |
| <b>RNase</b>        | Ribonuclease                                                            |
| <b>SC</b>           | Synthetic Complete – Yeast cultivation media                            |
| <b>SDS</b>          | Sodium dodecyl sulfate                                                  |
| <b>SDS-PAGE</b>     | Polyacrylamide gel electrophoresis                                      |
| <b>SOB</b>          | Super Optimal Broth – Bacterial media                                   |
| <b>TAE</b>          | Tris-acetate-EDTA                                                       |
| <b>TEMED</b>        | Tetramethylethylenediamine                                              |
| <b>Tris</b>         | Tris hydroxymethyl-aminomethane                                         |
| <b>Triton X-100</b> | polyethylene glycol p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl ether           |
| <b>Tween 20</b>     | Polysorbate 20                                                          |
| <b>VSV</b>          | Vesicular Stomatitis VirusVírus da Estomatite Vesicular                 |
| <b>X-Gal</b>        | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside                |

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUÇÃO .....                                                               | 19 |
| 1.1. A DESCOBERTA DA PROTEÍNA MXA .....                                        | 19 |
| 1.2. ASPECTOS ESTRUTURAIS DE MXA .....                                         | 19 |
| 1.3. A PROTEÍNA MXA E SUA ATIVIDADE ANTIVIRAL .....                            | 21 |
| 1.4. ASSOCIAÇÃO DE MXA COM CÂNCER E OUTRAS DOENÇAS HUMANAS .....               | 24 |
| 1.5. A PROTEÍNA MXA E SEUS LIGANTES CELULARES.....                             | 25 |
| OBJETIVOS .....                                                                | 40 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL .....                                                      | 40 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                               | 40 |
| 2.2.1. OBTENÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL ANTI-MXA (A-PMXA).....                 | 40 |
| 2.2.2. CARACTERIZAÇÃO DE PARCEIROS FÍSICOS DE MXA .....                        | 40 |
| 2.2.3. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES DE MXA .....                      | 40 |
| 2.2.4. MAPEAMENTO DOS SÍTIOS DE INTERAÇÃO FÍSICA ENTRE MXA E SUMO OU UBC9..... | 40 |
| 2.2.5. AVALIAÇÃO DE INTERAÇÃO FÍSICA DE MXA DEPENDENTE DE OLIGOMERIZAÇÃO.....  | 41 |
| 2.2.6. ANÁLISE DA SUMOILAÇÃO DE MXA POR SUMO1 OU PELOS SEUS PARÁLOGOS .....    | 41 |
| 2.2.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS FORMAS MUTADAS DE MXA .....        | 41 |
| MATERIAL E MÉTODOS.....                                                        | 42 |
| 3.1. MATERIAL .....                                                            | 42 |
| 3.2. MÉTODOS .....                                                             | 48 |
| 3.2.1. TRANSFORMAÇÃO DE <i>E. COLI</i> .....                                   | 48 |
| 3.2.1.1. TRANSFORMAÇÃO QUÍMICA .....                                           | 48 |
| 3.2.1.2. ELETROPORAÇÃO .....                                                   | 49 |
| 3.2.2. TRANSFORMAÇÃO DE ALTA EFICIÊNCIA DE <i>S. CEREVISIAE</i> .....          | 49 |
| 3.2.3. MANIPULAÇÃO DE LINHAGENS CELULARES DE MAMÍFEROS .....                   | 50 |
| 3.2.3.1. TRANSFEÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM LINHAGENS DE MAMÍFEROS.....           | 50 |
| 3.2.3.2. INFECÇÃO VIRAL DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS .....                          | 51 |
| 3.2.4. MANIPULAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....                                   | 51 |
| 3.2.4.1. ISOLAMENTO DE DNA PLASMIDIAL DE BACTÉRIA (MINI PREPARAÇÃO) .....      | 51 |
| 3.2.4.2. MANIPULAÇÃO ENZIMÁTICA DE DNA .....                                   | 52 |
| 3.2.4.3. ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE.....                            | 52 |
| 3.2.4.4. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA DE GEL DE AGAROSE.....  | 52 |
| 3.2.4.5. AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR .....                                     | 52 |
| 3.2.4.6. SEQUENCIAMENTO DE DNA .....                                           | 53 |
| 3.2.4.7. MUTAÇÃO SÍTIO-DIRIGIDA .....                                          | 53 |
| 3.2.5. CLONAGEM UTILIZANDO O SISTEMA GATEWAY (INVITROGEN) .....                | 54 |
| 3.2.5.1. GERAÇÃO DO CLONE DE ENTRADA.....                                      | 54 |
| 3.2.5.2. GERAÇÃO DO CLONE DESTINO .....                                        | 54 |

|                                                                                                                               |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.2.6. MANIPULAÇÃO DE PROTEÍNAS .....</b>                                                                                  | <b>54</b> |
| 3.2.6.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS .....                                                                          | 54        |
| 3.2.6.2. TESTE DE INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE .....                                                          | 55        |
| 3.2.6.3. PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EM LARGA ESCALA.....                                                               | 55        |
| 3.2.6.4. PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA EM FUSÃO COM CAUDA DE HISTIDINAS .....                                                       | 56        |
| 3.2.6.5. PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA EM FUSÃO COM GST (GLUTATIONA S-TRANSFERASE) ..                                               | 56        |
| 3.2.6.6. SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS POR SDS-PAGE.....                                                                             | 57        |
| 3.2.6.7. COLORAÇÃO DE PROTEÍNAS.....                                                                                          | 57        |
| 3.2.6.8. WESTERN BLOT.....                                                                                                    | 57        |
| <b>3.2.7. PRODUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL EM COELHOS.....</b>                                                                | <b>58</b> |
| 3.2.7.1. PURIFICAÇÃO DE ANTICORPO.....                                                                                        | 58        |
| <b>3.2.8. ENSAIOS DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA POR DUPLO-HÍBRIDO.....</b>                                                   | <b>59</b> |
| 3.2.8.1. ANÁLISE DE FENÓTIPO DE CRESCIMENTO EM MEIO SEM HISTIDINA .....                                                       | 59        |
| 3.2.8.2. ENSAIO DE B-GALACTOSIDASE .....                                                                                      | 59        |
| <b>3.2.9. ENSAIO DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA POR CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO .....</b>                                            | <b>60</b> |
| <b>3.2.10. ENSAIO DE SUMOILAÇÃO .....</b>                                                                                     | <b>60</b> |
| <b>3.2.11. ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA .....</b>                                                                    | <b>61</b> |
| <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                                           | <b>63</b> |
| <b>4.1. PRODUÇÃO DO ANTICORPO POLICLONAL ANTI-MXA (A-PMXA) .....</b>                                                          | <b>63</b> |
| 4.1.1. CLONAGEM DO GENE <i>MX1</i> EM VETOR DE EXPRESSÃO.....                                                                 | 63        |
| 4.1.2. TESTES DE INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-MXA.....                                                    | 63        |
| 4.1.3. PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO ANTICORPO POLICLONAL A-PMXA.....                                                  | 64        |
| <b>4.2 CONFIRMAÇÃO DA INTERAÇÃO FÍSICA DE MXA COM LIGANTES REVELADOS POR DUPLO-HÍBRIDO.....</b>                               | <b>71</b> |
| 4.2.1. ENSAIO DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA POR CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO .....                                                   | 71        |
| 4.2.2. ENSAIO DE CO-LOCALIZAÇÃO DE MXA COM UBC9 E SUMO1.....                                                                  | 73        |
| <b>4.3. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES DE MXA.....</b>                                                                 | <b>77</b> |
| 4.3.1. ANÁLISE DA SEQUÊNCIA PRIMÁRIA DE MXA.....                                                                              | 77        |
| 4.3.2. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES DE MXA. ....                                                                    | 78        |
| <b>4.4. MAPEAMENTO DOS SÍTIOS DE INTERAÇÃO FÍSICA ENTRE MXA E SUMO1 OU UBC9, POR DUPLO-HÍBRIDO. ....</b>                      | <b>84</b> |
| 4.4.1. CLONAGEM DOS GENES <i>MX1</i> , <i>SUMO1/2/3</i> E <i>UBC9</i> , SELVAGEM E MUTADOS, EM VETORES DE DUPLO-HÍBRIDO. .... | 85        |
| 4.4.2. VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS FORMAS MUTADAS DE MXA, SUMO E UBC9.....                                                    | 86        |
| 4.4.3. TESTES DE AUTOATIVAÇÃO DAS PROTEÍNAS MXA, SUMO E UBC9, SELVAGEM E MUTADAS, EM FUSÃO COM LEXA OU GAL4-AD.....           | 86        |
| 4.4.4. ANÁLISE DA INTERAÇÃO FÍSICA ENTRE MXA E SUMO1/2/3 OU UBC9, POR DUPLO-HÍBRIDO.....                                      | 87        |
| 4.4.5. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS SIM (SIMB E SIMA) NA INTERAÇÃO DE MXA COM SUMO1.....                          | 88        |

|                                                                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.4.6. MAPEAMENTO, POR DUPLO-HÍBRIDO, DOS DOMÍNIOS DE MXA ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO COM UBC9 E SUMO1 E AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DA OLIGOMERIZAÇÃO DE MXA NESSAS INTERAÇÕES ..... | 88  |
| 4.4.7. IDENTIFICAÇÃO, POR DUPLO-HÍBRIDO, DAS REGIÕES DE SUMO ENVOLVIDAS NA INTERAÇÃO COM A PROTEÍNA MXA.....                                                                     | 90  |
| 4.5. ANÁLISE DA SUMOILAÇÃO DE MXA POR SUMO1 OU PELOS SEUS PARÁLOGOS.....                                                                                                         | 99  |
| 4.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS FORMAS MUTADAS DE MXA.....                                                                                                             | 103 |
| REFERÊNCIAS .....                                                                                                                                                                | 114 |
| ANEXOS .....                                                                                                                                                                     | 122 |

### INTRODUÇÃO

#### 1.1. A descoberta da proteína MxA

A proteína MxA é codificada pelo gene *MX1* (paraorthomyxovirus resistance gene 1), também chamado de *IFI78* (Interferon-inducible protein p78), induzido por dois tipos de interferons (IFNs). Assim, a proteína MxA atua como mediador da imunidade inata, levando à resistência a vírus de RNA e DNA (BROMBERG, 2002; CALÒ et al., 2003; BRAND et al., 2005; HALLER et al., 2007a).

O gene *MX1* foi descoberto em estudos de resistência ao vírus da influenza realizados em camundongos, os quais mostraram que os animais isogênicos que apresentavam resistência ao vírus da influenza carregavam uma cópia funcional do gene *MX1*, contido no cromossomo 16, ao passo que aqueles animais suscetíveis à infecção apresentavam deleções e/ou mutações que tornavam o gene *MX1* inativo (LINDENMANN, 1962; HORISBERGER et al., 1983; STAEHEL et al., 1988).

A partir desses estudos iniciais, foram indentificados em camundongo e humanos novos genes codificadores das chamadas proteínas Mx, além de proteínas similares em outros organismos vertebrados e invertebrados (HALLER e WEBER, 2009). As proteínas Mx são expressas por diversos tipos celulares, especialmente hepatócitos, células endoteliais e do sistema imunológico, incluindo células mononucleares de sangue periférico (PBMC), células dendríticas plasmacitóides (pCD) e células mielóides (FERNANDEZ et al., 1999).

Um fato importante é que o gene *MX1* não pode ser induzido pela infecção viral sem que haja a correta produção de tipos específicos de IFNs, ao contrário do que ocorre com outros genes estimulados por IFNs, como por exemplo ISG56, que pode ser produzido pela infecção viral, independente da produção desses IFNs (HOLZINGER et al., 2007).

#### 1.2. Aspectos estruturais de MxA

As proteínas Mx são membros da superfamília de GTPases dinaminas (HALLER et al., 2007a). MxA é estruturalmente organizada no domínio GTPase e no domínio central de interação (CID, *Central interactive domain*), em sua porção N-terminal, e domínio efetor de GTPase (GED, *GTPase effector domain*), em sua porção C-terminal. As proteínas dessa subfamília compartilham também a capacidade de oligomerização (homo-oligomerização), por meio da sequência de auto-associação SAS (Self-

## 1.INTRODUÇÃO

---

Association Sequence) e do domínio GED. A proteína dinamina-1 (Dyn1), outro membro da superfamília das GTPases dinaminas, possui ainda dois domínios específicos: domínio pleckestrina (PH, *pleckstrin homology domain*) e o domínio rico em prolina (PRD, *proline rich domain*). A Figura 1 apresenta o esquema da organização estrutural das proteínas MxA e MxB de humano, Mx1 e Mx2 de murino e Dinamina-1 (Dyn1) de humano.

O alinhamento das sequências das proteínas Mx dos mais diferentes organismos mostra um grau maior de conservação na região N-terminal, de forma mais acentuada na região que compreende o domínio GTPase. A Figura 2A e 2B apresentam, respectivamente, a análise da conservação e a árvore filogenética obtidas através do alinhamento das sequências de aminoácidos de proteínas Mx identificadas em diferentes animais vertebrados. Por meio destas análises é possível dizer que as proteínas Mx podem ser divididas em 5 subgrupos de acordo com sua similariedade, são eles: 1 - semelhantes a MxA (A); 2 – semelhante a MxB (B); 3- Mx de aves (C); 4 – Mx de peixes (D) e 5 – Mx de roedores (E) (HALLER et al., 2007c).

Ainda em relação a organização estrutural de MxA, foi demonstrado, por meio de ensaios de cristalização, que a região correspondente aos domínios CID e GED é estruturada em seis alfa hélices e quatro “loops”, formando um domínio estrutural único denominado *stalk* (Figura 3A). Este domínio estrutural é determinante para a correta formação dos oligômeros de MxA (Figura 3B) (GAO et al., 2010; HALLER et. al., 2010).

A estrutura do oligômero foi determinada a partir da estrutura terciária predita e dados obtidos em ensaios de microscopia eletrônica de crio-transmissão. Assim, foi proposto que o oligômero de MxA organiza-se em uma estrutura semelhante a um anel, com diâmetro externo de 41 nm e interno de 24 nm. Esta estrutura é formada pela interação entre 16 monômeros, sendo que o domínio globular GTPase encontra-se na face externa do complexo e os domínios CID e GED na face interna, coordenando a interação (Figura 3B) (HALLER et al., 2010). Em contrapartida, o oligômero de Dinamina-1 seria formado pela associação de 13-14 monômeros, gerando uma estrutura com diâmetro externo de 38 nm e interno de 14 nm, onde o domínio GTPase também estaria voltado para a face externa e os domínios PH e PRD para o interior do anel (GAO et al., 2010).

Essa capacidade de oligomerização influencia a atividade GTPásica de MxA que é perdida pelo mutante de oligomerização (L612K). A proteína mutada MxA<sub>L612K</sub> é incapaz de formar oligômeros, não possui atividade GTPásica e é degradada em

## 1.INTRODUÇÃO

---

aproximadamente duas horas, em contraste com a forma selvagem que tem aproximadamente meia vida de 24 horas (JANZEN et al., 2.000; HALLER et al., 2007).

### 1.3. A proteína MxA e sua atividade antiviral

A imunidade inata é a primeira linha de defesa natural do corpo contra os ataques virais, favorecendo o estabelecimento de um estado antiviral na célula infectada (AKIRA et. al., 2006). Este tipo de imunidade é amplamente baseado na síntese e secreção de IFNs pelas células infectadas, os quais atuam de maneira autócrina e parácrina no estabelecimento de um estado antiviral (BROMBERG, 2002; CALÒ et al., 2003; CHAWLA-SARKAR, 2003; BRAND et al., 2005). A Imunidade inata atua principalmente nas inflamações/infecções agudas, mas também permite a ativação da imunidade adaptativa (AKIRA et. al., 2006). A imunidade intrínseca é uma subclasse de imunidade inata caracterizada pela expressão de genes responsáveis pela supressão viral de modo específico, direto e imediato (BIENIASZ, et al., 2004; YAN et al., 2012). Do ponto de vista mecânico é a imunidade mediada por fatores celulares cuja a expressão/produção é induzida por IFNs. Tais fatores celulares são capazes de se ligarem e/ou inibirem a atuação dos componentes virais.

Os IFNs foram descobertos por Isaacs e Lindemann em 1957, por suas propriedades antivirais (ISAACS and LINDEMANN, 1957). Os IFNs foram classificados em três grupos, IFN tipo I (IFN-I), tipo II (IFN-II) e tipo III (IFN-III), os quais são antigenicamente distintos. Esta classificação foi feita com base em sequências de aminoácidos dos IFNs e pelo seu reconhecimento por receptores específicos (ANK et al., 2006). Nos mamíferos, o IFN-I é uma família multigénica com pelo menos oito subtipos (PESTKA et al., 2004). IFN-II é representado apenas por IFN- $\gamma$  e não está implicado diretamente na atividade antiviral, mas é um importante imunomodulador (SCHOENBORN e WILSON, 2007). Em 2003, uma nova família de IFNs foi descoberta, IFN-III ou IFN- $\lambda$  (KOTENKO et al., 2003; SHEPPARD et al., 2003).

As respostas desencadeadas por IFN-I e IFN-III representam as primeiras barreiras a serem vencidas por vírus. Mamíferos, em especial, desenvolveram mecanismos sofisticados de defesa antiviral baseados na detecção de produtos virais, principalmente, o DNA ou RNA viral, que irão atuar como padrões moleculares associados a patógenos PAMPs (do inglês, Pathogen-Associated Molecular Patterns). Esses mecanismos podem envolver receptores presentes (PRRs) na superfície, no citoplasma e nos endossomos celulares, como TLR3/7/8 de macrófagos e células

## 1.INTRODUÇÃO

---

dendríticas (BLAUSIUS e BEUTLER, 2010), ou proteínas citoplasmáticas, como 2'5'-OAS/RNaseL, PKR, MDA-5 e RIG-I em células epiteliais (LOO e GALE, 2011), que contribuem para a ativação de fatores de transcrição, em especial NF- $\kappa$ B, IRF3 e IRF7, que levam à produção de IFNs (CHELBI-ALIX e WIETZERBIN, 2007; GARCÍA-SASTRE, A., 2011) (FIGURA 4).

A maquinaria celular de vertebrados, após a sensibilização celular por IFNs, é capaz de induzir a expressão de uma série de genes (>300 genes) por meio da ativação da via JAK/STAT (BROMBERG, 2002; CALÒ et al., 2003; CHAWLA-SARKAR, 2003; BRAND et al., 2005). Nesta via, a ligação de IFNs do tipo I e III aos receptores formados pelas proteínas IFNAR1/IFNAR2 e IL-10R2/IFNLR1, respectivamente, leva à fosforilação e interação de STAT1 e STAT2, entre outras. O heterodímero formado interage fisicamente com IRF9, formando o complexo conhecido como ISG3, que, através da interação com o elemento ISRE no DNA, promove a expressão de *MX1* e de outros genes importantes para a resposta de imunidade inata a vírus (AARONSON, 2002; ESPERT, L. et al., 2005; UZÉ e MONNERON, 2007; SADLER e WILLIAMS, 2008).

A Figura 4 traz um esquema representativo de como células epiteliais, após a detecção de PAMPs virais, ativam os fatores de transcrição responsáveis pela produção de IFNs e, também, o modo como os IFNs, tipo I e III, atuam paracrinamente sobre as células, ativando a expressão de novos genes que produzirão proteínas com atividade antiviral ou com capacidade de intensificar a ação dos IFNs, por via autócrina.

Assim, os IFN-I e IFN-III são responsáveis pela produção de proteínas que desencadeiam mecanismos de defesa celular a vírus, tais como: 1- MxA, cuja função e mecanismos de ação serão discutidos a seguir; 2- 2',5' oligoadenilato sintetase (2'5'-OAS), que é ativada a partir da interação com dsRNA, assumindo sua conformação tetramérica final e levando à formação de uma série de curtos fragmentos de 2',5'-Oligoadelinatos, capazes de induzir a dimerização e ativação de RNaseL e, conseqüentemente, a degradação de dsRNAs virais (SADLER e WILLIAMS, 2008; GARCÍA-SASTRE, 2011) e 3- proteína quinase dependente de dsRNA (PKR), ativada por dsRNAs virais, a qual leva à inibição da tradução celular pela fosforilação de eIF2 $\alpha$  (WILLIAMS, 1999). Ainda, a ativação da via JAK/STAT leva a uma maior produção dos fatores de transcrição necessários para ativação da transcrição dos genes codificadores para IFNs, entre eles o fator regulatório de IFNs 7 (IRF7 – Interferon

## 1.INTRODUÇÃO

---

regulatory fator), e, conseqüentemente, a amplificação da resposta inicial de forma autócrina (HALLER et al., 2007a; GARCÍA-SATRE, 2011).

Como mediadoras da resposta imune inata desencadeada por IFNs, foi demonstrada a capacidade das proteínas Mx de inibir a replicação viral em diferentes etapas do ciclo pós-infecção (PAVLOVIC et al., 1992; MIBAYASHI et al., 2002). A proteína MxA confere resistência a diversos vírus que pertencem a diferentes famílias, tais como: Orthomyxoviridae, Rhabdoviridae, Togaviridae e todos os membros da família Bunyaviridae (orthobunyavirus, hantavírus, phlebovírus) (PAVLOVIC et al., 1999; ANDERSSON et al., 2004). Outros vírus, tais como vírus coxsackie B (família Picornaviridae) e o vírus da hepatite B (família Hepadnaviridae) também são sensíveis à atividade antiviral de MxA (CHIEUX et al., 2001 e GORDIEN et al., 2001). Recentemente, foi descrito um papel para a proteína MxB humana na atividade antiviral contra o Vírus de Imunodeficiência Humana (HIV-1), a qual promove a redução na taxa de integração do DNA viral ao DNA humano (GOUJON et al., 2013; LIU et al., 2013).

A proteína Mx1 de camundongos, a qual é encontrada na forma de grânulos nucleares, é capaz de inibir a síntese de RNAs de vírus cujo o processo de replicação ocorre no núcleo, como por exemplo o vírus da influenza A. O mesmo foi observado para a proteína MxA humana, de localização citoplasmática, para os vírus cujo o processo de replicação se dá no citoplasma celular, como por exemplo o Vírus da Estomatite Vesicular (VSV, Vesicular Stomatitis Virus) (PAVLOVIC et al., 1992). Porém, MxA humana também apresenta atividade antiviral contra vírus de replicação nuclear (HALLER et al., 2007b; HALLER et al., 2007c). Neste caso, foi demonstrado que MxA não é capaz de inibir a síntese de RNAs virais, mas inibe indiretamente a multiplicação do genoma viral e a síntese de proteínas virais e celulares pela ativação do processo apoptótico (PAVLOVIC et al., 1992; MIBAYASHI et al., 2002).

Ainda, sobre os mecanismos antivirais de MxA, foi proposto que monômeros de MxA, ao encontrarem com ribonucleoproteínas virais (vRNPs) originadas do processo de infecção ou recém sintetizadas, sofrem oligomerização sobre estas vRNPs, fixando-as na região perinuclear, junto às membranas do retículo endoplasmático, impedindo a ligação dos fatores necessários para a replicação citoplasmática ou para a sua translocação nuclear. As vRNPs fixadas ao retículo endoplasmático seriam, posteriormente, degradadas (HALLER et al., 2007b; HALLER et al., 2007c; HALLER et al., 2010). Desta forma, para o vírus da Influenza A, a oligomerização de MxA é indispensável para a atividade antiviral.

## 1.INTRODUÇÃO

---

Foi demonstrado também que MxA exibe a capacidade de inibir a síntese de proteínas virais e celulares e assim promover o processo apoptótico (MIBAYASHI et al., 2002). Neste sentido, foi proposto que MxA é capaz de induzir a apoptose celular por diferentes mecanismos dependendo do estímulo fornecido. Assim, células estáveis para a produção de MxA, quando expostas à radiação UV, apresentam uma aceleração da indução da morte celular por apoptose de modo dependente da participação de proteínas caspases. Em contrapartida, quando submetidas à infecção viral, as mesmas células usariam vias dependentes e independentes de caspases para induzir a morte celular. Além disso, foi demonstrado que a presença do domínio GTPase, mas não a ligação e/ou hidrólise de GTP, é indispensável para tal atividade (NUMAJIRI et al., 2006). Mais recentemente, esse mesmo grupo mostrou que MxA apresenta a capacidade de acelerar a morte celular desencadeada por estresse do retículo endoplasmático (NUMAJIRI et al., 2011). Neste estudo, foi demonstrado que células expressando MxA, quando infectadas pelo vírus Influenza A, apresentam uma maior expressão dos genes BiP e CHOP, ambos relacionados aos mecanismos de resposta ao acúmulo de proteínas sem a conformação correta (UPR, Unfolded Protein Response), além de demonstrarem que MxA é capaz de interagir com BiP e que a superexpressão deste é capaz de inibir a resposta causada por MxA.

A Tabela 1 apresenta um resumo das principais isoformas de proteínas Mx encontradas em vertebrados, a sua localização celular e atividade antiviral relatada. Na Tabela 1 também é relatado o tipo de material genético encontrado em cada vírus e seu local de replicação. Como pode ser observado, a proteína citoplasmática MxA de humanos é capaz de inibir vírus com replicação nuclear e citoplasmática, o que não ocorre em nenhum outro organismo testado até o momento, onde a inibição ocorre exclusivamente no compartimento celular onde a proteína se encontra.

### **1.4. Associação de MxA com câncer e outras doenças humanas**

Vários estudos associaram a alteração da expressão do gene *MX1* de humanos com neoplasias. Neste sentido, foi descrito que a região promotora do gene *MX1* se encontra metilada em carcinoma de células de leucemia mieloide aguda (DESMOND et al., 2007), e que seu silenciamento está associado à progressão do câncer e ao fenótipo de imortalização em células tumorais (KULAEVA et al., 2003; NOSER, 2007). Além disso, o gene *MX1* é pouco expresso em carcinoma de próstata, onde sua expressão foi ligada à inibição do fenótipo de motilidade e da invasão celular (SCHULZ

## 1.INTRODUÇÃO

---

et al., 2007; MUSHINSKI et al., 2009). Recentemente, foi demonstrado pelo nosso grupo que o gene *MX1* está silenciado por metilação em carcinoma de cabeça e pescoço (CALMON et al., 2009).

Em outras doenças, foi demonstrado que o aumento nos níveis de expressão de *MX1* confere uma maior sensibilidade à morte celular induzida por Fas/FasL, irradiação UV e infecção viral (MIBAYASHI et al., 2002). Ainda, a superexpressão de *MX1* em células de alguns dos grupos de complementação da Anemia Fanconi está relacionada ao fenótipo característico de indução de morte celular na medula óssea (LI e YOUSSEF, 1997). Esses dados sugerem uma íntima associação das proteínas Mx com a apoptose. Assim, o bloqueio ou a baixa expressão do gene *MX1*, como ocorre em diversos tipos de câncer, poderia contribuir para a perpetuação do processo neoplásico pela não intensificação da apoptose.

### 1.5. A proteína MxA e seus ligantes celulares

Recentemente, nosso grupo realizou um rastreamento de duplo-híbrido com a proteína MxA, visando elucidar o papel do silenciamento gênico causado pela hipermetilação do promotor de seu gene no desenvolvimento e progressão de carcinomas de cabeça e pescoço (CALMON et al., 2009). Neste caso, o ensaio de duplo-híbrido foi empregado para rastrear possíveis novos ligantes de MxA utilizando uma biblioteca de cDNAs de cérebro fetal humano (BRANTIS-DE-CARVALHO et al., 2011). Após as etapas de rastreamento, confirmação das interações e remoção de falsos negativos, foram identificados 27 ligantes prováveis de MxA.

A análise de ontologia genética mostrou que esses ligantes estão principalmente envolvidos nos processos de regulação da transcrição, da apoptose, controle do ciclo celular e resposta ao estímulo por danos ao DNA, com destaque para fatores envolvidos na SUMOilação de proteínas (Figura 5). Ainda, foram encontradas proteínas constituintes de PML-NBs (Promyelocytic Leukaemia Protein-Nuclear Bodies). Interessantemente, a análise ontológica das proteínas ligantes de MxA é semelhante à obtida para Mx1 de camundongos, independente da diferença de localização celular destas duas proteínas (ENGELHARDT et al., 2001; TROST et al., 2000).

Ainda, foi revelado nesse rastreamento de duplo-híbrido com a proteína Mx1 de camundongos a sua interação com proteínas constituintes dos corpúsculos nucleares PML-NBs, entre elas DAXX, SP100, TOPORS, BLM, TDG, FLASH, PIAS1 e as proteínas da maquinaria de SUMOilação de proteínas Uba2 e SUMO1 (ENGELHARDT

## 1.INTRODUÇÃO

---

et al., 2001). De forma semelhante, foi mostrado que MxA interage com SUMO1, Uba2 e PKM/HIPK2 (TROST et al., 2000, ENGELHARDT et al., 2003).

Ainda, várias proteínas ligantes de MxA foram identificadas pelas mais diversas técnicas (LUSSIER et al., 2005; NUMAJIRI et al., 2006b; ENGELHARDT et al., 2001; TROST et al., 2000). Neste aspecto, foi demonstrada a interação física, por duplo-híbrido e *in vitro*, entre MxA humana e proteínas da família TRPC (do inglês, *Transient receptor potential channel*) (LUSSIER et al., 2005). Foi demonstrado ainda que a superexpressão concomitantemente de MxA e TRPC6, em células HEK293T, leva ao aumento da atividade de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células. Desta forma, MxA seria uma nova proteína envolvida nos mecanismos de controle das funções celulares atribuídas a íons cálcio, como diferenciação, controle do ciclo celular e apoptose.

Adicionalmente à identificação destas interações, foi demonstrado que oligômeros da proteína Mx1 de camundongos agrupam-se em grânulos distintos, porém em íntimo contato com os grânulos PML-NBs e podem ser visualizados mesmo em células depletadas da proteína PML (HALLER et al., 2007a). Assim, a presença de Mx1 em PML-NBs e a formação de grânulos de Mx1 podem estar relacionadas à estruturação de PML-NBs, uma vez que Mx1 é capaz de se ligar a uma série de componentes deste corpúsculo.

Assim como as proteínas Mx, muitas das proteínas envolvidas na formação dos PML-NBs são transcricionalmente induzidas por IFN-I e IFN-III. Tal fato é observado com as proteínas PML e SP100, entre outras, o que aponta para a possibilidade da atuação conjunta destas proteínas no desenvolvimento das respostas antivirais desencadeadas por IFNs, uma vez que PML e demais proteínas associadas aos PML-NBs participam de mecanismos primários e secundários na defesa celular a infecções virais (HALLER et al., 2007a; DIANOUX et al., 2008; GARCÍA-SASTRE, A., 2011).

Vários dos componentes dos PML-NBs sofrem modificação por SUMO1 ou interagem fisicamente com proteínas SUMOiladas por meio da sequência de interação com SUMO1 (SIM – do inglês, *SUMO-interacting motif*), como exemplo a proteína DAXX. Outro fator interessante é a dependência da tripla SUMOilação e da presença da sequência SIM em PML, permitindo a interação física com os outros constituintes deste corpúsculo e, conseqüentemente, a formação de PML-NBs. Tais corpúsculos estão envolvidos em uma série de processos celulares tais como apoptose, controle de expressão gênica, mecanismos de reparo do DNA e resistência a vírus, o que demonstra a importância da SUMOilação de proteínas e da formação dos PML-NBs no

## 1.INTRODUÇÃO

---

controle destes processos (LIN, 2006; BERNARDI et al., 2007; HALLER et al., 2007a; KRIEGHOFF-HENNING e HOFMANN, 2008).

A SUMOilação é uma modificação pós-traducional que se utiliza das proteínas SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier). Essas proteínas pertencem a família das UBLs (do inglês, Ubiquitin-like proteins) devido a sua similariedade estrutural com a proteína ubiquitina, embora apresentem uma baixa percentagem de identidade de sequência (18% a 58%) (HOSCHSTRASSER, 2009). A Figura 6A apresenta as estruturas terciárias das proteínas ubiquitina e SUMO2, com destaque para as regiões de maior conservação estrutural e para as lisinas envolvidas nos processos de poli-ubiquitinação e poli-SUMOilação. Ainda, as interfaces de interação entre Ubiquitina e UIM (Ubiquitin-interacting motif) e entre SUMO2 e SIM são apresentadas na Figura 6A.

As proteínas SUMO estão presentes em todos os organismos eucariotos, sugerindo papéis funcionais sujeitos à pressão evolutiva (KOTAJA *et al.*, 2002). O genoma dos vertebrados contém quatro genes designados SUMO. Estes genes codificam para as proteínas SUMO1, SUMO2 e SUMO3, que estão presentes em todos os tipos celulares, e SUMO4 que é encontrado principalmente nos linfonodos, baço e rins (BOHREN et al., 2004). SUMO 2 e 3 apresentam 86% de indentidade de sequência enquanto que a identidade entre SUMO1 e SUMO2/3/4 é de apenas 41% (Figura 6B) (JOHNSON, 2004). A Tabela 2 apresenta um resumo dos principais modificadores semelhantes a ubiquitina identificados até o momento. Tais modificadores apresentam certa semelhança na cadeia de aminoácidos e nas etapas enzimáticas envolvidas na sua ligação à proteína alvo da modificação, porém diferem quanto as enzimas envolvidas no processo de modificação e na função exercida.

A proteína SUMO1 foi inicialmente identificada há aproximadamente duas décadas (MAHAJAN et al., 1997). Esta descoberta foi relatada, simultaneamente, por grupos diferentes que atribuíram diferentes nomes a SUMO1, a saber: PIC1 (do inglês, PML-Interacting Clone 1) (BODDY et al., 1996), UBL1 (do inglês, Ubiquitin-Like 1) (SHEN et al., 1996), Sentrin (OKURA et al., 1996) e GMP1 (do inglês, Gap-Modifying Protein 1) (MATUNIS et al., 1996). Coincidentemente, todas as descrições partiram de rastreamentos de duplo-híbrido mostrando a interação de SUMO com as proteínas PML, Rad51/52 e FAS/APO1. Também foi neste momento que ocorreu a detecção da primeira ligação covalente de SUMO (MATUNIS et al., 1996). Assim, foi descrito, que SUMO1 ligava-se de forma covalente a proteína RanGAP1 (do inglês, Ran GTPase-activating protein), uma proteína ativadora de GTPases importante na translocação

## 1.INTRODUÇÃO

---

nuclear, sendo esta modificação necessária para RanGAP se localizar ao nível dos complexos do poro nuclear. As proteínas SUMO2, 3 e 4 foram identificados logo após, assim como, as enzimas envolvidas no processo de ligação covalente à proteína alvo.

A via de modificação pelas proteínas SUMO inicia-se pela expressão de SUMO1 e seus parálogos SUMO2, SUMO3 e SUMO4, na forma de um proteína precursora, a qual é processada para expor a sequência de aminoácidos FQxxTGG em sua porção C-terminal. Tal processamento enzimático é necessário para sua correta ativação e conjugação. Os resíduos de glicina desta região, equivalentes aos de ISG15 e Ubiquitina, são adenilados e conjugados por meio de ligações tioéster a resíduos de cisteína de duas enzimas: 1- uma enzima de ativação de SUMO, formada pelo heterodímero Aos1/Uba2 (E1-ativação) e 2- uma enzima de conjugação denominada Ubc9 (E2-conjugase). Além destas, algumas proteínas apresentam a capacidade de catalisar e determinar a especificidade da SUMOilação, sem que sejam ligadas a SUMO por meio de cisteínas. Essas proteínas são conhecidas como enzimas de ligação (E3-ligases) e portam em sua estrutura um domínio dominado RING. Por fim, a proteína SUMO, ligada a Ubc9 (E2-conjugase), é transferida para um resíduo de lisina na proteína alvo. Este processo é reversível pela atuação de proteases SUMO-específicas denominadas SENP ou Ulp.

Ainda, a formação de cadeias de poliSUMO foram descritas para as proteínas SUMO2 e SUMO3, as quais apresentam sequências consenso de SUMOilação. Já SUMO1 não é capaz de formar tais cadeias e atua como terminador da poliSUMOilação. Todas essas enzimas modificadoras contêm alta homologia de sequência e estrutura com as enzimas envolvidas na via de Ubiquitinação e ISGilação (MEULMEESTER e MELCHIOR, 2008; YUAN e KRUG, 2001; ZHAO *et al*, 2004; ZHAO *et al.*, 2005; SADLER e WILLIAMS, 2008; PRAEFCKE *et al.*, 2012). A Figura 7A apresenta de forma esquemática as etapas da SUMOilação de proteínas.

A SUMOilação de proteínas ainda pode ser predita pela presença de sequências consenso para SUMOilação, a qual, assim como para Ubiquitina e ISG15, envolvem a presença de uma lisina aceptora normalmente seguida de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e carregados negativamente. A sequência consenso para SUMOilação é:  $\Psi KxE/D$ , onde  $\Psi$  é um aminoácido hidrofóbico, K é a lisina aceptora, x é qualquer aminoácido e E/D é um resíduo de glutamato ou aspartato. Porém, com o avanço no conhecimento desta via de modificação pós-traducional, novas sequências consenso foram reveladas (MEULMEESTER e MELCHIOR, 2008; JÜRGEN DOHMEN, 2004; DA

## 1.INTRODUÇÃO

---

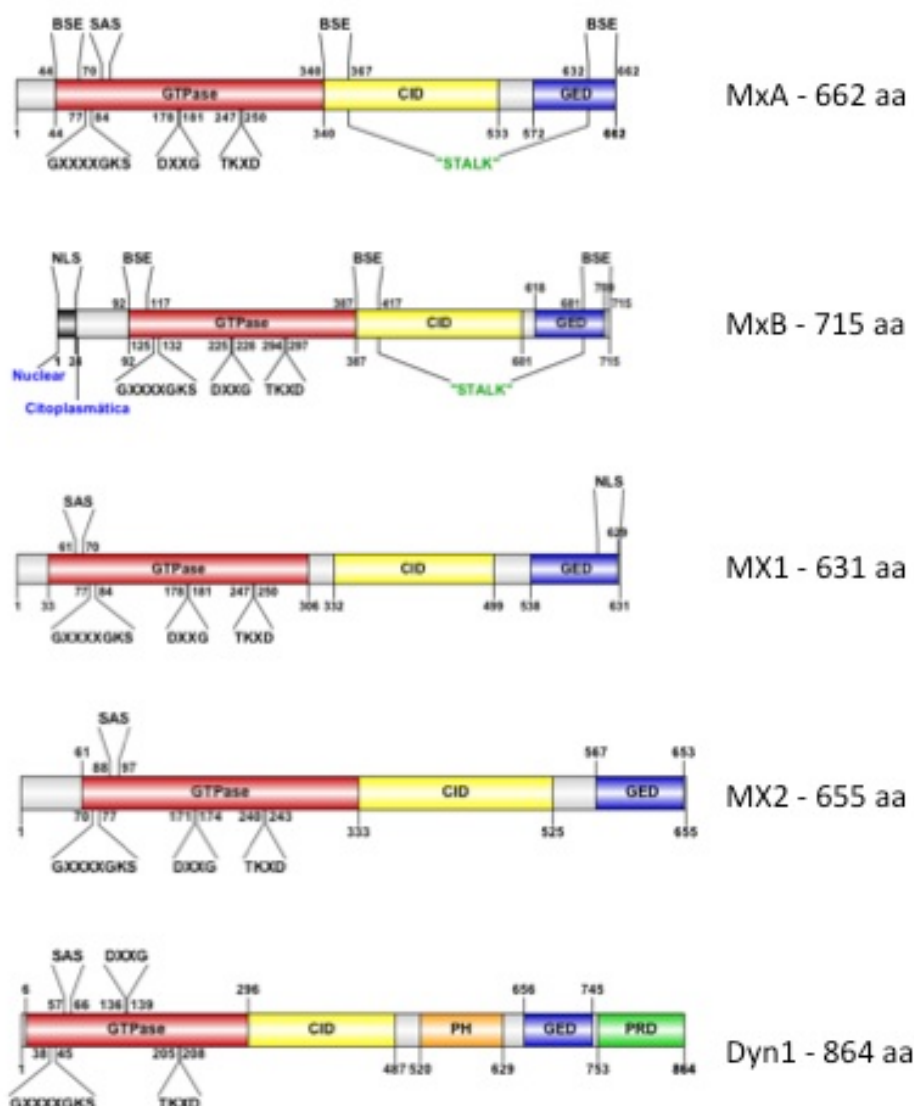
SILVA-FERRADA et al., 2012; PRAEFCKE et al., 2012). As Figuras 7B e 7C apresentam, respectivamente, as diferentes sequências consenso para SUMOilação e a prevalência de resíduos de aminoácidos adjacentes à lisina alvo da modificação.

Ainda, SUMO apresenta a capacidade de interagir fisicamente com proteínas portadoras de sequência de interação a SUMO (SIM). Assim, de forma bastante clara, estão definidas três sequências principais de interação física às proteínas SUMO, a saber: SIMa ( $\Psi\Psi x \Psi Ac Ac Ac Ac$ ), SIMb ( $\Psi\Psi DLT$ ) e SIMr ( $Ac Ac Ac Ac Ac \Psi x \Psi\Psi$ ), onde  $\Psi$  é um aminoácido hidrofóbico,  $x$  é qualquer resíduo de aminoácido e  $Ac$  é um resíduo de aminoácido ácido ou um resíduo de serina fosforilado (Figura 7D) (PRAEFCKE et al., 2012).

A SUMOilação pode afetar a localização celular, as interações entre proteínas, a estabilidade proteica e a atividade das proteínas alvo. Em um nível molecular, estas variáveis podem ocorrer por três mecanismos diferentes: 1 - a SUMOilação pode esconder sítios de interação na proteína alvo, inibindo a interação entre esta e seus parceiros físicos; 2 - a SUMOilação pode criar novos sítios de ligação na proteína alvo e assim facilitar a ligação de outras moléculas, como proteínas e DNA e 3 - se a proteína alvo também contiver uma sequência de interação física a SUMO (SIM), isto pode levar à mudança em sua conformação e, conseqüentemente, em sua atividade (MEULMEESTER e MELCHIOR, 2008).

Embora muitos dos ligantes encontrados para a proteína MxA estejam relacionados à via de modificação pós-traducional por SUMO, não há descrição na literatura se as proteínas Mx são SUMOiladas ou atuam diretamente na função desta via. Assim, o entendimento de como MxA se relaciona com seus parceiros físicos revelados por duplo-híbrido contribuirá significativamente para a elucidação do seu papel no controle da proliferação celular e no controle das infecções virais.

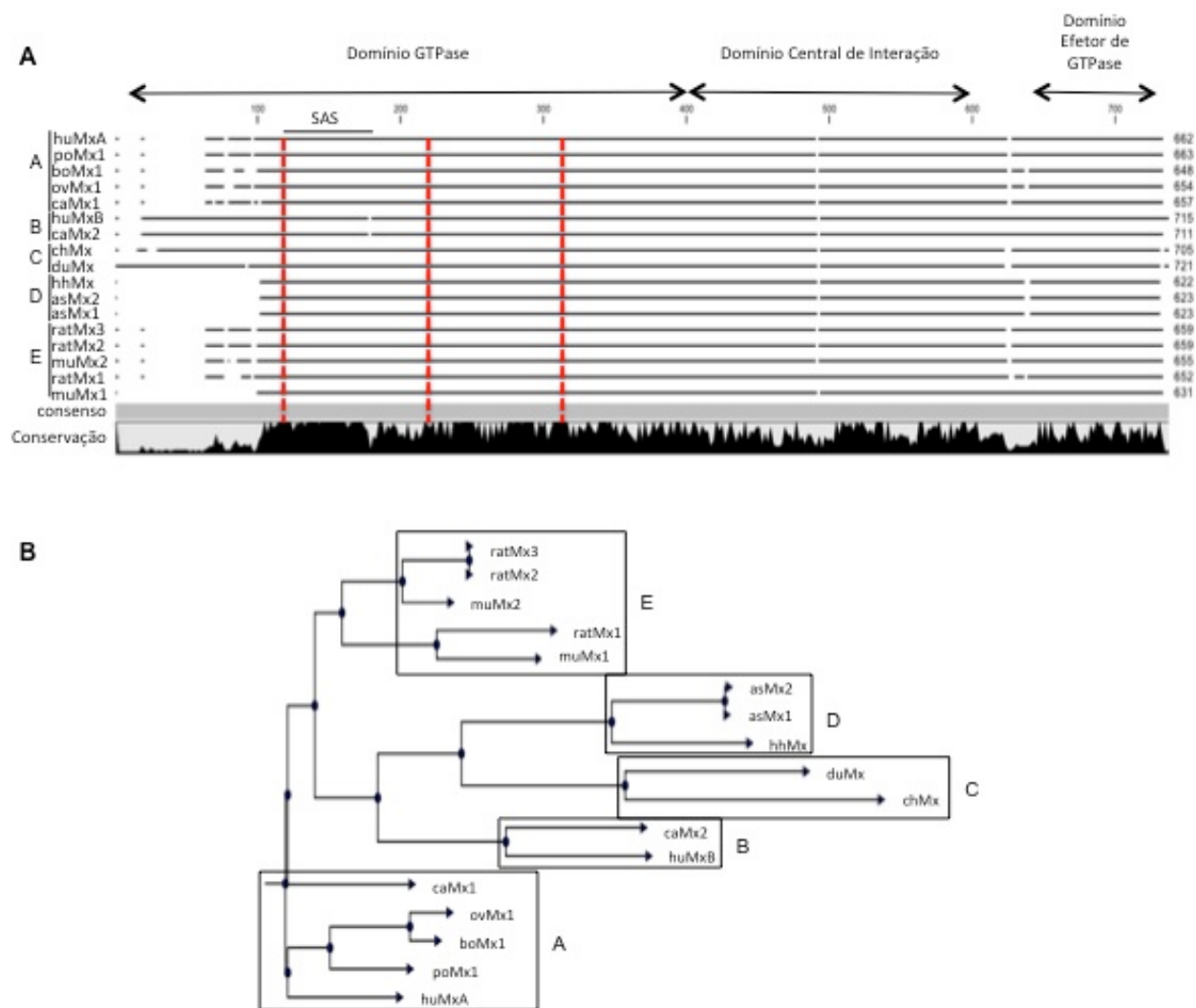
## 1.INTRODUÇÃO



**FIGURA 1. Esquema da organização estrutural da proteína MxA de humanos e de outros membros da superfamília de GTPases dinamina.**

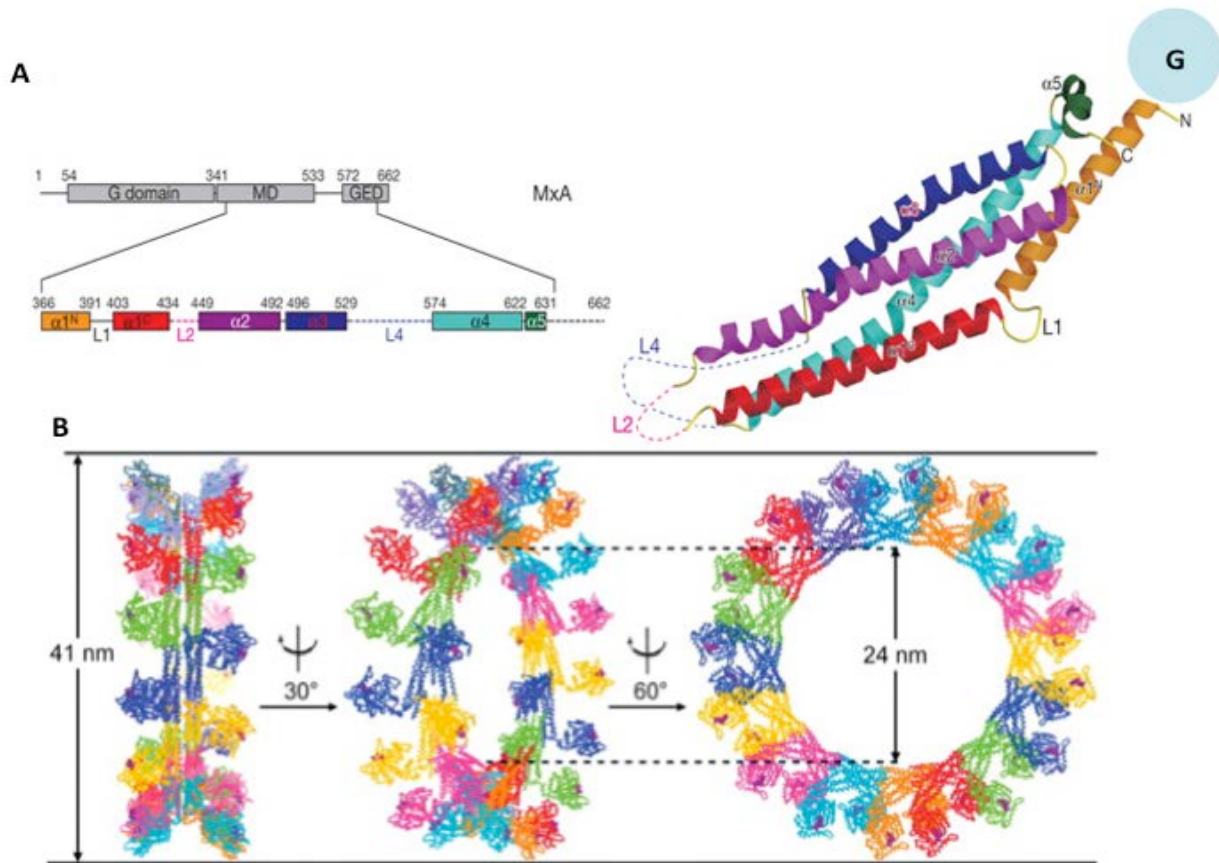
Comparação da organização estrutural das proteínas MxA e MxB de humanos, Mx1 e Mx2 de camundongos e Dinamina-1 de humanos (Dyn1). Os domínios em comum são: (i) domínio GTPase (vermelho), que contém as sequências de ligação ao GTP (GXXXXGKS, DXXG e TKXD), assim como a sequência de auto-associação (SAS), (ii) domínio central de interação (CID, amarelo) e (iii) domínio efetor de GTPase (GED, azul), o qual forma um zipper de leucina. Os domínios CID e GED são responsáveis pela formação de uma estrutura terciária denominada *stalk* apresentada nos esquemas das proteínas MxA e MxB. A proteína MxB apresenta um sítio de início de tradução alternativo que leva a produção da isoforma citoplasmática da proteína. As regiões BSE (do inglês, Bundle Signalling Element) formam a região intermediária entre os domínio GTPase e o *Stalk* de MxA na estrutura terciária da proteína. O sinal de localização nuclear (NLS) está presente nas proteínas MxB e Mx1. Os domínios específicos de Dinamina-1 são: domínio pleckstrina (PH, laranja) e domínio rico em prolina (PRD, verde). (Adaptada e atualizada de HALLER et al., 2007b).

# 1.INTRODUÇÃO



**FIGURA 2. Comparação de proteínas Mx de diferentes organismos vertebrados.**

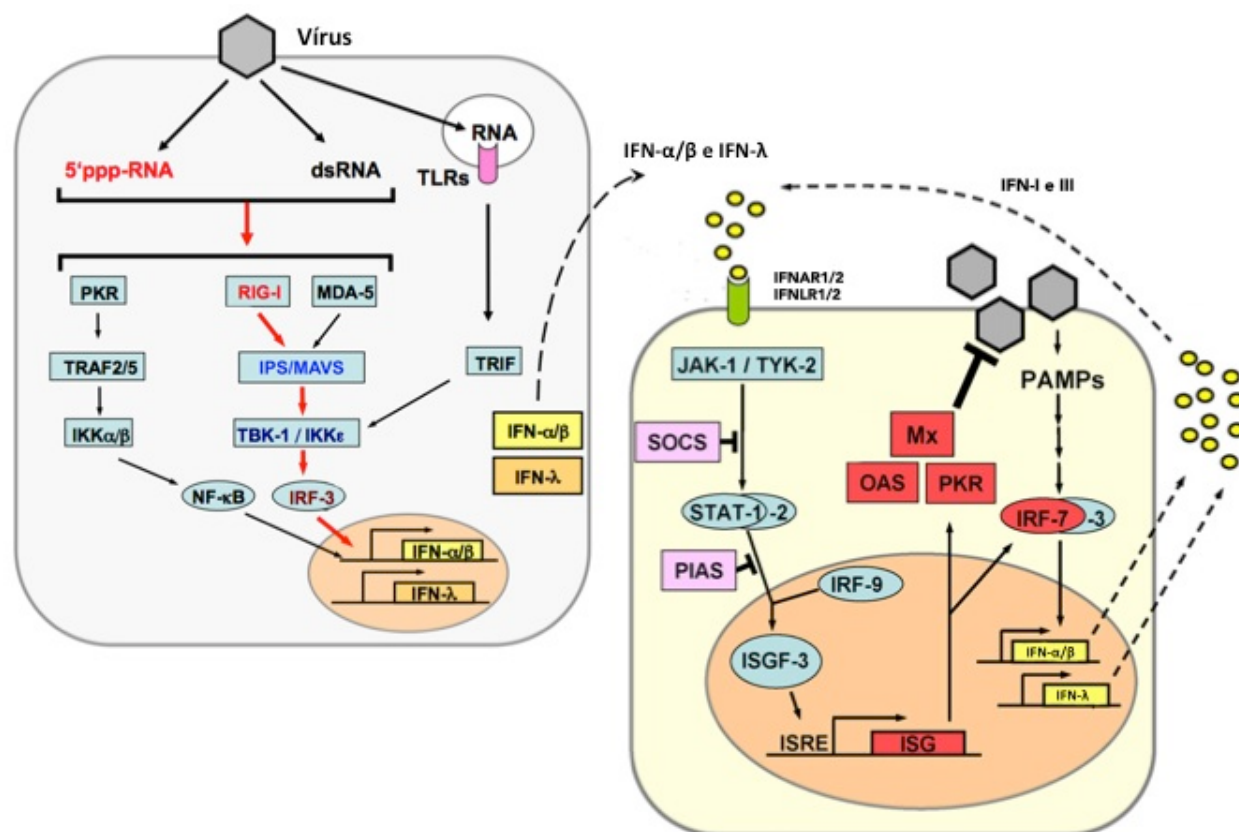
**A.** Alinhamento múltiplo de sequências de proteínas Mx de diferentes vertebrados. Os domínios GTPase, CID e GED, bem como os sítios de ligação de GTP e a sequência de auto-associação (SAS) foram definidos seguindo sua posição relativa ao polipeptídeo de huMxA. Esse alinhamento aponta para uma maior conservação da região N-terminal desta proteína, sendo a conservação mais expressiva na região das sequências indispensáveis à ligação da molécula de GTP (barras vermelhas) e na região necessária para a interação entre os domínios GTPase de proteínas Mx adjacentes (sequência de auto-associação - SAS). **B.** Árvore filogenética das proteínas Mx de diferentes vertebrados. A análise da árvore filogenética das proteínas Mx mostra que estas proteínas podem ser agrupadas em cinco grupos distintos, a saber: 1 - semelhantes a MxA (A); 2 – semelhante a MxB (B); 3- Mx de aves (C); 4 – Mx de peixes (D) e 5 – Mx de roedores (E). Sequências utilizadas no alinhamento e, posterior, confecção da árvore filogenética: Mx de humanos: MxA (huMxA, A33481) e MxB (huMxB, B33481); Mx de cães: Mx1 (caMx1, AAF44684) e Mx2 (caMx2, AAF44685); Mx1 de porcos (poMx1, P27594); Mx1 de bovinos (boMx1, P79135); Mx de ovinos (ovMx, P33237); Mx de camundongos: Mx1 (muMx1, NP\_034976) e Mx2 (muMx2, NP\_038634); Mx de ratos: Mx1 (ratMx1, P18588), Mx2 (ratMx2, P18589) e Mx3 ratos (ratMx3, P18590); Mx de galinhas (chMx, Q90597); Mx de patos (duMx, P33238); Mx de salmão do atlântico: Mx1 (asMx1, AAB40994), Mx2 (asMx2, AAB40995) e Mx3 (asMx3, AAB40996) e Mx de linguado (hhMx, AAF66055). A Figura 2B foi adaptada de HALLER et al., 2007c.



**FIGURA 3. Estrutura da proteína MxA e de seu oligômero.**

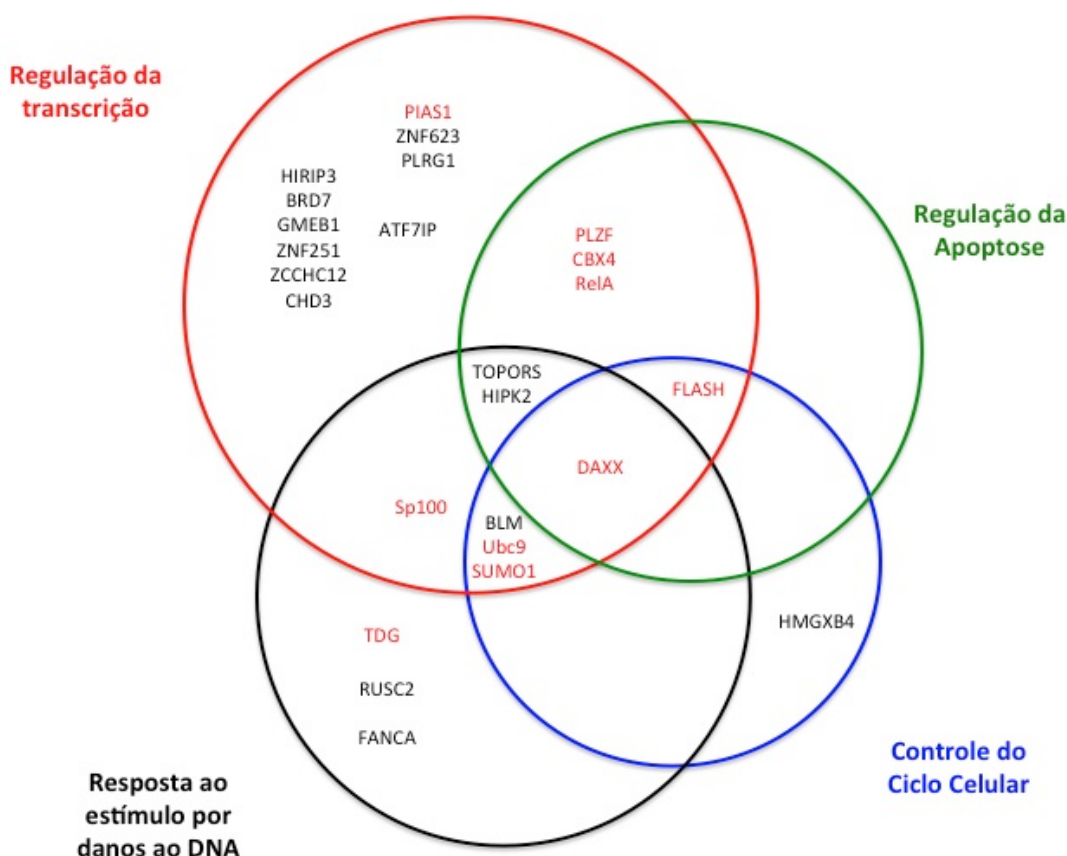
**A.** Representação esquemática dos domínios de MxA e da estrutura terciária da região correspondente aos domínios CID e GED de MxA, denominado de *stalk*. O modelo linear apresenta a região *stalk* de MxA e os resíduos de aminoácidos envolvidos em cada estrutura secundária. As posições das alças e do domínio GTPase (G) estão indicadas na estrutura. **B.** Modelo da estruturação do oligômero de MxA, onde 16 monômeros interagem gerando uma estrutura em anel. A região conhecida como *stalk* está presente no interior da estrutura, sendo a principal responsável pela sua formação, enquanto que o domínio GTPase localiza-se em uma posição mais externa à estrutura formada (Adaptada de HALLER et al., 2007a e HALLER et al., 2011).

## 1.INTRODUÇÃO



**FIGURA 4. Mecanismos de indução da produção de interferons do tipo I e III (IFN-I e IFN-III) por PAMPs e ativação da resposta antiviral, incluindo a produção de MxA.**

As proteínas sentinelas, TLRs, PKR, RIG-I e MDA-5, conhecidas como receptores de padrão de reconhecimento (PRRs), são capazes de reconhecer os padrões moleculares associados a patógenos - PAMPs (dsRNA e ssRNA), presentes no citoplasma celular ou em vesículas endossomais, e iniciar uma cascata sinalizadora que culminará na ativação dos fatores de transcrição NF-κB e IRF3, levando à produção de IFN-I e IFN-III (IFN-α/β e IFN-λ) que atuam de forma parácrina e, posteriormente, também autócrina. Os IFN-I e IFN-III (IFN-α/β e IFN-λ) ligam-se a seus receptores, presentes na superfície celular, e ativam a expressão de uma série de genes, através da fosforilação consecutiva das proteínas constituintes da via JAK/STAT de sinalização. Os genes induzidos codificam proteínas que atuam nas vias de ação dos IFNs, entre elas, as proteínas Mx, a proteína 2',5'-oligoadenilato sintetase e a proteína quinase dependente de dsRNA, além do fator de transcrição IRF-7 que atua na amplificação do sinal mediado por receptores de PAMPs, entre outros, elevando assim a produção e secreção de IFN pelas células. A sinalização por IFN sofre inibição por *feedback* mediado pelas proteínas das famílias SOCS e PIAS. O caminho indicado em vermelho (setas) representa a cascata de ativação da produção de IFN-I e IFN-III após o reconhecimento de RNAs virais trifosfatados pela proteína RIG-I (Adaptada de HALLER et al., 2007b).



**FIGURA 5. Diagrama de grupos dos ligantes prováveis de MxA de acordo com dados de ontologia genética.**

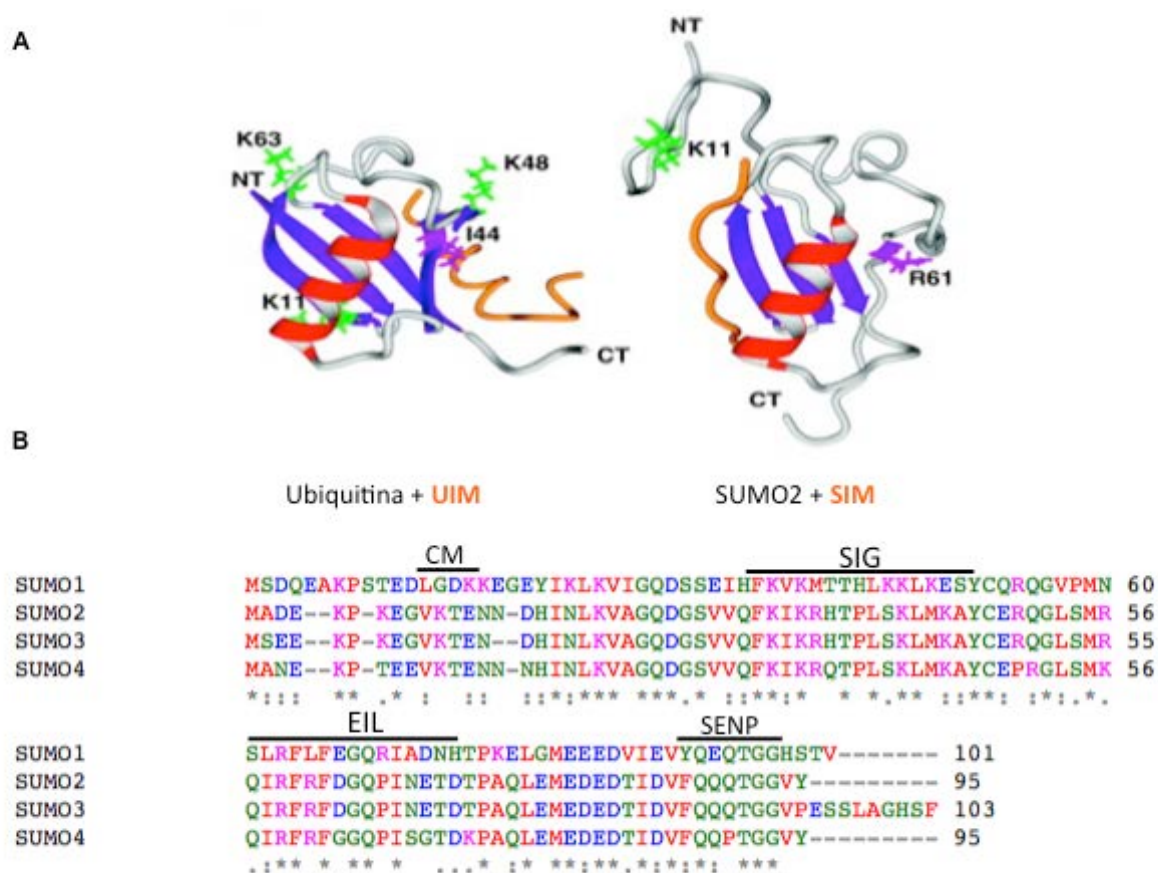
Os prováveis ligantes de MxA estão organizados segundo seu envolvimento com os processos de: 1- Regulação da transcrição (círculo vermelho), 2- Resposta ao estímulo por danos ao DNA (círculo preto), 3- Regulação da apoptose (círculo verde) e 4- Controle do ciclo celular (círculo azul). As regiões de interseção representam os clones envolvidos em mais de um processo. Os genes apresentados em vermelho são proteínas constituintes da maquinaria de SUMOilação (SUMO1 e Ubc9), proteínas que participam da SUMOilação atuando como E3-ligases (CBX4 e PIAS1) ou proteínas SUMOiladas (DAXX, Sp100, FLASH, Ubc9, TDG, PIAS1, RelA, CBX4 e PLZF) (BRANTIS-DE-CARVALHO et al., 2011).

## 1.INTRODUÇÃO

**TABELA 1** – Atividade antiviral das proteínas Mx de diferentes organismos

| Espécie                                    | Proteína | Localização       | Atividade antiviral                | Ácido Nucleico | Replicação |
|--------------------------------------------|----------|-------------------|------------------------------------|----------------|------------|
| Humano<br>Homo sapiens                     | MxA      | Citoplasma        | Influenza A                        | -ssRNA         | Núcleo     |
|                                            |          |                   | Influenza B                        | -ssRNA         | Núcleo     |
|                                            |          |                   | Influenza C                        | -ssRNA         | Núcleo     |
|                                            |          |                   | Thogoto                            | -ssRNA         | Núcleo     |
|                                            |          |                   | Parainfluenza Tipo 3               | -ssRNA         | Citoplasma |
|                                            |          |                   | Febre do Vale Rift                 | -ssRNA         | Citoplasma |
|                                            |          |                   | La Crosse                          | -ssRNA         | Citoplasma |
|                                            |          |                   | Febre hemorrágica<br>Criméia-Congo | -ssRNA         | Citoplasma |
|                                            |          |                   | Hantavírus                         | -ssRNA         | Citoplasma |
|                                            |          |                   | Estomatite Vesicular               | -ssRNA         | Citoplasma |
|                                            |          |                   | Febre suína africana               | dsDNA          | Citoplasma |
|                                            |          |                   | Hepatite B                         | dsDNA-RT       | Núcleo     |
|                                            |          |                   | Rubeola                            | ssRNA          | Citoplasma |
|                                            |          |                   | Coxsackievírus                     | ssRNA          | Citoplasma |
|                                            |          |                   | Floresta Semliki                   | ssRNA          | Citoplasma |
|                                            |          |                   | Doença Infecciosa Bursal           | ssRNA          | Citoplasma |
|                                            | MxB      | Núcleo/Citoplasma | Imunodeficiência<br>Humana         | ssRNA          | Núcleo     |
| Camundongos<br>Mus<br>musculus             | Mx1      | Núcleo            | Influenza A                        | -ssRNA         | Núcleo     |
|                                            |          |                   | Influenza B                        | -ssRNA         | Núcleo     |
|                                            |          |                   | Thogoto                            | -ssRNA         | Núcleo     |
|                                            | Mx2      | Citoplasma        | Estomatite Vesicular               | -ssRNA         | Citoplasma |
|                                            |          |                   | Hantavírus                         | -ssRNA         | Citoplasma |
| Rato<br>Rattus<br>novergicus               | Mx1      | Núcleo            | Influenza A                        | -ssRNA         | Núcleo     |
|                                            |          |                   | Thogoto                            | -ssRNA         | Núcleo     |
|                                            | Mx2      | Citoplasma        | Estomatite Vesicular               | -ssRNA         | Citoplasma |
|                                            |          |                   | La Crosse                          | -ssRNA         | Citoplasma |
|                                            |          |                   | Febre do Vale Rift                 | -ssRNA         | Citoplasma |
|                                            | Mx3      | Citoplasma        | Não apresenta                      |                |            |
|                                            |          |                   |                                    |                |            |
| Rato do<br>Algodão<br>Sigmodon<br>hispidus | Mx1      | Núcleo            | Influenza A                        | -ssRNA         | Núcleo     |
|                                            | Mx2      | Citoplasma        | Estomatite Vesicular               | -ssRNA         | Citoplasma |
|                                            |          |                   | Febre do Vale Rift                 | -ssRNA         | Citoplasma |

Fonte: adaptada de HALLER et al., 2007b.



**FIGURA 6. Comparação da estrutura de ubiquitina e SUMO2 e alinhamento múltiplo de SUMO1 e seus parálogos SUMO2/3/4.**

**A.** Estrutura terciária da proteína SUMO2 comparada a da proteína ubiquitina. As proteínas semelhantes a ubiquitina apresentam uma baixa identidade entre suas cadeias de aminoácidos e uma grande homologia estrutural. Na Figura encontram-se evidenciadas as regiões UIM (do inglês, Ubiquitin-interacting motif) e SIM (do inglês, SUMO-interacting motif) presentes nas proteínas que interagem fisicamente com ubiquitina e SUMO2, respectivamente (adaptada de PRAEFCKE et al., 2012). As lisinas alvo de poli-ubiquitinação e poli-SUMOilação estão destacadas (verde claro). **B.** Alinhamento das sequências de SUMO1 e seus parálogos funcionais. As formas precursoras de SUMO1 e seus parálogos funcionais SUMO2/3/4 apresentam uma alta homologia de sequência e identidade variada. SUMO1, diferentemente de SUMO2/3/4 não apresenta sequência consenso de SUMOilação (CM, VKTE) para modificação por SUMOilação, assim sendo, não forma cadeia de poliSUMOilação como as demais. Além disso, as duas regiões SIG (SUMO-interacting groove) e EIL (E67-interacting loop) utilizadas pelas proteínas SUMO para estabelecer interação física com seus ligantes estão em destaque. O ponto de clivagem das proteínas SENP (SUMO/Sentrin-specific protease), envolvido na maturação de SUMO1 e seus parálogos, está evidenciado. Entre essas, a capacidade de modificação de outras proteínas somente não foi demonstrada para SUMO4, a única delas a apresentar padrão de expressão restrito a alguns órgãos.

## 1.INTRODUÇÃO

**TABELA 2** - Principais proteínas semelhantes a ubiquitina incluindo suas características e funções

| Ub UBLs    | <i>S. cerevisiae</i> | ID             | Ct  | E1            | E2                         | E3                   | Protease                         | M/P        | Substrato                                              | Função                                                                                          |
|------------|----------------------|----------------|-----|---------------|----------------------------|----------------------|----------------------------------|------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ubiquitina | Ubiquitina           | 100            | SIM | Ube1<br>Uba6  | > 37                       | > 600                | ~ 80                             | M/P        | Milhares                                               | Diversas, mas a principal é degradação                                                          |
| NEDD8      | Rub1                 | 58             | SIM | NAE1-<br>Uba3 | Ubc12<br>(Ube2M),<br>Ube2F | ~10                  | CSN5,<br>NEDP1                   | M/P ?      | Culinas,<br>Supressores de<br>tumor e<br>Oncoproteínas | Regula a Ubiquitinação de proteínas através da modificação de Culinas E3 ligases, ciclo celular |
| FAU        | -                    | 36             | SIM |               |                            |                      |                                  |            | TCRα-like,<br>Bcl-G,<br>Endofilina II                  | Provável fator imunoregulatório                                                                 |
| ISG15      | -                    | 28<br>37       | SIM | Ube1L         | UbcH8,<br>UbcH6            | Herc5                | UBP43                            | M          | Proteínas virais e próprias                            | Atividade antiviral, imunidade inata                                                            |
| FAT10      | -                    | 27<br>36       | NÃO | Uba6          | Use2                       |                      |                                  |            | Use2                                                   | Degradação de proteínas Ubiquitina-independent e                                                |
| Ufm1       | -                    | 23             | SIM | Uba5          | Ufc1                       | Ufl1                 | UfSP1,<br>UfSP2                  |            | C20orf116                                              | regulação do desenvolvimento de eritróide e do megacariócito                                    |
| SUMO1      | Smt3 -               |                |     |               |                            |                      | SEN1-2                           | M          |                                                        |                                                                                                 |
| SUMO2      | -                    | 14<br>13<br>13 | SIM | SAE1-<br>AOS2 | Ubc9                       | ~ 15<br>~ 15<br>~ 15 | SEN1-3,<br>5-7<br>SEN1-3,<br>5-7 | M/P<br>M/P | Centenas                                               | Altera localização, interação e conformação                                                     |
| SUMO3      |                      |                |     |               |                            |                      |                                  |            |                                                        |                                                                                                 |
| SUMO4      | -                    | 12             |     |               |                            |                      |                                  |            |                                                        |                                                                                                 |
| Atg12      | Atg12                | 12             | NÃO | Atg7          | Atg10                      | -                    | -                                | M          | Atg5, Atg3                                             | Autofagia e Homeostase Mitocondrial                                                             |

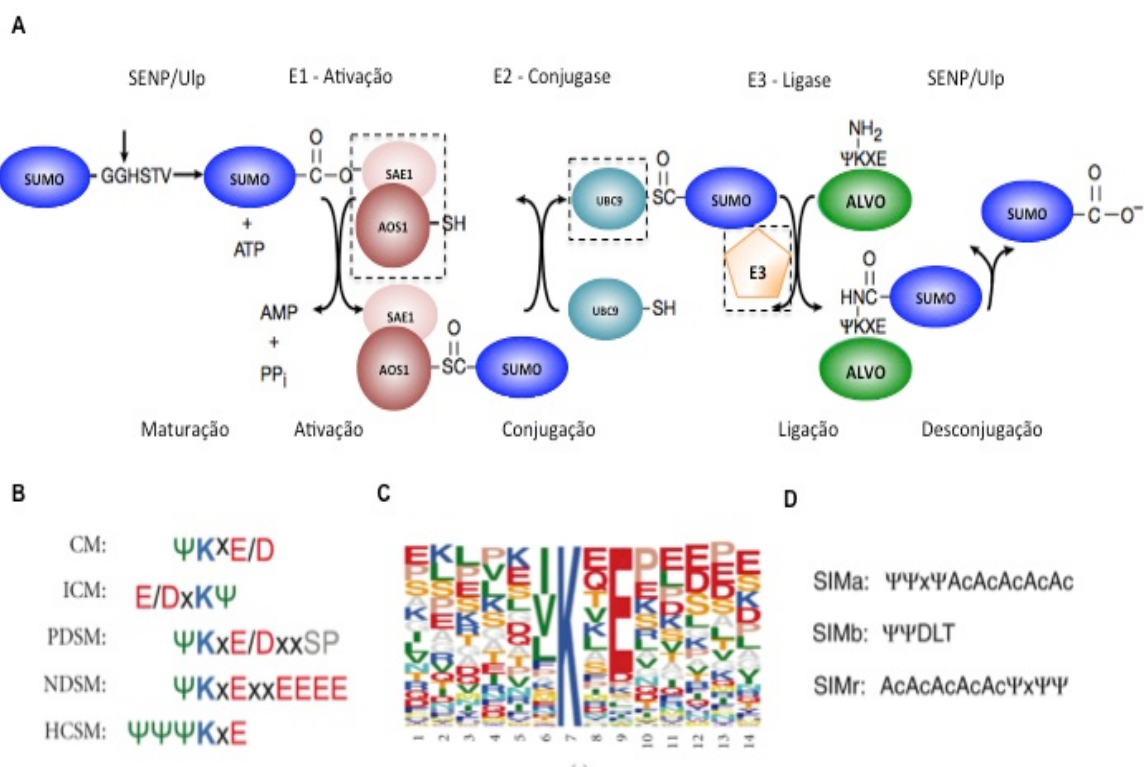
Ub/UBLs = Proteínas semelhante a ubiquitina

ID = Identidade (%)

Ct = processamento do C-terminal

M/P = Monômero/Polímero

Fonte: adaptada de VAN DER VEEN e PLOEGH, 2012.



**A.** SUMOilação de proteínas. Esquema representativo da conjugação e desconjugação da proteína SUMO1 e seus parálogos às proteínas alvo de

SUMOilação. **B.** Diferentes sequências consenso presentes em proteínas alvo de SUMOilação. Sequência Consenso (CM), Sequência Consenso Invertida (ICM), Sequência de SUMOilação dependente de fosforilação (PDSM), Sequência de SUMOilação dependente de aminoácidos carregados negativamente (NDSM) e Sequência de SUMOilação dependente de aminoácidos hidrofóbicos (HCSM). **C.** Representação WebLogo das sequências consenso presentes em proteínas SUMOiladas, depositadas no banco de dados do Phosphosite (<http://www.phosphosite.org/>), mostrando a prevalência dos resíduos de aminoácidos adjacentes ao resíduo de lisina acceptor da SUMOilação. **D.** Sequências consenso de interação física a proteínas SUMO (SIMa, SIMb e SIMr). Nos painéis B. C. e D.,  $\Psi$  é um aminoácido hidrofóbico, K é a lisina acceptora, x é qualquer aminoácido, E é um resíduo de glutamato, D de aspartato, L de leucina, T de treonina e Ac é um resíduo de aminoácido ácido ou um resíduo de serina fosforilada (Adaptada de MEULMEESTER e MELCHIOR, 2008; DA SILVA-FERRADA et al., 2012; PRAEFCKE et al., 2012).

### OBJETIVOS

#### 2.1. Objetivo Geral

Esta tese teve como objetivo geral contribuir para a caracterização funcional de MxA.

#### 2.2. Objetivos específicos

##### 2.2.1. Obtenção de anticorpo policlonal anti-MxA ( $\alpha$ -pMxA).

Devido a dificuldade de se encontrar um anticorpo comercial anti-MxA, foi produzido um anticorpo policlonal em coelhos visando a sua utilização na detecção da proteína MxA nos experimentos aqui apresentados.

##### 2.2.2. Caracterização de parceiros físicos de MxA

Como apresentado na Introdução, durante a realização do nosso projeto de mestrado foram identificados 27 ligantes físicos prováveis de MxA, através de rastreamento de duplo-híbrido. Com o intuito de confirmar as interações físicas encontradas, foram realizados ensaios de co-imunoprecipitação entre MxA e os ligantes relacionados ao processo de SUMOilação, SUMO1 e Ubc9. Os parálogos funcionais de SUMO1, SUMO2 e SUMO3, também foram incluídos no estudo.

##### 2.2.3. Obtenção e caracterização de mutantes de MxA

Como apresentado na Introdução, SUMO1 se vale de sequências consenso para estabelecer ligação covalente (SUMOilação) e ligação física. Assim, softwares de predição foram empregados para a análise da sequência de MxA e mutantes dos possíveis pontos de modificação (ICMs) e interação (SIM) foram obtidos e analisados quanto suas características de estabilidade, oligomerização e localização celular, antes de seu emprego em alguns dos experimentos aqui relacionados. Em adição, o mutante monomérico MxA (MxA<sub>L612K</sub>) também foi obtido e analisado.

##### 2.2.4. Mapeamento dos sítios de interação física entre MxA e SUMO ou Ubc9.

Como apresentado na Introdução, a proteína MxA é estruturalmente organizada em domínio GTPase e domínio central de interação (CID), em sua porção N-terminal, e domínio efetor de GTPase (GED), em sua porção C-terminal (Figura 1). Ainda, os domínios CID e GED coordenam sua homo-oligomerização, levando à formação de grânulos de Mx1.

## 2.OBJETIVOS

---

Para mapear o domínio de interação envolvido na ligação de MxA com os ligantes confirmados por co-imunoprecipitação, foi realizado ensaios de duplo-híbrido com o domínio GTPase e com a combinação dos domínios CID-GED (*stalk*).

O sistema de duplo-híbrido também foi empregado na verificação da interação entre SUMO1 e mutantes das prováveis sequências SIM de interação a SUMO presentes em MxA (MxA<sub>SIMb</sub> e MxA<sub>SIMa</sub>), assim como, na investigação da interação entre MxA com mutantes de SUMO1/2/3 nas sequências SIG (do inglês, SUMO-Interacting Groove) e EIL (E67-Interacting Loop) (SUMO1<sub>K37A/K39A</sub>, SUMO1<sub>E67A</sub>, SUMO2<sub>D71H</sub> e SUMO3<sub>D70H</sub>).

Adicionalmente, o papel da SUMOilação de Ubc9 na interação com MxA foi investigado pela obtenção do mutante Ubc9<sub>K14R</sub>.

### **2.2.5. Avaliação de interação física de MxA dependente de oligomerização**

Como o rastreamento de duplo-híbrido inicial foi realizado com a forma selvagem da proteína MxA, o mutante monomérico MxA<sub>L612K</sub> foi utilizado para verificar se a interação física de MxA com os ligantes confirmados é dependente da oligomerização.

### **2.2.6. Análise da SUMOilação de MxA por SUMO1 ou pelos seus parálogos**

Como apresentado na introdução, ainda não é conhecido se MxA sofre SUMOilação ou se esta proteína participa dessa via de modificação pós-traducional. Desta forma, foi avaliado se a proteína MxA é passível de modificação por SUMO1 ou pelos seus parálogos, SUMO2 e SUMO3.

### **2.2.7. Avaliação da atividade antiviral das formas mutadas de MxA**

Como apresentado na Introdução, a proteína MxA possui atividade antiviral. Dessa forma, o efeito das formas mutadas de MxA sobre a replicação do vírus da estomatite vesicular (VSV) foi investigado. Adicionalmente, foi investigado se a infecção com este vírus poderia afetar a SUMOilação de MxA.

## MATERIAL E MÉTODOS

## 3.1. MATERIAL

Os plasmídeos, as linhagens de leveduras, os oligonucleotídeos e os anticorpos utilizados nesse estudo estão apresentados, respectivamente, nas tabelas 3 a 6.

TABELA 3 – Plasmídeos utilizados neste estudo.

| pSV  | VETOR       | FUSÃO   | INSERTO              | USO*          | ORIGEM                                |
|------|-------------|---------|----------------------|---------------|---------------------------------------|
|      | pCR8        |         |                      | Clonagem      | Invitrogen                            |
| 149  | pACT2       |         |                      | Duplo-Híbrido | (BARTEL E FIELDS, 1995)               |
| 278  | pBTM116-AMP | LexA    | TIF51A               | Duplo-híbrido | (THOMPSON et al., 2003)               |
| 558  | pACT2       | Gal4_AD | Dys1                 | Duplo-Híbrido | (THOMPSON et al., 2003)               |
| 940  | pACT2       | Gal4_AD | Lia1                 | Duplo-Híbrido | (THOMPSON et al., 2003)               |
| 993  | pBTM116-KAN |         |                      | Duplo-híbrido | (BARTEL E FIELDS, 1995)               |
| 997  | pCMV6-XL5   |         | MX1 <sub>WT</sub>    | Mamífero      | Origene                               |
| 998  | pCR8        |         | MX1 <sub>WT</sub>    | Clonagem      | Brantis et al., dados não publicados. |
| 1004 | pBTM116-KAN | LexA HA | MX1 <sub>WT</sub>    | Duplo-híbrido | Brantis et al., dados não publicados. |
| 1118 | pDEST15     | GST     |                      | Bactéria      | Invitrogen                            |
| 1074 | pDEST15     | GST     | MX1 <sub>WT</sub>    | Bactéria      | Este trabalho                         |
| 1103 | pBTM116-KAN | LexA HA | MX1 <sub>L612K</sub> | Duplo-híbrido | Este trabalho                         |
| 1374 | pLTR        | 6xHIS   | Ubc9                 | Mamífero      | Chelbi-Alix, M.                       |
| 1375 | pcDNA3.1    | 6xHIS   | SUMO1                | Mamífero      | Chelbi-Alix, M.                       |
| 1376 | pcDNA3.1    | 6xHIS   | SUMO2                | Mamífero      | Chelbi-Alix, M.                       |
| 1377 | pcDNA3.1    | 6xHIS   | SUMO3                | Mamífero      | Chelbi-Alix, M.                       |
| 1380 | pcDNA3.1    |         | PMLIII               | Mamífero      | Chelbi-Alix, M.                       |
| 1381 | pcDNA3.1    |         | PMLIIIa              | Mamífero      | Chelbi-Alix, M.                       |
| 1391 | pcDNA3.1    |         | MX1 <sub>WT</sub>    | Mamífero      | Este trabalho                         |
| 1392 | pcDNA3.1    |         | MX1 <sub>SIMb</sub>  | Mamífero      | Este trabalho                         |
| 1402 | pcDNA3.1    |         | MX1 <sub>L612K</sub> | Mamífero      | Este trabalho                         |

### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

|      |                 |                  |                            |                   |               |
|------|-----------------|------------------|----------------------------|-------------------|---------------|
| 1409 | pcDNA3.1        | 6xHIS            | SUMO2 <sub>D71H</sub>      | Mamífero          | Este trabalho |
| 1419 | pcDNA3.1        |                  | MX1 <sub>K259R</sub>       | Mamífero          | Este trabalho |
| 1420 | pcDNA3.1        |                  | MX1 <sub>K48R</sub>        | Mamífero          | Este trabalho |
| 1425 | pcDNA3.1        |                  | MX1 <sub>K48R/K259R</sub>  | Mamífero          | Este trabalho |
| 1439 | pACT2           | Gal4_AD<br>6xHIS | SUMO1                      | Duplo-<br>Híbrido | Este trabalho |
| 1440 | pACT2           | Gal4_AD<br>6xHIS | SUMO1 <sub>E67A</sub>      | Duplo-<br>Híbrido | Este trabalho |
| 1441 | pACT2           | Gal4_AD<br>6xHIS | SUMO1 <sub>K37A/K39A</sub> | Duplo-<br>Híbrido | Este trabalho |
| 1442 | pACT2           | Gal4_AD<br>6xHIS | SUMO2                      | Duplo-<br>Híbrido | Este trabalho |
| 1443 | pACT2           | Gal4_AD<br>6xHIS | SUMO2 <sub>D71H</sub>      | Duplo-<br>Híbrido | Este trabalho |
| 1444 | pACT2           | Gal4_AD<br>6xHIS | SUMO3                      | Duplo-<br>Híbrido | Este trabalho |
| 1445 | pACT2           | Gal4_AD<br>6xHIS | SUMO3 <sub>D70H</sub>      | Duplo-<br>Híbrido | Este trabalho |
| 1446 | pACT2           | Gal4_AD<br>6xHIS | Ubc9                       | Duplo-<br>Híbrido | Este trabalho |
| 1448 | pBTM116-<br>KAN | LexA             | MX1 <sub>SIMb</sub>        | Duplo-híbrido     | Este trabalho |
| 1449 | pBTM116-<br>KAN | LexA             | MX1 <sub>K58R</sub>        | Duplo-híbrido     | Este trabalho |
| 1450 | pBTM116-<br>KAN | LexA             | MX1 <sub>K259R</sub>       | Duplo-híbrido     | Este trabalho |
| 1451 | pBTM116-<br>KAN | LexA             | MX1 <sub>K48R/K259R</sub>  | Duplo-híbrido     | Este trabalho |
| 1452 | pBTM116-<br>KAN | LexA             | MX1 <sub>GTPase</sub>      | Duplo-híbrido     | Este trabalho |
| 1457 | pBTM116-<br>KAN | LexA             | MX1 <sub>CID-GED</sub>     | Duplo-híbrido     | Este trabalho |
| 1463 | pACT2           | Gal4_AD<br>6xHIS | Ubc9 <sub>K14R</sub>       | Duplo-<br>Híbrido | Este trabalho |
| 1523 | pcDNA3.1        |                  | MX1 <sub>SIMa</sub>        | Mamífero          | Este trabalho |
| 1524 | pBTM116-<br>KAN | LexA             | MX1 <sub>SIMa</sub>        | Duplo-híbrido     | Este trabalho |

\*Vetor de expressão são apresentados de acordo com ensaio ou organismo modelo.

### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

**TABELA 4** – Linhagens de leveduras utilizadas neste estudo.

| Levedura | Descrição                                                                                                                                                               | Origem                                |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| SVL86    | <i>MATa trp1 his3 leu2 ade2 LYS2::lexAop(4x)-HIS3 URA3::lexAop(8x)-lacZ</i>                                                                                             | Clontech                              |
| VZL890   | L40 transformada com as construções plasmidiais pBTM116-KAN-MX1 <sub>wt</sub> e com o vetor plasmidial pACT. Controle negativo de auto-ativação do Duplo-híbrido (-).   | Brantis et al., dados não publicados. |
| VZL899   | L40 transformada com as construções plasmidiais pBTM116-AMP-eIF5A (pSV278) e pACT-Dys1 (pSV558). Controle forte positivo de interação do Duplo-híbrido (++)             | Brantis et al., dados não publicados. |
| VZL900   | L40 transformada com as construções plasmidiais pBTM116-AMP-eIF5A (pSV278) e pACT-Lia1(pVZ940). Controle fraco positivo de interação do Duplo-híbrido (+).              | Brantis et al., dados não publicados. |
| VZL901   | L40 transformada com as construções plasmidiais pBTM116-AMP-eIF5A (pSV278) e com o vetor plasmidial pACT (pSV149). Controle negativo de interação do Duplo-híbrido (-). | Brantis et al., dados não publicados. |

### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

**TABELA 5** – Oligonucleotídeos utilizados neste estudo.

| VZO  | Nome                            | Sequência                                        | Mutação | Restrição |
|------|---------------------------------|--------------------------------------------------|---------|-----------|
| 623  | MX1-HA-F                        | TACGACGTACCAGATTACGCTATGGT<br>TGTTTCCGAAGTG      |         |           |
| 624  | MX1-R                           | CTGGACAGAGTGTGGTTAACCGGGG<br>AACTG               |         |           |
| 699  | pACT-F                          | TACCACTACAATGGATG                                |         | Seq       |
| 700  | pACT-R                          | CACGATGCACAGTTG                                  |         | Seq       |
| 715  | MX1 <sub>L612K</sub> -F         | ACGTACGGCCAGCAGAAACAGAAGG<br>CCATGCTGGCAG        | L612K   |           |
| 716  | MX1 <sub>L612K</sub> -R         | CAGCATGGCCTTCTCTTTCTGCTGGC<br>CGTACGTCTG         | L612K   |           |
| 794  | pcDNA3.1-F                      | TAATACGACTCACTAT                                 |         | Seq       |
| 795  | pcDNA3.1-R                      | CCTCGACTGTGCCTTCT                                |         | Seq       |
| 812  | pBTM-F                          | CAGCAGAGCTTCACCATTG                              |         | Seq       |
| 813  | pBTM-R                          | ATCATAAGAAATTCGCCCCG                             |         | Seq       |
| 1675 | BamHI-GA-ATG-6XHIS-SUMO3F       | CGCGGATCCGACATCATCACCATCAC<br>CACATGTCCGAGGAG    |         | BamHI     |
| 1676 | XhoI-STOP-SUMO3R                | CCGGAGCTCACTACCCTCCCGTCTG<br>CTG                 |         | XhoI      |
| 1677 | BamHI-GA-ATG-6XHIS-SUMO2F       | CGCGGATCCGACATCATCACCATCAC<br>CACATGGCCGACGAAAAG |         | BamHI     |
| 1678 | XhoI-STOP-SUMO2R                | CCGGAGCTCACTACCTCCCGTCTGCT<br>GTTC               |         | XhoI      |
| 1679 | BamHI-GA-ATG-6XHIS-SUMO1F       | CGCGGATCCGACATCATCACCATCAC<br>CACATGTCTGACCAG    |         | BamHI     |
| 1680 | XhoI-STOP-SUMO1R                | CCGGAGCTCACTACCCCCGTTTGTT<br>C                   |         | XhoI      |
| 1681 | BamHI-GA-ATG-6XHIS-UBC9-F       | CGCGGATCCGACATCATCACCATCAC<br>CACATGTCGGGGATC    |         | BamHI     |
| 1682 | XhoI-STOP-Ubc9-R                | CCGGAGCTCACTTTATGAGGCGCAAA<br>C                  |         | XhoI      |
| 1685 | EcoRI-MX1-GTPASE(1-340)         | CCGGAATTCATGGTTGTTTCCGAAGT<br>G                  |         | EcoRI     |
| 1686 | EcoRI-STOP-MX1-GTPASE(1-340)    | CCGGAATTCCTGGCAGAGATTTACA<br>G                   |         | EcoRI     |
| 1687 | EcoRI-MX1-CID-GED(341-662)      | CCGGAATTCGCCCCTGTTAGAAAATC                       |         | EcoRI     |
| 1688 | EcoRI-STOP-MX1-CID-GED(341-662) | CCGGAATTCATTGGACAGAGTGTGG<br>TAAAC               |         | EcoRI     |
| 1689 | MX1 <sub>K48R</sub> -F          | CAGTATGAGGAGAGAGTGCGCCCT<br>GCATC                | K48R    |           |
| 1690 | MX1 <sub>K48R</sub> -R          | CAGGGGCGCACTCTCTCCTCATACTG<br>GCTG               | K48R    |           |
| 1691 | MX1 <sub>K259R</sub> -F         | GAAGTGAAGACAGAGTTGTGGACGT<br>GGTG                | K259R   |           |
| 1692 | MX1 <sub>K259R</sub> -R         | CACGTCCACAACTCTGTCTTCAGTTC<br>CTTTG              | K259R   |           |
| 1693 | MX1 <sub>SIMb</sub> -F          | CAGCTCCCGAGATGCCGCGGATGCG<br>ACTCTAATAGACCTTCCTG | SIMb    |           |

### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

|      |                              |                                                                         |               |
|------|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 1694 | MX1 <sub>SIMb</sub> -R       | GAAGGTCTATTAGAGTCGCATCCGCG<br>GCATCTCGGGAGCTGATC                        | SIMb          |
| 1695 | Ubc9 <sub>K14R</sub> -F      | CTCGCCCAGGAGAGGAGAGCATGGA<br>GGAAAGAC                                   | K14R          |
| 1696 | Ubc9 <sub>K14R</sub> -R      | TTCCTCCATGCTCTCCTCTCCTGGGC<br>GAGGCTG                                   | K14R          |
| 1697 | SUMO1 <sub>K37AK39R</sub> -F | GACAGGATAGCAGTGAGATTCACTTC<br>GCAGTGGCAATGACAACACATCTCAA<br>GAAACTCAAAG | K37A/K39<br>A |
| 1698 | SUMO1 <sub>K37AK39R</sub> -R | TGAGTTTCTTGAGATGTGTTGTCATTG<br>CCACTGCGAAGTGAATCTCACTGCTA<br>TCCTGTCCAA | K37A/K39<br>A |
| 1699 | SUMO1 <sub>E67A</sub> -F     | GAATTCCTCAGGTTTCTCTTTGCAG<br>GTCAGAGAATTGCTGATAATCATAC                  | E67A          |
| 1700 | SUMO1 <sub>E67A</sub> -R     | TGATTATCAGCAATTCTCTGACCTGC<br>AAAGAGAAACCTGAGTGAATTCATT                 | E67A          |
| 1701 | SUMO2 <sub>D71H</sub> -F     | ACGGGCAACCAATCAATGAAACACAC<br>ACACCTGCACAGT                             | D71H          |
| 1702 | SUMO2 <sub>D71H</sub> -R     | GTGCAGGTGTGTGTGTTTCATTGATT<br>GGTTGCCCGTCAA                             | D71H          |
| 1703 | SUMO3 <sub>D70H</sub> -F     | GGGCAGCCAATCAATGAAACTCACAC<br>TCCAGCACAG                                | D70H          |
| 1704 | SUMO3 <sub>D70H</sub> -R     | TGCTGGAGTGTGAGTTTCATTGATTG<br>GCTGCCCCGTC                               | D70H          |
| 1893 | MX1 <sub>SIMa</sub> -F       | CTGAAGACAAGGTTGCGGCCGCGGT<br>GCGGAACCTCGTGTT                            | SIMa          |
| 1894 | MX1 <sub>SIMa</sub> -R       | ACGAGGTTCCGCACCGCGGCCGCAA<br>CCTTGTCTTCAGTTC                            | SIMa          |

### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

**TABELA 6** – Anticorpos utilizados neste estudo.

| Anticorpo      | Reatividade | Tipo | Origem     | WB     | IF   | Marcação | Fabricante  | Código  |
|----------------|-------------|------|------------|--------|------|----------|-------------|---------|
| 6xHis          | ***         | M    | Camundongo | 5.000  | ***  | ***      | Clontech    | 631212  |
| 6xHis          | ***         | M    | Camundongo | 3.000  | 200  | ***      | Sigma       | H1029   |
| 6xHis          | ***         | M    | Camundongo | 10.000 | ***  | HRP      | Sigma       | A7058   |
| Actina         | Humano      | M    | Camundongo | 5.000  | 200  | HRP      | Sigma       | A3854   |
| AlexaFluor 488 | Camundongo  | P    | Galinha    | ***    | 1000 | FITC     | Invitrogen  | A21200  |
| AlexaFluor 488 | Coelho      | P    | Cabra      | ***    | 1000 | FITC     | Invitrogen  | A11034  |
| AlexaFluor 594 | Camundongo  | P    | Galinha    | ***    | 1000 | ***      | Invitrogen  | A21201  |
| AlexaFluor 594 | Coelho      | P    | Cabra      | ***    | 1000 | ***      | Invitrogen  | A11037  |
| antilgG mouse  | Camundongo  | P    | Galinha    | 2.500  | ***  | HRP      | Santa Cruz  | sc-2055 |
| AntilgGrabbit  | Coelho      | P    | Cabra      | 2.500  | ***  | HRP      | Santa Cruz  | sc-2004 |
| GST            | ***         | P    | Coelho     | 5.000  | ***  | ***      | Sigma       | G7781   |
| LexA           | ***         | P    | Coelho     | 2.000  | ***  | ***      | Millipore   | 06-719  |
| MxA            | Humano      | P    | Coelho     | 5.000  | 250  | ***      | Este estudo | SVA82   |
| MxA            | Humano      | M    | Camundongo | 500    | 200  | ***      | OttoHaller  | ***     |
| PML            | Humano      | P    | Coelho     | 2.000  | 400  | ***      | Mounira     | ***     |
| PML PG-M3      | Humano      | M    | Camundongo | 1000   | 100  | ***      | Santa Cruz  | ***     |
| SUMO1          | Humano      | P    | Coelho     | 250    | 100  | ***      | Santa Cruz  | sc-9060 |
| SUMO1          | Humano      | M    | Camundongo | 250    | 100  | ***      | Santa Cruz  | sc-5308 |
| SUMO2/3        | Humano      | P    | Coelho     | 250    | 100  | ***      | Invitrogen  | 519100  |
| Ubc9           | Humano      | M    | Camundongo | 500    | 50   | ***      | Abgent      | AM1261a |

M = monoclonal P = policlonal HRP = Horseradish peroxidase \*\*\* Não se aplica

WB = Western blot IF = Imunofluorescência Indireta

### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

---

Os meios de cultura utilizados neste estudo foram:

- *Meio LB* - triptona 1%; NaCl 0,5%; extrato de levedura 1% (ágar 2% para meio sólido).

- *Meio SOB* - triptona 2%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; MgSO<sub>4</sub> 10 mM.

- *Meio completo (YPD)* - extrato de levedura 1%; peptona 2%; glicose 2% (ágar 2% para meio sólido).

- *Meio sintético (SC)* - YNB 0,67% (sem aminoácidos); glicose 2%; suplementado com aminoácidos, uracila ou adenina quando necessário (ágar 2% para meio sólido).

- *DMEM* - Meio Eagle modificado por Dulbecco (Life Technology).

- Opti-MEM – Meio Mínimo Essencial tamponado com HEPES e bicarbonato de sódio, contendo Timidina, Piruvato de Sódio, L-Glutamina e Hipoxantina, além de fatores de crescimento (Life Technology).

#### 3.2. MÉTODOS

Os métodos listados abaixo estão de acordo com protocolos padrão descritos em manuais de laboratório (AUSUBEL et al., 1995; MANIATIS et al., 1982) ou com aqueles descritos pelos fabricantes dos produtos utilizados.

##### 3.2.1. Transformação de *E. coli*

###### 3.2.1.1. Transformação química

Para obter células bacterianas competentes para transformação, uma cultura estacionária de *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) foi diluída em 250 mL de meio SOB líquido e incubada a 37°C até atingir ABS<sub>600nm</sub> = 0,6. A cultura bacteriana foi resfriada em banho de gelo por 10 minutos e centrifugada a 3.200xg por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, o precipitado celular formado foi suspenso em 100 mL de solução TB gelada (Pipes 10 mM pH7,0; MnCl<sub>2</sub> 55 mM; CaCl<sub>2</sub> 15 mM; KCl 250 mM). As células foram então incubadas por 10 minutos em banho de gelo e centrifugadas a 3.200xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as células foram suspensas em 20 mL de solução TB gelada contendo 1,5 mL de DMSO. Para armazenamento, alíquotas da suspensão foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C.

A transformação de células de *E. coli* competentes foi realizada através da adição

### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

---

de 50-250 ng de DNA plasmidial ou 10 µL de reação de ligação em um tubo de microcentrífuga contendo 100 µL de células competentes descongeladas. Os tubos foram mantidos em banho de gelo por 30 minutos e, então, em banho-maria a 42°C por 2 minutos. A seguir, 1 mL de meio LB líquido foi adicionado ao tubo e este foi incubado por 1 hora a 37°C. Decorrido o período de incubação, a cultura foi centrifugada, o sobrenadante descartado e as células suspensas em 200 µL de meio LB. A suspensão foi então plaqueada em meio LB sólido, contendo o antibiótico requerido para seleção de transformantes, e, as placas foram incubadas por uma noite a 37°C.

#### 3.2.1.2. Eletroporação

Para se obter células bacterianas eletrocompetentes, uma cultura estacionária de *E. coli* (DH5α) foi diluída 1:100 em 1 L de meio LB líquido e incubada a 37°C, sob agitação até atingir  $ABS_{600nm} = 1,0$ . As células foram coletadas por centrifugação a 3.200 xg por 20 minutos e lavadas uma vez com 500 mL de água milli-Q estéril gelada e duas vezes com 250 mL de água gelada. Uma nova lavagem foi realizada com 30 mL de glicerol 20% gelado. As células foram suspensas em 3 mL de glicerol 20% gelado e armazenadas em alíquotas a -80°C.

Um volume de 2 µL da preparação de DNA plasmidial foi adicionado a 40 µL de células eletrocompetentes e a mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação (0,1 cm) e submetida a um pulso elétrico nas seguintes condições: voltagem 1,7 kV, resistência 200 Ω e capacitância 25 µF. Em seguida, as células foram removidas da cubeta com 1 mL de meio LB e incubadas a 37°C por 1 hora sob agitação. Finalmente, as células foram plaqueadas em meio LB, contendo o antibiótico requerido para seleção dos transformantes. A seguir, as placas foram incubadas a 37°C até a obtenção de colônias.

#### 3.2.2. Transformação de alta eficiência de *S. cerevisiae*

No procedimento de transformação de leveduras, uma cultura de interesse em fase estacionária foi diluída a  $5,0 \times 10^6$  células/mL em 10 mL de meio SC líquido pré-aquecido e incubada a 30°C até a concentração de  $2,0 \times 10^7$  células/mL. As células foram coletadas por centrifugação a 3.000xg por 5 minutos e lavadas com água milli-Q estéril. O precipitado foi suspenso em 600 µL de solução de acetato de lítio 100 mM e incubado por 15 minutos a 30°C. As células foram novamente coletadas por centrifugação e ao precipitado foram adicionados, na seguinte ordem: 480 µL de 50%

PEG5.000, 72 µL de 1 M acetato de lítio, 100 µL de 2 mg/mL DNA de esperma de salmão, 1 µg do DNA de interesse e o volume de reação completado para 720 µL com água milli-Q estéril. O tubo foi então agitado vigorosamente por 1 minuto e incubado a 30°C por 30 minutos. A suspensão foi incubada a 42°C por 20 minutos, tomando-se cuidado de inverter o tubo a cada 5 minutos para equilíbrio da temperatura. Após nova centrifugação, as células foram suspensas em 2 mL de água milli-Q estéril, plaqueadas em meio seletivo e incubadas a 30°C até o aparecimento das colônias (GIETZ et al., 2007).

#### **3.2.3. Manipulação de linhagens celulares de mamíferos**

Neste estudo foram utilizadas três linhagens celulares, sendo uma linhagem de queratinócitos oral, uma de fibroblastos embriônicos proveniente de camundongos e uma de carcinoma cervical humano.

- Queratinócito normal da cavidade oral (*normal human oral keratinocyte* – NHOK) (PARK et al., 1991; GUO et al., 1998): seu cultivo foi realizado em monocamada em meio para queratinócitos sem soro fetal (Keratinocyte-SFM, GIBCO), suplementado com 25 µg/mL de extrato de pituitária bovina (BPE) e 0,2 ng/mL de fator de crescimento epidermal recombinante (rEGF), 5 µg/mL de gentamicina, a 37°C em atmosfera 5% de CO<sub>2</sub>.

- Swiss3T3 (ATCC: CCL-92) (TODARO e GREEN, 1963): linhagem imortalizada de fibroblastos camundongos. Seu cultivo foi realizado em monocamada em meio MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina e 10 µg/mL de gentamicina, a 37°C em atmosfera 5% de CO<sub>2</sub>. Especificamente neste trabalho foram utilizadas duas linhagens estáveis derivadas da linhagem original, Swiss3T3\_Neo e Swiss3T3\_MxA, as quais foram cultivadas na presença de 500µg/mL de Neomicina (G418).

- HeLa (ATCC: CRM-CCL-2) (GEY et al.,1952): linhagem tumoral isolada de carcinoma cervical. Seu cultivo foi realizado em monocamada em meio MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina e 10 µg/mL de gentamicina, a 37°C em atmosfera 5% de CO<sub>2</sub>.

##### **3.2.3.1. Transfecção de DNA plasmidial em linhagens de mamíferos.**

Para a realização do procedimento de transfecção de DNA plasmidial em linhagens celulares, a linhagem de interesse, mantida em meio apropriado, foi

### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

---

tripsinizada e plaqueada a uma densidade de  $5 \times 10^5$  células/poço, em placas de 6 poços, ou de  $4 \times 10^6$  células/placa (p100), no dia anterior ao procedimento.

O procedimento foi iniciado pela troca do meio de cultura das células por novo meio pré-aquecido a 37°C, em banho-maria, por 15 minutos. Para a transfecção em poços, foram utilizados 200 µL de uma solução 10% de Polietilenoimina (PEI - 1 µg/mL, Sigma) em Opti-MEM pré-aquecido, homogeneizados por agitação em vortex e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. À solução de PEI, foram adicionados 2 µg de DNA plasmidial e a mistura foi homogeneizada por agitação e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, a mistura PEI/DNA foi adicionada aos poços por gotejamento e homogeneização por agitação. No caso de transfecção em placa, foram utilizados 1mL da solução 10% de PEI e 18 µg de DNA plasmidial. O sucesso do procedimento de transfecção plasmidial foi investigado por ensaios de western blot e/ou imunofluorescência indireta, obtendo, em média, 80% de eficiência em todos os ensaios.

#### 3.2.3.2. Infecção viral de células de mamíferos

Para a realização do procedimento de infecção viral pelo vírus da estomatite vesicular (VSV) em linhagens celulares, a linhagem de interesse, mantida em meio apropriado, foi tripsinizada e plaqueada a uma densidade de  $5 \times 10^5$  células/poço em placas de 6 poços no dia anterior ao procedimento.

O procedimento foi iniciado pela troca do meio de cultura das células por novo meio desprovido de soro fetal bovino, pré-aquecido a 37°C, em banho-maria, por 15 minutos. Para cada experimento de infecção foi utilizado um M.O.I. (Multiplicity of Infection) = 1, julgando que após 24 horas de crescimento o número de células é igual ao dobro do número inicial. O procedimento foi incubado em estufa úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 1 hora e então o meio foi substituído por novo meio contendo 2% de soro fetal bovino.

As células infectadas foram mantidas em cultivo por mais 7 ou 11 horas e utilizadas para a verificação da infecção por ensaio de imunofluorescência indireta.

#### 3.2.4. Manipulação de ácidos nucleicos

##### 3.2.4.1. Isolamento de DNA plasmidial de bactéria (mini preparação)

Uma colônia da bactéria de interesse foi inoculada em 3 mL de meio LB líquido contendo antibiótico para seleção. O inóculo foi incubado a 37°C sob agitação por uma

### **3 – MATERIAL E MÉTODOS**

---

noite. Após o crescimento, 1 mL da cultura bacteriana foi centrifugada a 16.000xg por 2 minutos, o sobrenadante descartado e as bactérias suspensas em 200 µL de TE pH8,0 (Tris-HCl 10 mM pH8,0; EDTA 1 mM pH8,0). À suspensão, foram adicionados 200 µL da solução SDS/NaOH (SDS 1%; NaOH 0,2 M), o conteúdo homogeneizado por inversão e incubado a 37°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 150 µL de acetato de sódio 3 M pH4,8 e a solução foi misturada várias vezes por inversão. Os tubos foram então centrifugados a 16.000xg por 6 minutos, o sobrenadante foi transferido para novos tubos e 1 mL de isopropanol foi adicionado. Após serem misturados por inversão, os tubos foram incubados a 37°C por 5 minutos e centrifugados a 16.000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75% gelado e, após secagem, suspenso em 50 µL de TE.

#### **3.2.4.2. Manipulação enzimática de DNA**

As reações de restrição, T4 DNA ligase, fosfatase ou outras enzimas modificadoras de DNA seguiram às especificações dos fabricantes New England Biolabs e Fermentas.

#### **3.2.4.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose**

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose 0,8% em TAE 1X (Tris-acetato 40 mM pH8,5; EDTA 2 mM). À amostra de DNA, foi adicionado tampão de amostra 5X (Tris-HCl 10 mM pH8,0; EDTA 1 mM pH8,0; azul de bromofenol 0,125%; xilenocianol 0,125%; glicerol 30%; EDTA 1 mM) e, a seguir, a mistura foi aplicada no gel contendo 0,5 mg/mL de brometo de etídeo. O gel foi submetido à voltagem de 100 V em tampão TAE 1X.

#### **3.2.4.4. Isolamento e purificação de fragmentos de DNA de gel de agarose**

O fragmento de DNA separado em gel de agarose 0,8% foi visualizado por coloração com brometo de etídeo e iluminação com luz ultravioleta. O fragmento de interesse foi cortado do gel e purificado utilizando o kit “QIAquick Gel Extraction” (Qiagen), conforme recomendação pelo fabricante.

#### **3.2.4.5. Amplificação de DNA por PCR**

As reações foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL contendo

aproximadamente 50 ng de DNA molde, 1  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo, 2 U de Taq HiFi DNA polimerase (Invitrogen) e 200  $\mu$ M de dNTPs, em tampão adequado, num volume final de reação de 100  $\mu$ L. A solução foi incubada por 3 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos de incubações a 94°C por 30 segundos (desnaturação), a 58°C por 40 segundos (hibridização) e a 72°C por 1 minuto (extensão). Por último, foi realizada incubação a 72°C por 10 minutos. Quando necessário, as condições de hibridização e extensão foram variadas de acordo com os oligonucleotídeos utilizados e o fragmento de DNA a ser amplificado. Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificados utilizando o kit “QIAquick PCR Purification” (QIAGEN).

#### **3.2.4.6. Sequenciamento de DNA**

A reação de sequenciamento foi realizada num volume final de 20  $\mu$ L com oligonucleotídeos adequados, utilizando a técnica de PCR e o kit “Big Dye Terminator” (Applied Biosystem). As reações de amplificação foram realizadas seguindo as condições: 1 ciclo – 96°C; 25 ciclos – 96°C por 10 segundos, temperatura de hibridização dos oligos por 5 segundos, 60°C por 4 minutos; 1 ciclo – 60°C por 5 minutos.

O DNA foi precipitado pela adição de 2  $\mu$ L EDTA 125 mM, 2  $\mu$ L Acetato de Sódio 3 M e 50  $\mu$ L de etanol absoluto em cada amostra, as quais ficaram cobertas com papel alumínio para isolamento da luz. As amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas a 3.000xg por 30 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 70  $\mu$ L de etanol 70%. A suspensão foi centrifugada a 1.650xg por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e, após secagem do DNA, as amostras foram ressuspendidas em 10  $\mu$ L de formamida. As amostras foram desnaturadas a 96°C por 5 minutos, incubadas no gelo por 2 minutos, aplicadas em placas de 96 poços e colocadas no sequenciador ABI Prism 3130 (Applied Biosystems).

#### **3.2.4.7. Mutação sítio-dirigida**

Para a obtenção de mutantes através de mutação sítio-dirigida foi utilizado o kit “QuickChange Site-Directed Mutagenesis” (Stratagene), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Esse método baseia-se na amplificação do plasmídeo contendo o gene de interesse por PCR, utilizando a enzima de alta processividade *Pfx*

*turbo*, e oligonucleotídeos contendo a mutação desejada, seguido da remoção do DNA molde pela ação endonucleásica da enzima *DpnI* e da transformação de *E. coli* competente.

#### **3.2.5. Clonagem utilizando o sistema Gateway (Invitrogen)**

##### **3.2.5.1. Geração do clone de entrada**

O kit “PCR8/GW/TOPO” foi utilizado para gerar clones contendo o fragmento de PCR ligado ao vetor plasmidial pCR8 (Tabela 3). Para a reação, o volume de 4 µL do produto de PCR foi misturado com 1 µL de “salt solution” fornecida no kit e com 1 µL de “TOPO vector” (pCR8-topoisomerase I) e, posteriormente, a reação incubada por 30 minutos a 25°C. Em seguida, o produto da reação foi utilizado para transformar *E. coli* competente, utilizando o antibiótico espectinomicina como marcador de seleção. O clone de entrada gerado possui sítios de recombinação *attL1* e *attL2* flanqueando o fragmento de PCR inserido.

##### **3.2.5.2. Geração do clone destino**

Para geração da construção plasmidial para expressão da proteína de interesse fusionada à GST, foi utilizado o vetor plasmidial pDEST15, o qual possui os sítios de recombinação *attR1* e *attR2*. A reação de recombinação entre os sítios *attL1/attR1* e *attL2/attR2* foi realizada em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 150 ng da construção plasmidial do clone de entrada (pCR8-Gal4-BDAD ou pCR8-MX1), 150 ng de pDEST15 ou pDEST17 e 2 µL da enzima “LR Clonase II” (Invitrogen). O volume final de 10 µL foi ajustado com tampão TE (Tris 10 mM e EDTA 1 mM) pH8,0. A reação foi incubada a 25°C por 2 horas. Em seguida, a reação foi tratada com 2 µg de Proteinase K por 10 minutos a 37°C. Por fim, metade do volume total de reação foi utilizada para transformar *E. coli* competente, utilizando o antibiótico ampicilina como marcador de seleção.

#### **3.2.6. Manipulação de proteínas**

##### **3.2.6.1. Extração e quantificação de proteínas**

Para extração de proteínas totais das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio apropriado e cultivada por 16 horas a 30°C. Após crescimento, a cultura foi diluída para  $ABS_{600nm} = 0,125$  em 50 mL do mesmo meio e cultivada até  $ABS_{600nm} = 0,5$ . As células foram recuperadas por

### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

---

centrifugação a 4.000xg por 10 minutos, lavadas uma vez em PBS e lisadas em tampão de lise (Triton X-100 2%; SDS 1%; NaCl 100mM; Tris-HCl pH8,0 10mM; EDTA 1mM), pelo emprego de contas de vidro e vigorosa agitação.

Para extração de proteínas totais das linhagens celulares de mamíferos, as células foram cultivadas em meio apropriado até que atingissem 80% de confluência e o extrato foi obtido pelo emprego do tampão de lise RIPA (50 mM Tris·HCl (pH 7.9), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5 M EDTA, 10% glicerol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF e 1X PLAC – Pepstatina, Leupeptina, Aprotinina, Antipaina e Quimostatina 5 mg/mL), com o auxílio de seringa de insulina e rotação a 4°C por 1 h, sendo os debris celulares separados por centrifugação a 1.400 rpm, por período de 30 min a 4°C.

Para a determinação da concentração proteica nos extratos celulares e de proteínas purificadas foi utilizado o kit “BioRad Protein Assay” (BioRad), baseado no método de Bradford.

#### **3.2.6.2. Teste de indução da produção de proteína recombinante**

Uma cultura estacionária de *E. coli* transformada com plasmídeo de expressão de interesse foi diluída 1:100 em 25 mL de meio LB líquido contendo o antibiótico adequado e cultivada a 37°C sob agitação até  $ABS_{600nm} = 0,6$ . Após crescimento, uma amostra de 400 µL foi retirada da cultura, as células foram coletadas por centrifugação 16.000xg por 1 minuto e suspensas em 40 µL de tampão de amostra para proteína. No restante da cultura foi induzida a expressão do gene recombinante com 0,2% de L-Arabinose ou 1 mM de IPTG e 400 µL de amostra foram retirados após 1, 2 e 3 horas de crescimento. Da mesma forma, as células foram coletadas por centrifugação e suspensas em 60 µL, 80 µL e 110 µL de tampão de amostra para proteína, respectivamente. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE e coloração por Coomassie Blue.

#### **3.2.6.3. Produção de proteína recombinante em larga escala**

Excetuando-se à adequação volumétrica para o aumento de escala, foi utilizado o mesmo procedimento descrito no teste de indução da produção de proteína recombinante. Foram utilizadas culturas de 1 L de LB líquido contendo o antibiótico adequado. Após indução pelo tempo mais adequado com 0,2% de L-Arabinose ou 1 mM de IPTG, as células foram coletadas, por centrifugação, a 5.000xg por 20 minutos, lavadas com tampão PBS pH7,4 e congeladas a -80°C.

#### **3.2.6.4. Purificação de proteína em fusão com cauda de histidinas**

As células foram descongeladas em gelo e lisadas em tampão de lise (tampão fosfato 50 mM pH8,0; NaCl 300 mM; imidazol 10 mM; DTT 2 mM; PMSF 2 mM; 1X PLAC). Para a lise celular, a suspensão foi submetida à sonicação, em gelo, em ciclos de 4 segundos de sonicação e 10 segundos de repouso, durante 2 minutos, numa amplitude de 60%. O lisado foi então centrifugado a 20.000xg por 20 minutos e o sobrenadante filtrado em filtro de 0,45 µm. O lisado clarificado e filtrado foi submetido à cromatografia de afinidade, utilizando-se uma coluna de Ni-NTA de 5 mL e o sistema cromatográfico ÄKTA FPLC (GE Healthcare). O procedimento para purificação foi realizado como descrito pelo fabricante. Resumidamente, após a aplicação da amostra na coluna, esta foi lavada com tampão de lavagem (tampão fosfato 50 mM pH8,0; NaCl 300 mM; imidazol 20 mM). Em seguida, foi feita a eluição da proteína de fusão com um gradiente de tampão de eluição (tampão fosfato 50 mM pH8,0; NaCl 300 mM; imidazol 250 mM). As frações obtidas da cromatografia foram analisadas por SDS-PAGE e coloração por Coomassie Blue. As frações contendo a proteína de interesse foram reunidas e submetidas à diálise, em membrana SpectraPor (Spectrum) com poro de seleção de 12-14.000 Da, em 2 L de tampão 10 mM Tris-HCL pH 7,5, por uma noite, a 4°C.

#### **3.2.6.5. Purificação de proteína em fusão com GST (Glutathione S-Transferase)**

As células foram descongeladas em gelo e lisadas em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH8,0; DTT 2 mM; EDTA 10 mM; PMSF 2 mM; 1X PLAC). A suspensão foi submetida à sonicação, clarificada por centrifugação e filtrada como descrito anteriormente. O lisado clarificado e filtrado foi submetido à cromatografia de afinidade, utilizando-se uma coluna de Glutathione-sepharose GSTrap 5 mL e o sistema cromatográfico ÄKTA FPLC (GE Healthcare). O procedimento para purificação foi realizado como descrito pelo fabricante. Resumidamente, após a aplicação da amostra na coluna, esta foi lavada com tampão PBS pH7,4 e a proteína de fusão foi eluída em tampão de eluição (Tris-HCl 100 mM pH8,0; glutathione reduzida 10 mM). As frações obtidas da cromatografia foram analisadas por SDS-PAGE e coloração por Coomassie Blue. As frações obtidas da cromatografia contendo a proteína foram reunidas e submetidas à diálise, como descrito anteriormente. Quando necessária a remoção de GST, a proteína purificada foi submetida à clivagem por trombina. Para isso, foi adicionada 0,5 U de trombina por mg de proteína e a reação foi incubada a

temperatura ambiente, por 2 horas, para clivagem. A amostra foi submetida então a uma nova cromatografia de afinidade para a remoção de GST e purificação da proteína livre.

#### **3.2.6.6. Separação de proteínas por SDS-PAGE**

Extratos de proteínas (30 a 50 µg) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida descontínuo (RUSSELL e SAMBROOK, 2001). As amostras em tampão de amostra para proteína (Tris-HCl 40 mM pH6,8; glicerol 8%; SDS 2%; DTT 100 mM; azul de bromofenol 0,1%) foram incubadas a 96°C por 5 minutos e aplicadas no gel. O gel foi submetido à voltagem de 150 V em tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM; glicina 250 mM; SDS 0,1%). Os ensaios de oligomerização foram realizados em condições não desnaturantes (sem DTT e sem fervura) utilizando gel 4-12% Bis-Tris precast (lifetechnologies) e tampão MES-SDS.

#### **3.2.6.7. Coloração de proteínas**

O gel de acrilamida foi incubado em solução de Coomassie Blue R 0,25% em metanol 45% e ácido acético 10%, por 30 minutos, e descorado em solução de etanol 50% e ácido acético 10%.

#### **3.2.6.8. Western blot**

Após separação por SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL GE Healthcare), por 1 hora a 100 V em tampão de transferência (Tris-HCl 12 mM; glicina 125 mM). A transferência foi avaliada por coloração com Ponceau S (Ponceau S 1 mg/mL; ácido acético 5%) e a membrana foi bloqueada pela incubação com tampão PBST (PBS pH7,4; 0,25% Tween-20) contendo 5% de leite desnatado a temperatura ambiente por ao menos 30 minutos. Após bloqueio, a membrana foi incubada em PBST contendo 5% de leite desnatado e o anticorpo primário de interesse, por 2 horas, a temperatura ambiente, sob agitação branda. Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes por 5 minutos com PBST e incubada por 1 hora com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma), na diluição de 1:5.000 em PBST contendo 5% de leite desnatado. Após três lavagens de 5 minutos com PBST, a membrana foi tratada com reagentes quimioluminescentes (ECL-GE Healthcare) e utilizada na exposição a filme autorradiográfico.

#### **3.2.7. Produção de anticorpo policlonal em coelhos**

As proteínas de interesse foram produzidas em fusão com GST, purificadas e utilizadas na imunização de coelhos. Para isso, 300 µg de proteína foram homogeneizados com o mesmo volume de adjuvante completo de Freund e a emulsão obtida foi inoculada na região dorsal do coelho, por via intradérmica. Após 21 dias da primeira inoculação, 300 µg de proteína foram homogeneizados com o mesmo volume de adjuvante incompleto de Freund e inoculado na região dorsal do coelho, por via subcutânea. Outras duas inoculações foram realizadas da mesma forma com intervalos de 21 dias. Decorridos 11 dias das inoculações, a partir da segunda inoculação, foram coletados 15 mL de sangue periférico do coelho e o título do anticorpo obtido foi determinado por western blot, utilizando a proteína purificada. Alternativamente, todas as inoculações foram feitas via subcutânea.

##### **3.2.7.1. Purificação de anticorpo**

Um volume total de 2 mL de soro proveniente da última sangria dos coelhos utilizados na produção do anticorpo policlonal anti-MxA foi clarificado por centrifugação a 14.000 rpm, por 30 minutos, a 4°C, e adicionados a 18 mL de tampão de ligação (20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7.0), gelado, contendo 1xPLAC. A solução resultante foi filtrada e submetida à cromatografia de afinidade utilizando-se uma coluna de Proteína G-sepharose 1 mL (Amersham) e o sistema cromatográfico ÄKTA FPLC (GE Healthcare). O procedimento para purificação foi realizado como descrito pelo fabricante. Resumidamente, após a aplicação da amostra na coluna, esta foi lavada com tampão PBS pH7,4 e o anticorpo foi eluído em tampão de eluição (Glicina 0.1 M pH 2.7). As frações obtidas da cromatografia foram, imediatamente, neutralizadas pelo emprego de tampão Tris-HCl 1 M pH 9.0, na proporção 1:4 (v/v). Alíquotas de 10 µL de cada fração coletada foram analisadas por SDS-PAGE e coloração por “Coomassie Blue”. As frações obtidas da cromatografia contendo a proteína foram reunidas e submetidas à diálise, em tampão PBS pH 7.4. O produto da diálise foi concentrado pelo emprego de centrifugação em concentradores de proteína (Amicon Ultra 2 mL 100K – Millipore) e, ao produto final, foi adicionado glicerol para uma concentração final de 20%.

#### 3.2.8. Ensaios de interação proteína-proteína por duplo-híbrido

Os ensaios de interação proteína-proteína por duplo-híbrido foram realizados empregando o sistema da linhagem L40 (Clontech), o qual é baseado nas propriedades das proteínas Gal4 de levedura e LexA de procarioto. Este sistema foi o mesmo utilizado durante o projeto de mestrado para rastrear uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano clonada em fusão com o domínio de ativação de Gal4 no vetor plasmidial pACT2 (*LEU2*). A linhagem L40 carregada dois genes repórteres do sistema de duplo-híbrido: *HIS3* e *lacZ*.

##### 3.2.8.1. Análise de fenótipo de crescimento em meio sem histidina

As linhagens foram crescidas a 30°C em 10 mL de meio seletivo até aproximadamente  $1-2 \times 10^7$  células/mL. Após centrifugação a 3.000xg por 10 minutos e remoção do meio de cultura, as células foram suspensas na concentração de  $5 \times 10^7$  células/mL. Um volume de 200 µL da suspensão foi transferido para um poço de microplaca e a suspensão foi diluída seriadamente (1:10), em meio líquido apropriado. Utilizando um pipetador multicanal, 4 µL da suspensão original e das diluições foram aplicados nos meios de cultura de interesse SC-leu,-trp (SC -LT) e SC-leu,-trp,-his (SC -LTH), com ou sem a adição de 0,5 mM de 3-aminotriazol (3AT). O composto 3AT é utilizado como um inibidor competitivo para o produto do gene *HIS3* (imidazolglicerol-p-desidratase), assim, o seu emprego aumenta o rigor da análise de interação, inibindo possíveis escapes de expressão do repórter *HIS3*, possivelmente ocasionados devido a interações inespecíficas entre as proteínas de interesse e as proteínas de fusão do duplo-híbrido. A seguir, as placas foram incubadas a 30°C até a observação de crescimento.

##### 3.2.8.2. Ensaio de β-galactosidase

As linhagens de interesse foram cultivadas a 30°C em 5 mL de meio seletivo até aproximadamente  $1-2 \times 10^7$  células/mL. Após centrifugação a 3.000xg por 10 minutos e remoção do meio de cultura, as células foram ressuspensas na concentração de  $2,5 \times 10^8$  células/mL. Um volume de 3 µL da suspensão foi aplicado sobre uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences) colocada sobre meio sólido YPD e deixado crescer durante uma noite a 30°C. A membrana foi então transferida para uma nova placa de petri e as células foram lisadas por congelamento durante uma hora em freezer a -80°C, com as células voltadas para cima. Um papel de filtro (Whatman)

foi colocado em uma placa de petri de 100 mm e umidecido com 1,5 mL de Tampão Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  60 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  40 mM, KCl 10 mM,  $\text{MgSO}_4$  1 mM pH7,0), adicionado de X-gal (0,5 mg/mL). A membrana, com as células voltadas para cima, foi colocada sobre este papel de filtro e incubada a 30°C em câmara úmida até o desenvolvimento de coloração azul.

#### **3.2.9. Ensaio de interação proteína-proteína por co-imunoprecipitação**

Para cada ensaio de co-imunoprecipitação, células da linhagem HeLa foram plaqueadas em um poço de placas de seis poços e transfectadas com de 2 µg dos plasmídeos codificantes das proteínas de interesse, mantendo a proporção de 1:1 entre os plasmídeos utilizados. Os extratos celulares totais foram preparados em 200 µL de tampão apropriado (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1% NP40, 25 mM DTT, 1 mM PMSF e 1x PLAC), dos quais 20 µL foram reservados para verificação da presença das proteínas de interesse por western blot.

Ao volume restante foram adicionados 800 µL do mesmo tampão, 20 µL de resina de proteína G-sepharose (50% Slurry) e 1 µg de anticorpo  $\alpha$ -6xHis. A mistura foi incubada por 12-16 horas a 4°C. Após incubação o complexo imunoprecipitado foi lavado três vezes no mesmo tampão e submetido a fervura em tampão de amostra para proteínas. A presença de proteínas foi, posteriormente, analisada por western blot. Triplicatas experimentais foram utilizadas para confirmar os resultados obtidos.

Para evitar interações inespecíficas entre a resina de proteína G-sepharose e as proteínas do extrato, a resina foi incubada por 1 hora, a temperatura ambiente, no tampão descrito, acrescido de 1% de soro-albumina bovina (BSA). Quando utilizada a resina de Agarose-Flag M2 (Sigma-A2220), o DTT foi removido do tampão seguindo instruções do fabricante.

#### **3.2.10. Ensaio de SUMOilação**

O ensaio de SUMOilação foi realizado de acordo com a metodologia descrita pela Dr. Mounira K Chelbi-Alix (GALISSON et al., 2011).

Para a obtenção dos extratos proteicos, a serem utilizados nos ensaios de purificação, foram utilizadas células da linhagem HeLa, provenientes de uma placa p100, transfectadas, um dia após subcultivo, com os plasmídeos codificantes para MxA (9 µg - pcDNA3.1-MX1) e para a forma madura de SUMO1 ou de seus parálogos (6 µg - pcDNA3.1-6xHis-SUMO1, pcDNA3.1-6xHis-SUMO2 ou pcDNA3.1-6xHis-SUMO3) e

cultivadas por 48 horas após transfecção.

Após cultivo, as células foram recuperadas mecanicamente em 10 mL de tampão PBS gelado, contendo 20 mM de Iodoacetamida (IAc) ou *N*-Etilmaleimida (NEM), transferidas para um tubo de 15 mL e lavadas por centrifugação a 1.200 rpm por 5 minutos. As células foram ressuspensas em 10 mL do mesmo tampão e uma alíquota de 1 mL foi retirada para a verificação da presença das proteínas de interesse por western blot.

As células foram novamente recuperadas por centrifugação e lisadas por 20 segundos de sonicação branda em 5 mL de tampão 1 (6 M Guanidina-HCl pH 8.0, 10 mM Tris-HCl, 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM IAc, 5 mM Imidazol e 5 mM β-Mercaptoetanol). Os lisados foram centrifugados por 15 minutos, a 4.000 rpm, a 4°C para a remoção de possíveis restos celulares. As proteínas conjugadas a SUMO1 e seus parálogos contendo cauda de 6 histidinas foram recuperadas pela incubação dos lisados com 50 µL resina de Agarose NI-NTA (50% Slurry), previamente lavadas 5 vezes em 1 mL de tampão 1, por 12-16 horas a 4°C sobre agitação.

Após o processo de incubação, a resina foi lavada sucessivamente por centrifugação a 2.000 rpm, por 2 minutos, a 4°C, seguindo o esquema: uma vez com 4 mL de tampão 1 contendo 0,1% de Triton-100; uma vez em 4 mL de tampão 2 (8 M Ureia pH 8.0, 10 mM Tris-HCl, 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM IAc, 5 mM β-Mercaptoetanol e 0.1% de Triton-100) e três vezes em 4 mL de tampão 3 (8 M Ureia pH 8.0, 10 mM Tris-HCl, 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM IAc, 5 mM β-Mercaptoetanol e 0.1% Triton-100). Ao fim destas etapas, a resina foi transferida para tubo de microcentrifuga de 1,5 mL e lavada por mais 4 vezes em 1 mL de tampão 3.

Ao final do processo, as proteínas purificadas foram eluídas da resina pelo uso de 50 µL de tampão de amostra de proteína acrescido de 200 mM de imidazol. A suspensão foi mantida a temperatura ambiente por 20 minutos e levada à fervura em banho seco a 95°C por 5 minutos. A resina de agarose foi separada das proteínas eluídas por centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante resultante foi analisado por western blot. Triplicatas experimentais foram utilizadas para confirmar os resultados obtidos.

#### **3.2.11. Ensaio de imunofluorescência indireta**

Para cada ensaio de imunofluorescência indireta foram utilizadas 3x10<sup>5</sup> células da linhagem HeLa, as quais foram plaqueadas 24 horas antes de sua transfecção sobre

### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

---

lamínulas previamente tratadas com poli-D-lisina (Sigma). Após 48 horas do processo de transfecção celular, as células foram lavadas duas vezes em PBS gelado e fixadas em solução 4% de paraformaldeído por 10 minutos a temperatura ambiente. Após três lavagens por 5 minutos em PBS, as células foram permeabilizadas pelo emprego de PBS acrescido de 0,3% de Triton-100 e incubação por 15 minutos a temperatura ambiente. Para a neutralização e bloqueio de possíveis pontos de ligação inespecífica, as células foram bloqueadas pelo emprego de tampão de bloqueio (PBS, 0,3% Triton-100 e 2% BSA (m/v)).

Uma vez bloqueadas, as células foram incubadas por 1 hora, a temperatura ambiente, com suspensão do anticorpo de interesse em tampão de bloqueio, e, posteriormente, lavadas três vezes por 5 minutos com tampão PBS. Após as lavagens, um novo ciclo de incubação por 1 hora foi realizado, desta vez com suspensão de anticorpo secundário marcado com fluoróforo (Alexa-fluor 488 ou Alexa-Fluor 594, Molecular Probe, Inc), contendo 1 µL da solução 5 mg/mL de 4'-6-diamidino-2-fenilindol preparado em dimetilformamida (DAPI - Sigma). Novas lavagens foram realizadas.

O tampão foi removido da superfície das lamínulas e o montante residual do tampão foi secado por aspiração. As lamínulas foram montadas sobre lâminas usando vectashield (Vector Laboratory) e seladas pelo emprego de verniz incolor. As proteínas marcadas foram analisadas em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E600, utilizando lentes objetivas com ampliação de 100x, utilizando filtros para os seguintes comprimentos de onda: Alexa-Fluor 488, absorção 496 nm e emissão 519 nm; Alexa-fluor 594, absorção 590 nm e emissão 617 nm; DAPI, absorção 358 nm e emissão 461 nm. As imagens capturadas foram processadas pelo emprego do software ImageJ 64, versão 1.4.

Nos ensaios de co-localização, as proteínas de interesse foram marcadas com anticorpos primários gerados em diferentes organismos. A diferença de fluorescência foi obtida pelo emprego concomitante de anticorpos secundários marcados, com Alexa-fluor 488 ou Alexa-Fluor 594, dirigidos contra as IgGs provenientes de organismos específicos. Triplicatas experimentais foram utilizadas para confirmar os resultados obtidos.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1. Produção do anticorpo policlonal anti-MxA ( $\alpha$ -pMxA)

Para a identificação da proteína MxA em ensaios de western blot, imunofluorescência indireta, co-imunoprecipitação ou SUMOilação, foi obtido um anticorpo policlonal anti-MxA em coelhos.

##### 4.1.1. Clonagem do gene *MX1* em vetor de expressão

O fragmento de aproximadamente 2.100 bp, correspondente à região codificadora do gene *MX1*, foi obtido por reação de PCR com os oligonucleotídeos VZO623 e VZO624, a partir do vetor pCMV6-XL5-MX1 (Origene, pVZ997). Esse fragmento foi utilizado para a geração do clone de entrada no vetor pCR8 (pCR8-MX1, pVZ998), o qual foi confirmado por diagnóstico de restrição (resultados não mostrados).

O clone de entrada obtido foi utilizado para a geração do plasmídeo de expressão de MxA em fusão com GST. Para tanto, foi realizada uma reação de recombinação LR com o vetor pDEST15, gerando o plasmídeo pDEST15-MX1 (pVZ1074, GST-MxA), também confirmado por diagnóstico de restrição (resultados não mostrados).

##### 4.1.2. Testes de indução da produção da proteína recombinante GST-MxA

Para a realização dos testes de indução da produção da proteína recombinante de interesse, foi utilizada a linhagem BL21 AI de *E. coli* transformada com o plasmídeo pVZ1074 (GST-MxA). Essa linhagem possui sistema de expressão induzível por arabinose (AI = arabinose inducible).

Nos testes de indução da produção da proteína recombinante GST-MxA, as temperaturas de 37°C, 30°C e 25°C foram utilizadas para determinar a melhor condição de produção das proteínas.

A Figura 8A mostra a produção da proteína GST-MxA (~100 kDa), após a indução com 0,2% de L-Arabinose, a 30°C, por um período de 1 a 3 horas (canaletas 2 a 4). Após o período de 3 horas, foi possível observar a presença de uma maior concentração da proteína de interesse na fração correspondente ao sobrenadante das amostras, fração solúvel (canaleta 5). Esta condição foi escolhida para a realização da produção em larga escala da proteína.

A proteína de fusão GST-MxA proveniente de lisado preparativo foi purificada por cromatografia de afinidade com resina de glutathiona-sepharose, dialisada e concentrada. A Figura 8B apresenta o resultado da purificação de GST-MxA, presente nas frações de eluição da coluna (frações 18 a 20).

### 4.1.3. Produção, purificação e avaliação do anticorpo policlonal $\alpha$ -pMxA

A proteína de fusão GST-MxA, obtida e purificada de bactéria, foi inoculada em coelhos. Previamente às inoculações (Pré-imune - P.I.) e após 11 dias da segunda inoculação (1<sup>o</sup> Bleed), da terceira (2<sup>o</sup> Bleed) e da quarta inoculação (3<sup>o</sup> Bleed), os animais foram sangrados parcialmente e os soros recuperados. O extrato total da linhagem L40 contendo o plasmídeo pBTM-KAN-MX1, codificando a produção da proteína de fusão LexA-MxA, foi utilizado em ensaios de western blot para testar a presença de IgG anti-MxA nos soros obtidos. Foi utilizado com controle, o anticorpo anti-LexA. A produção do anticorpo foi testada inicialmente com quatro animais que, mesmo após todas as imunizações, não foram capazes de produzir o anticorpo de interesse (resultados não mostrados).

O procedimento de imunização foi iniciado novamente, agora somente com inoculações intradérmicas. Novamente, o mesmo extrato protéico da linhagem L40 produzindo LexA-MxA foi utilizado para checar a produção do anticorpo. Como almejado, um dos animais inoculados foi capaz de produzir soro reativo contra MxA (resultados não mostrados).

Após confirmação da obtenção do anticorpo  $\alpha$ -pMxA utilizando extrato de levedura, o mesmo foi testado para sua reatividade contra extrato obtido a partir de células da linhagem NHOK, previamente tratadas com IFN-I (IFN $\beta$ -1a), para induzir a expressão do gene *MX1*. A Figura 9 apresenta o resultado dos ensaios de western blot com 5 diluições (1:1.000, 1:2.500, 1:5.000, 1:7.500 e 1:10.000) do soro pré-imune (controle) e dos soros provenientes das três sangrias do animal. Como pode ser observado, o anticorpo permitiu a detecção de uma banda de aproximadamente 78 kDa, correspondente ao tamanho da proteína MxA. A detecção já foi observada com o soro obtido na primeira sangria e a continuação do processo de imunização possibilitou o aumento no título do anticorpo policlonal  $\alpha$ -pMxA produzido.

Uma vez obtido o anticorpo  $\alpha$ -pMxA, este foi testado para a detecção da proteína MxA em ensaios de co-imunoprecipitação, porém, tais ensaios apresentaram resultados de difícil análise devido a uma série de bandas inespecíficas (resultados não mostrados). Assim, visando superar este problema, o anticorpo foi submetido a um processo de purificação e testado em diversos ensaios de detecção da proteína MxA.

O anticorpo policlonal produzido foi purificado utilizando cromatografia de afinidade à proteína G-sepharose no sistema cromatográfico Äkta FPLC (GE Healthcare). Para tanto, uma amostra de 1 mL do soro obtido de coelho imunizado com

#### 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

a proteína de fusão GST-MxA foi diluída em 19 mL de tampão fosfato 20 mM, filtrado e aplicado sobre a coluna de proteína G-sepharose. Após lavagem, o anticorpo ligado a coluna foi eluído pelo emprego de tampão glicina 0.1 M pH 2,7 e coletado em amostras de 800 µL, as quais foram imediatamente neutralizadas pela presença de 200 µL de tampão Tris-HCl 1 M pH 9,0 nos tubos utilizados na coleta das frações.

As frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE seguida de coloração por Coomassie Blue e os resultados obtidos podem ser verificados na Figura 10. É possível detectar uma grande quantidade de proteínas passando diretamente pela coluna durante o processo de injeção da amostra (frações 1, 2 e 21), assim como é possível ver que muitas são eliminadas durante o processo de lavagem da coluna (frações 22 a 26). Ainda, é possível notar que a coluna foi capaz de reter os anticorpos presentes na amostra de soro utilizada, os quais foram eluídos pelo emprego de tampão glicina (frações 27 a 31). Isso é observado pelas bandas características de um anticorpo analisado por SDS-PAGE, o qual é separado em cadeia leve (~25 kDa), cadeia pesada (~50 kDa) e uma pequena fração de imunoglobulinas que resistiu ao processo de desnaturação (~150 kDa). Assim, o procedimento empregado na purificação do anticorpo policlonal anti-MxA foi eficaz na remoção de proteínas e componentes diversos do soro e na retenção de IgGs pela resina de proteína G-sepharose utilizada.

As frações eluídas contendo o anticorpo de interesse foram agrupadas e dialisadas em tampão PBS pH 7,4, a 4°C, por uma noite, concentradas pelo emprego de coluna AMICOM com corte de 100 kDa e adicionadas de glicerol para uma concentração final de 20%. O produto resultante da purificação foi mantido a -20°C até o momento do uso. Esse anticorpo foi empregado em todos os ensaios descritos neste estudo.

Com o objetivo de avaliar a sua qualidade, o anticorpo produzido e purificado foi comparado ao anticorpo monoclonal  $\alpha$ -mMxA (FLOHR et al., 1999) fornecido gentilmente pelo Dr. Otto Haller. Nestes experimentos foram utilizados fibroblastos embrionários derivados de camundongos defectivos para a produção de MxA (Swiss3T3), contendo construção plasmidial integrada que codifica para a produção da proteína MxA humana (Swiss3T3\_MxA) ou somente o vetor vazio com sua marca de seleção (Swiss3T3\_Neo) (PAVLOVIC et al. 1990).

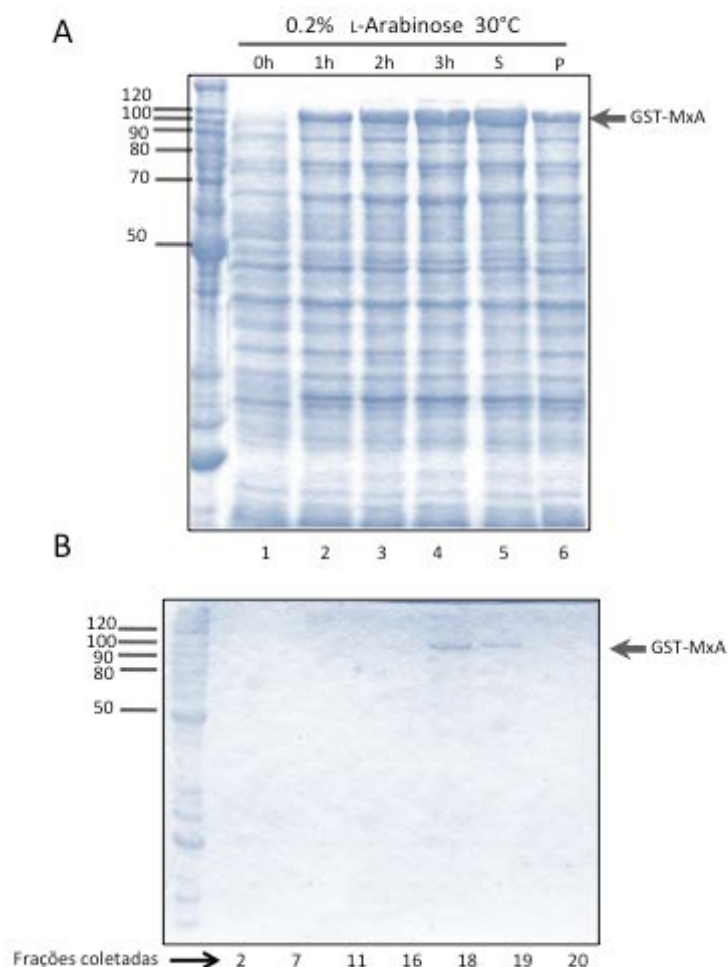
Assim, foram realizados experimentos de imunofluorescência indireta e western blot e os resultados obtidos podem ser visualizados nas Figuras 11A e 11B,

#### 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

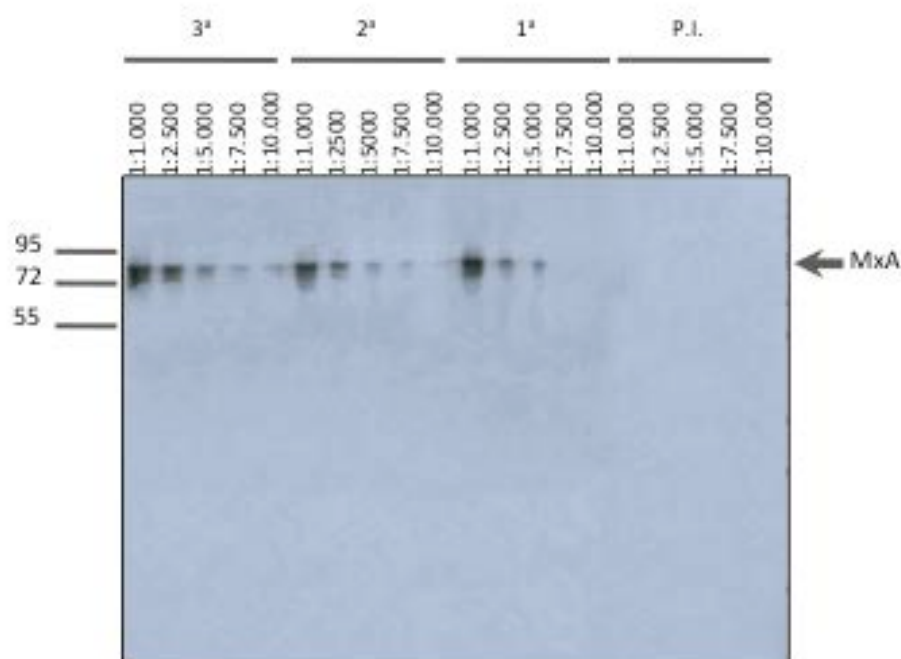
respectivamente. É possível afirmar que ambos anticorpos são capazes de detectar a proteína MxA no citoplasma celular, nas diluições de 1:250, no caso do anticorpo policlonal produzido ( $\alpha$ -pMxA), e 1:200, no caso do anticorpo monoclonal ( $\alpha$ -mMxA). Ainda, é possível dizer que o anticorpo policlonal é capaz de detectar uma menor quantidade da proteína MxA, em ensaios de western blot, utilizando uma diluição de 1:5.000 do anticorpo  $\alpha$ -pMxA, quando comparado com o anticorpo  $\alpha$ -mMxA. Observar que o anticorpo monoclonal foi utilizado em uma diluição 10x menor (1:500).

Desta forma, conclui-se que o anticorpo policlonal anti-MxA ( $\alpha$ -pMxA) produzido em coelhos neste trabalho é uma ferramenta valiosa no estudo da proteína em questão, podendo ser aplicado em diferentes técnicas com grande sensibilidade e especificidade.



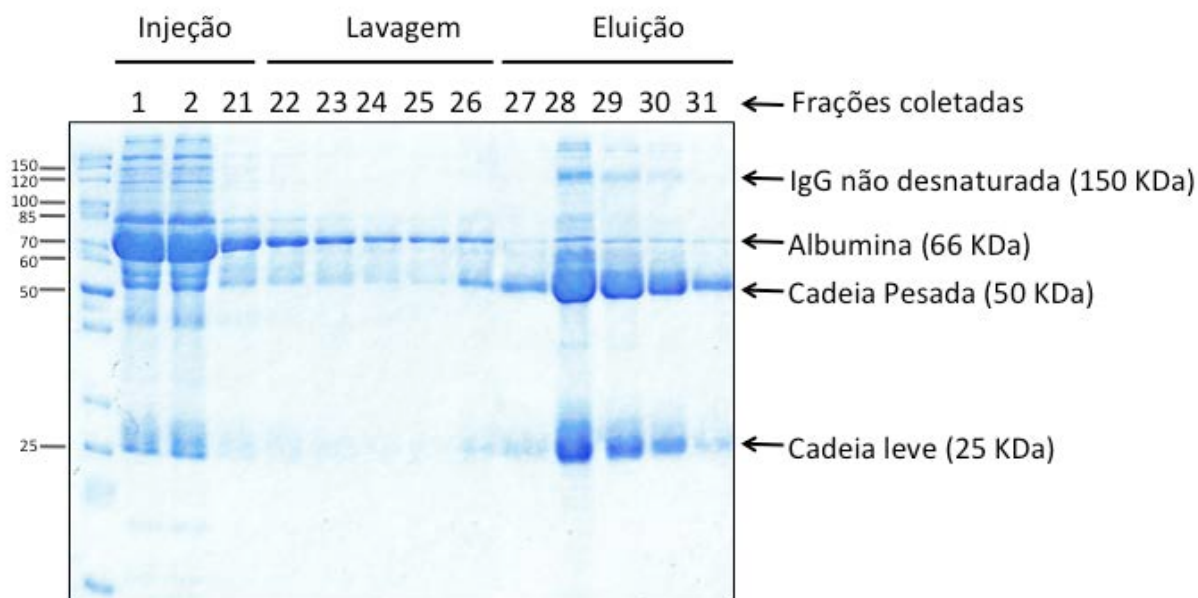
**FIGURA 8. Avaliação da produção e purificação da proteína de fusão GST-MxA.**

**A.** Avaliação da produção de GST-MxA. Alíquotas da cultura bacteriana antes (canaleta 1) e após indução com 0,2% de L-Arabinose (canaletas 2 a 4), a 30°C, foram analisadas em gel de acrilamida:bis-acrilamida 12%. As canaletas 5 e 6 correspondem, respectivamente, ao sobrenadante e ao precipitado do teste de solubilidade após indução por 3 horas. **B.** Purificação de GST-MxA por afinidade à resina de glutationa-sepharose. As frações 2, 7, 11 e 16 correspondem às frações descartadas durante as etapas de ligação e lavagem da coluna, e as frações 18, 19 e 20 correspondem às frações de eluição de GST-MxA da coluna. O padrão de massa molecular 10 kDa (Invitrogen) foi utilizado como marcador.



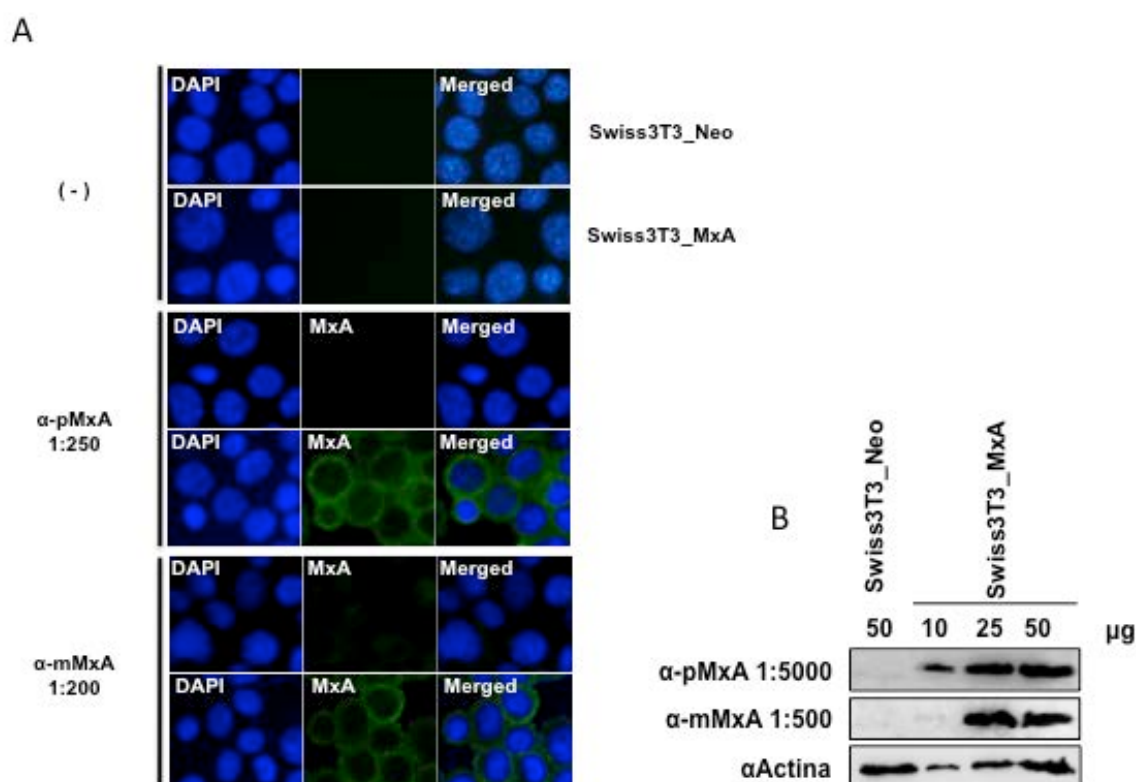
**FIGURA 9. Avaliação da produção e determinação do título do anticorpo policlonal anti-MxA ( $\alpha$ -pMxA).**

Diluições crescentes (1:1.000 a 1:10.000) do soro pré-imune e dos soros obtidos nas diversas sangrias foram utilizadas em ensaio de western blot, empregando 0,5 mg de extrato proteico total da linhagem NHOK, tratada com IFN-I (IFN $\beta$ -1a). O soro pré-imune (P.I.) e os soros obtidos das três sangrias estão indicados. O padrão de massa molecular 10 kDa (Invitrogen) foi utilizado como marcador.



**FIGURA 10. Etapas da purificação do anticorpo policlonal anti-MxA ( $\alpha$ -pMxA).**

**A.** Análise do processo de purificação do anticorpo policlonal anti-MxA. SDS-PAGE corado com Coomassie Blue das frações coletadas ao longo do processo de purificação do anticorpo, utilizando coluna de proteína G-sepharose: injeção da amostra no sistema (frações 1,2 e 21), lavagem da coluna com tampão PBS pH 7,4 (frações 22 a 26) e eluição do anticorpo retido na coluna (frações 27 a 31). À direita do painel estão indicadas as cadeias formadoras de IgGs (leve e pesada), IgGs não desnaturadas e o principal constituinte do plasma sanguíneo (albumina). O padrão de massa molecular 10 kDa (Invitrogen) foi utilizado como marcador.



**FIGURA 11. Avaliação da qualidade do anticorpo policlonal anti-MxA (α-pMxA).**

**A.** Ensaio de imunofluorescência indireta para a detecção de MxA. Células derivadas da linhagem Swiss3T3 expressando (Swiss3T3\_MxA) ou não (Swiss3T3\_Neo) a proteína MxA de forma estável foram submetidas ao ensaio de imunofluorescência indireta com os anticorpos policlonal produzido em coelho (α-pMxA) ou monoclonal produzido em camundongo (α-mMxA), utilizando as diluições 1:250 e 1:200, respectivamente. O anticorpo secundário empregado foi anti-IgG de coelho ou camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 (fluorescência verde). A cromatina celular foi marcada com DAPI (fluorescência azul). O controle negativo de marcação foi realizado pelo não emprego dos anticorpos anti-MxA (-). As imagens foram combinadas pelo emprego do software ImageJ (Merged). **B.** Ensaio de western blot para a detecção da proteína MxA. 50 μg do extrato total de proteínas da linhagem Swiss3T3\_Neo e 10, 25 e 50 μg do extrato total de proteínas da linhagem Swiss3T3\_MxA foram submetidos a análise por western blot usando os anticorpos α-pMxA (1:5000) e α-mMxA (1:500). O anticorpo anti-Actina (αActina) foi utilizado como controle de carregamento dos extratos.

### 4.2 Confirmação da interação física de MxA com ligantes revelados por duplo-híbrido

Como comentado na Introdução, durante a realização do Mestrado, que deu origem a este trabalho, o emprego do rastreamento de duplo-híbrido utilizando a proteína MxA como isca para rastrear uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano, possibilitou a identificação de 27 ligantes prováveis de MxA, após a confirmação da expressão dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ*. Neste rastreamento, foram encontradas não só proteínas já tidas como ligantes da proteína Mx1 de camundongos (ENGELHARDT et al., 2001), mas também novos ligantes envolvidos nos mais diferentes processos celulares, tais como: regulação da transcrição, regulação da apoptose, controle da proliferação celular e resposta aos estímulo de dano ao DNA (BRANTIS-DE-CARVALHO et al., 2011).

Dos 27 ligantes prováveis de MxA, os clones codificantes para SUMO1 e Ubc9 foram selecionados para investigações adicionais, devido ao envolvimento destas proteínas no processo de SUMOilação, que por sua vez, desempenha um importante papel na formação dos corpúsculos PML-NBs, os quais estão envolvidos em diversos processos biológicos incluindo a apoptose e a atividade antiviral (TROST et al., 2000; ENGELHARDT et al., 2001; ENGELHARDT, 2004; GEISS-FRIEDLANDER e MELCHIOR, 2007; LIN et al., 2006; BERNARDI e PANDOLFI, 2007; HALLER et al., 2007; KRIEGHOFF-HENNING e HOFMANN, 2008).

#### 4.2.1. Ensaio de interação proteína-proteína por co-imunoprecipitação

Uma vez que os ensaios realizados para a determinação da interação física por “GST-pulldown” não funcionaram (resultados não mostrados), decidiu-se empregar a técnica de co-imunoprecipitação, a partir de células humanas co-transfectadas com plasmídeos codificantes para a produção das proteínas de interesse.

A maquinaria de SUMOilação celular envolve um série de outras proteínas, como as proteínas SUMO2 e SUMO3 que são parálogos funcionais de SUMO1. Assim, mesmo não estando entre os ligantes prováveis revelados por duplo-híbrido, a interação de MxA com SUMO2 e SUMO3 também foi ensaiada neste estudo. Esses experimentos foram realizados durante o estágio de doutorado sanduíche, realizado na Universidade de Paris V (Descartes), sob a orientação da Dra. Mounira K. Chelbi-Alix, nos períodos de 01/04/2012 a 31/03/2013 e 06/10/2013 a 17/12/2013.

Para tanto, células da linhagem HeLa foram transfectadas com os plasmídeos de

#### 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

interesse. Os plasmídeos utilizados foram: pLTR-6xHis-Ubc9, codificante para a enzima de conjugação E2 em fusão com cauda de histidinas, os plasmídeos pcDNA3.1-6xHis-SUMO1, pcDNA3.1-6xHis-SUMO2 e pcDNA3.1-6xHis-SUMO3, codificantes para as formas maduras de SUMO1, SUMO2 e SUMO3 também em fusão com cauda de histidinas, respectivamente, e o plasmídeo pcDNA3.1-MxA, codificante para a proteína MxA. Antes de serem utilizados no ensaio de co-imunoprecipitação, parte dos lisados foram submetidos a ensaios de western blot para confirmar a expressão das proteínas de interesse, utilizando anticorpo anti-cauda de histidinas ( $\alpha$ -6xHis) ou anti-Ubc9 ( $\alpha$ -Ubc9), uma vez que foi impossível detectar 6xHis-Ubc9 com o anticorpo  $\alpha$ -6xHis nesses ensaios de western blot.

A Figura 12 mostra os resultados obtidos no experimento de co-imunoprecipitação, utilizando lisados obtidos de células HeLa co-transfectadas ou não com combinações diversas das construções plasmidiais de interesse, indicadas na parte superior da Figura 12. É possível verificar que há uma forte interação entre Ubc9 e MxA. Também é possível verificar que existe interação entre SUMO1 e MxA. Finalmente, não foi possível detectar interação física entre a proteína MxA e as proteínas SUMO2 e SUMO3. No painel inferior da Figura 12, estão apresentados os resultados obtidos dos ensaios de western blot que confirmaram a presença das proteínas de interesse nos lisados utilizados nos experimentos de co-imunoprecipitação (input). Como o anticorpo  $\alpha$ -Ubc9 permite a detecção da proteína de fusão 6xHis-Ubc9 e também da proteína Ubc9 endógena, a proteína Ubc9 foi revelada em todas as canaletas. Entretanto, uma banda evidente de Ubc9, concentrada pelo processo de imunoprecipitação, pode ser observada no painel que mostra as proteínas imunoprecipitadas com o anticorpo  $\alpha$ -6xHis (painel do meio).

Com o objetivo de melhor documentar a interação física de MxA com Ubc9 e SUMO1, o experimento de co-imunoprecipitação foi repetido na presença de um controle positivo. Assim, a interação de SUMO1 com a isoforma III da proteína PML (PMLIII) foi ensaiada em paralelo.

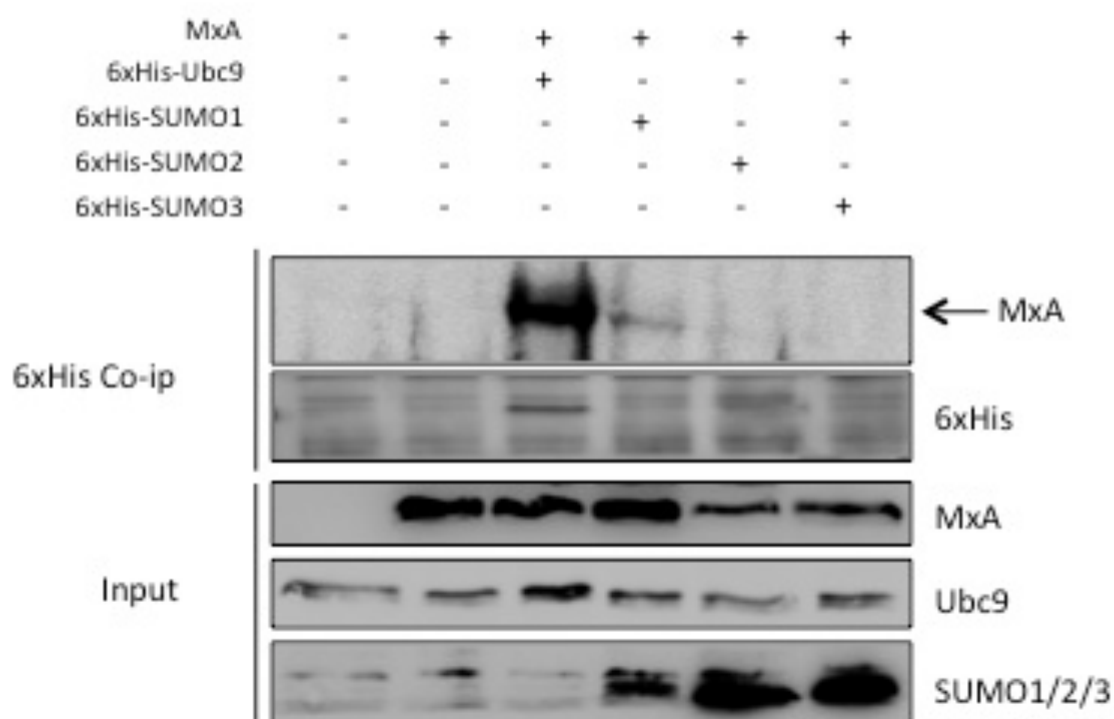
A Figura 13 apresenta os resultados do experimento de co-imunoprecipitação. Como pode ser observado, MxA é comprovadamente co-imunoprecipitada por Ubc9 e SUMO1, da mesma forma que PMLIII é co-imunoprecipitada por SUMO1. No caso de PMLIII, ainda foi possível reconhecer as formas SUMOiladas desta proteína. Finalmente, também é possível observar que a presença de SUMO1 interfere na interação entre MxA e Ubc9, o que sugere que uma destas proteínas, mais

provavelmente SUMO1, interage com as demais através da mesma região. Essa hipótese será discutida mais adiante.

### 4.2.2. Ensaio de co-localização de MxA com Ubc9 e SUMO1

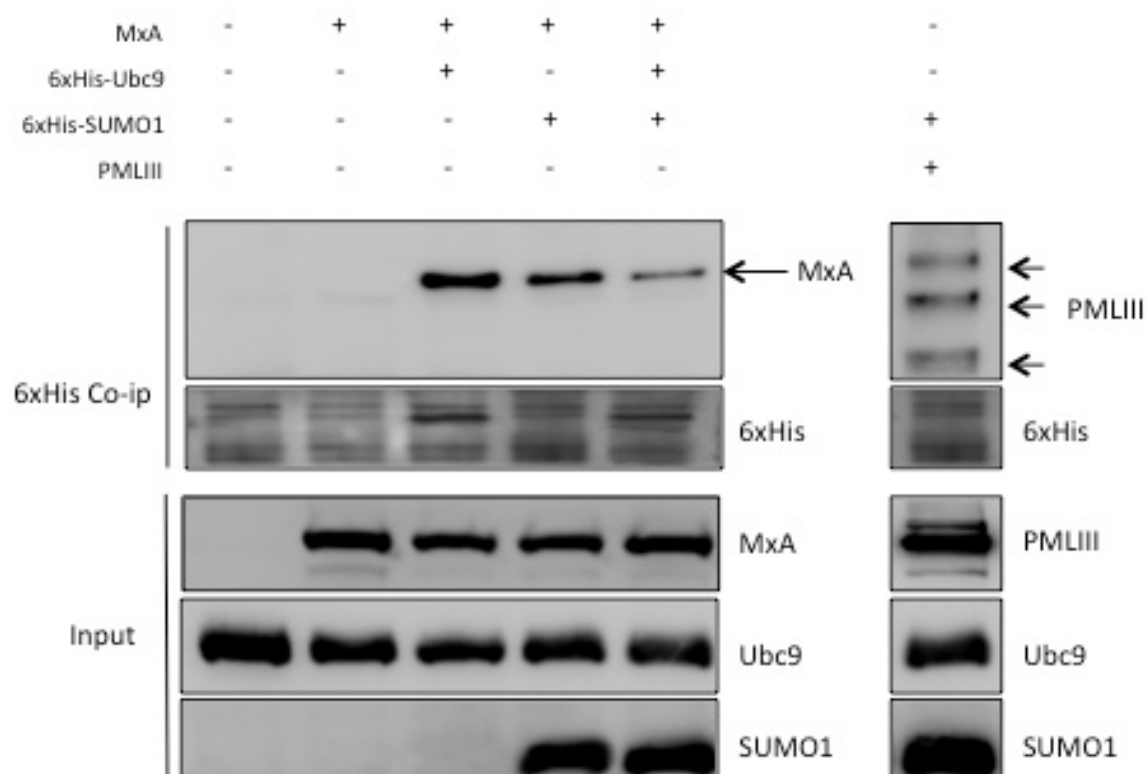
Além dos ensaios de co-imunoprecipitação, a co-localização entre MxA, Ubc9 e SUMO1 também foi investigada pela técnica de imunofluorescência indireta seguida de microscopia confocal. Para tanto, o mesmo procedimento experimental de cultivo e co-transfecção de células da linhagem HeLa foi empregado. Porém, neste caso, as células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro e submetidas ao ensaio de imunofluorescência indireta

A Figura 14 apresenta os resultados obtidos. Como pode ser observado (setas), existe co-localização entre MxA e Ubc9, assim como entre MxA e SUMO1, no citoplasma celular. A co-localização de MxA com Ubc9 e SUMO1 corrobora os resultados de interação física entre essas proteínas por co-imunoprecipitação. No painel A (Ubc9) e B (SUMO1) da Figura 14, a localização perinuclear e nuclear das proteínas Ubc9 e SUMO1 são evidentes, tanto quanto a localização citoplasmática/perinuclear de MxA. Neste sentido, a região perinuclear, mais precisamente as regiões próximas ao poro nuclear, é conhecida como um local de intensa SUMOilação, onde proteínas se concentram para serem SUMOiladas e, então, translocadas para o núcleo celular (PALANCADE e DOYE, 2008). A presença de MxA nesta região, co-localizada com Ubc9, aumenta a possibilidade de MxA ser SUMOilada, embora não haja descrição da translocação desta proteína para dentro do núcleo. A SUMOilação de MxA será abordada adiante.



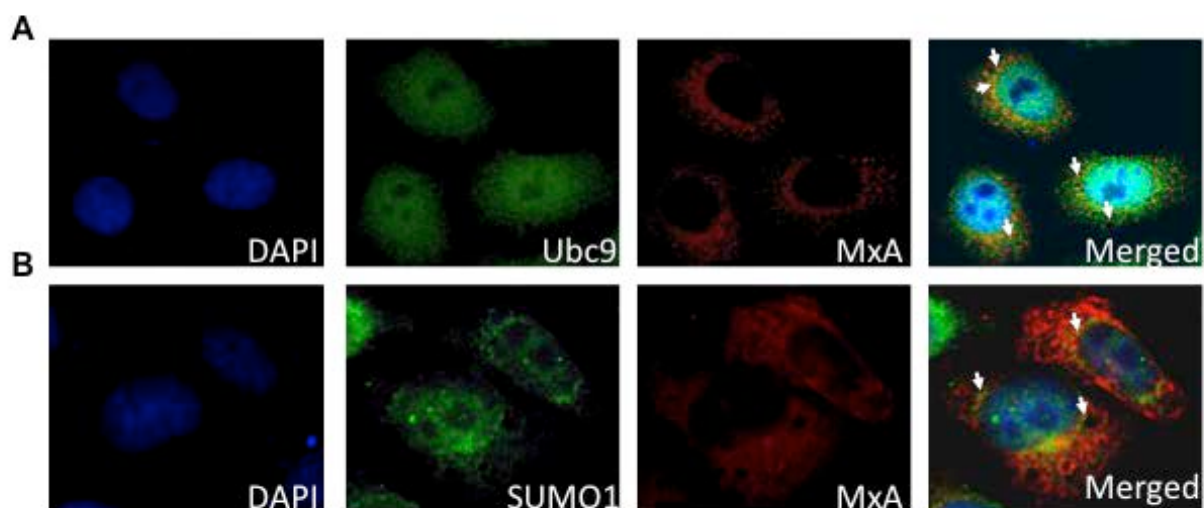
**FIGURA 12. Avaliação da interação física entre MxA e proteínas da maquinaria de SUMOilação (SUMO1, SUMO2, SUMO3 e Ubc9), por co-imunoprecipitação.**

Resina de proteína G-sepharose foi incubada com 1 µg de anticorpo anti-6xHis (Clontech) e com extrato total de células HeLa previamente transfectadas (+) ou não (-) com plasmídeos codificantes para as proteínas de interesse. A detecção de MxA co-imunoprecipitada foi realizada com o anticorpo policlonal  $\alpha$ -pMxA (painel superior). A detecção das proteínas imunoprecipitadas foi realizada com anticorpo monoclonal de camundongo anti cauda de histidinas ( $\alpha$ -6xHis, painel do meio). Como controle, a presença das proteínas de interesse nos lisados utilizados (input) foi investigada através de ensaios de western blot (painel inferior) (MxA ~78 kDa, 6xHis-Ubc9 ~19 kDa e 6xHis-SUMO1/2/3 ~11 kDa). A banda correspondente à proteína MxA co-imunoprecipitada está indicada por seta. Anticorpos utilizados:  $\alpha$ -pMxA (MxA);  $\alpha$ -6xHis Clontech (SUMO1/2/3) e  $\alpha$ -Ubc9 Abgent (Ubc9). Número amostral = 2.



**FIGURA 13. Confirmação da interação de MxA com Ubc9 e SUMO1 por co-imunoprecipitação.**

Resina de proteína G-sepharose foi incubada com 1 µg de anticorpo Anti-6xHis (Clontech) e com extrato total de células HeLa previamente transfectadas (+) ou não (-) com plasmídeos codificantes para as proteínas de interesse. A detecção de MxA co-imunoprecipitada foi realizada com o anticorpo policlonal α-pMxA (painel superior). A detecção de PMLIII co-imunoprecipitada foi realizada com o anticorpo policlonal α-PML (painel superior). A detecção das proteínas imunoprecipitadas foi realizada com anticorpo monoclonal de camundongo anti cauda de histidinas (α-6xHis, painel do meio). Como controle, a presença das proteínas de interesse nos lisados utilizados (input) foi investigada através de ensaios de western blot (painel inferior) (MxA ~78 kDa, 6xHis-Ubc9 ~19 kDa, 6xHis-SUMO1 ~11 kDa e PMLIII ~70 kDa). As bandas correspondentes às proteínas MxA e PMLIII co-imunoprecipitadas estão indicadas por seta. Anticorpos utilizados: α-pMxA (MxA); α-6xHis Clontech (SUMO1/2/3); α-PML SantaCruz (PMLIII) e α-Ubc9 Abgent (Ubc9). Número amostral = 3.



**FIGURA 14. Ensaio de co-localização de MxA com proteínas da maquinaria de SUMOilação.**

Ensaio de co-localização por imunofluorescência indireta utilizando células da linhagem HeLa transfectadas com os plasmídeos pcDNA3.1-MxA e pcLTR-6xHis-Ubc9 (A) e pcDNA3.1-MxA e pcDNA3.1-6xHis-SUMO1 (B). As proteínas de interesse foram marcadas pelo emprego de anticorpos específicos. A cromatina celular foi marcada com DAPI (fluorescência azul). Como anticorpos secundários foram utilizados anti-IgG conjugado a Alexa Fluor 488 (fluorescência verde) ou Alexa fluor 594 (fluorescência vermelha). As imagens foram combinadas pelo emprego do software ImageJ (Merged). Anticorpos utilizados:  $\alpha$ -pMxA (MxA),  $\alpha$ -SUMO1 (SUMO1) e  $\alpha$ -Ubc9 Abgent (Ubc9). Um aumento de 100x foi utilizado.

### 4.3. Obtenção e caracterização de mutantes de MxA.

Os possíveis sítios de interação física e/ou SUMOilação de MxA foram identificados na sua sequência primária e mutantes foram obtidos para os ensaios de interação proteína-proteína por duplo-híbrido ou ensaios de SUMOilação *in vivo*.

#### 4.3.1. Análise da sequência primária de MxA.

Após a confirmação da interação física entre MxA e SUMO1, foram iniciadas investigações para definir o sítio de interação entre estas. Neste sentido, como previamente discutido, SUMO1 e seus parálogos estão envolvidos em um processo de modificação pós-traducional denominado SUMOilação. Neste processo, como apresentado na Introdução, uma ou mais proteínas SUMO são conjugadas a um resíduo de lisina acceptor na proteína alvo (Figura 7). Ainda, SUMO1 e seus parálogos são capazes de interagir fisicamente com outras proteínas através de uma série de sequências de interação (SIM – SUMO-Interacting Motifs) (JÜRGEN DOHMEN, 2004.; DA SILVA-FERRADA et al., 2012.).

Como também apresentado na Introdução, estão definidos três sequências consenso de interação física às proteínas SUMO, a saber: SIMa ( $\Psi\Psi x \Psi AcAcAcAcAc$ ), SIMb ( $\Psi\Psi DLT$ ) e SIMr ( $AcAcAcAcAc\Psi x \Psi\Psi$ ) (Figura 7). O emprego de ferramentas de bioinformática ou a análise manual da sequência primária de MxA revelou a presença no domínio GTPase de duas prováveis sequências consenso de interação com SUMO, uma do tipo SIMb (VPDLT), situada entre os aminoácidos V171-T175, e uma do tipo SIMa (VVDV), situada entre os aminoácidos V260-V263.

Ainda, a presença entre os ligantes prováveis de MxA revelados por duplo-híbrido de proteínas com função de E3 ligase para o processo de SUMOilação (CBX4 e PIAS1) e a confirmação da interação de MxA com SUMO1 e Ubc9, essa última correspondendo a enzima E2 de conjugação para o processo de SUMOilação, levanta a possibilidade de MxA ser alvo desta modificação pós-traducional.

Utilizando-se das mesmas ferramentas de bioinformática, foi possível investigar a sequência primária de MxA para possíveis sítios de SUMOilação, ou seja, de modificação covalente. Esses sítios são determinados por uma sequência consenso (CM, do inglês: Consensus Motif). Para as proteínas SUMO existem uma série dessas sequências, sendo CM ( $\Psi K x E/D$ ) e sua forma inversa ICM ( $E/D x K\Psi$ ) as mais frequentes (Figura 7). No caso específico de MxA, foi possível verificar que duas sequências apresentam uma alta probabilidade de serem alvos da modificação por

SUMO, a saber: ICM1 (EEKV), situada entre os aminoácidos V47-E50, e ICM2 (EDKV), situada entre os aminoácidos V258-E261.

A Tabela 7 sumariza os resultados obtidos pela análise da sequência de aminoácidos de MxA, direta ou inversa, nos softwares SUMOplot e SUMOsp. Dentre todas as sequências reveladas pela análise de bioinformática, três sequências (SIMa, ICM1 e ICM2) apresentam uma maior possibilidade de serem os sítios de interação ou modificação, pois apresentam um maior valor de “score” e um menor “cut-off”.

A Figura 15A apresenta a conservação das sequências consensuais identificadas através da análise de frequência dos aminoácidos, adjacentes ao ponto central das sequências SIM ou da provável lisina aceptora de SUMOilação, realizada pela ferramenta WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu>). Como pode ser observado, as duas regiões identificadas apresentam um alto grau de conservação, fato este esperado, uma vez que estas se encontram dentro do domínio GTPase e em regiões próximas ao sítios de ligação da molécula de GTP. A Figura 15B apresenta a posição das sequências consensuais identificadas em relação aos domínios de MxA, alteradas nos mutantes gerados (SIMb, SIMa, K48R e K259R).

Ainda, para determinar a importância da oligomerização de MxA na ligação com seus parceiros físicos, o mutante MxA<sub>L612K</sub>, sem a capacidade de oligomerização (JANZEN et al., 2000), foi também gerado e incluído nos ensaios. Este mutante também está apresentado nos painéis A e B da Figura 15, onde é possível verificar que esse resíduo de aminoácido está localizado em uma região de maior variabilidade do que as demais regiões da proteína MxA apresentadas na Figura 15.

### 4.3.2. Obtenção e caracterização dos mutantes de MxA.

A obtenção dos mutantes de MxA foi realizada através de mutação sítio-dirigida. Assim, o plasmídeo pcDN3.1-MX1<sub>WT</sub> (pVZ1391) foi submetido a uma série de procedimento de mutações por PCR, gerando os plasmídeos pcDNA3.1-MX1<sub>K48R</sub> (pVZ1420 – VZO1689,VZO1690), pcDNA3.1-MX1<sub>K259R</sub> (pVZ1419 – VZO1691,VZO1692), pcDNA3.1-MX1<sub>SIMb</sub> (pVZ1392 – VZO1693,VZO1694), pcDNA3.1-MX1<sub>SIMa</sub> (pVZ1523 – VZO1893,VZO1894) e pcDNA3.1-MX1<sub>L612K</sub> (pVZ1402 – VZO715,VZO716). Ainda, o plasmídeo pcDNA3.1-MX1<sub>K48R</sub> (pVZ1420) foi empregado na obtenção do mutante duplo de MX1 pcDNA3.1-MX1<sub>K48R/K259R</sub> (pVZ1425). Todos os mutantes obtidos foram confirmados por sequenciamento (dados não mostrados).

Uma vez obtidos os mutantes, estes foram submetidos a teste de expressão e a ensaio de oligomerização. A Figura 16A mostra o ensaio de expressão das formas mutadas de MxA. Para a realização deste ensaios, células da linhagem HeLa foram transfectadas com os plasmídeos de interesse e cultivadas por diferentes períodos (12, 24 e 48 horas). Extratos totais (50 ug) destas células, obtidos e tratados em condições desnaturantes, foram submetidos a eletroforese em SDS-PAGE 12% e analisados por western blot. Neste experimento, a detecção da proteína actina foi utilizada como controle de carregamento dos extratos. Como pode ser observado, todos os mutantes obtidos estão sendo expressos e no tamanho esperado. Observa-se também que os mutantes MxA<sub>K259R</sub> e MxA<sub>L612K</sub> são menos estáveis que a proteína MxA selvagem, uma vez que as quantidades das proteínas observadas em todos os tempos de cultivo são significativamente menores. Esse dado já era conhecido para o mutante MxA<sub>L612K</sub>, pois foi mostrado que esse mutante apresenta um tempo de meia-vida menor em relação à proteína selvagem (JANZEN et al., 2000).

A Figura 16B mostra o resultado obtido para o ensaio de oligomerização dos mutantes de MxA submetidos a eletroforese em condições não desnaturantes. Extratos totais de células HeLa transfectadas com os plasmídeos de interesse e cultivadas por 24 horas foram preparados em tampão de corrida sem agentes desnaturantes e 50 ug de cada um dos extratos obtidos foram utilizados para a eletroforese em gel Bis-Tris com gradiente de concentração de 4%-12% (Lifetechnologies) e, posteriormente, analisados por western blot. Como pode ser observado, os mutantes MxA<sub>K259R</sub>, MxA<sub>K48R/K259R</sub> e MxA<sub>L612K</sub> perdem a capacidade de oligomerização por completo, enquanto os demais mutantes MxA<sub>SIMb</sub>, MxA<sub>SIMa</sub> e MxA<sub>K48R</sub> mantêm a capacidade de oligomerização, em diferentes intensidades, quando comparados com a forma selvagem da proteína MxA. Dessa forma, os mutantes MxA<sub>K259R</sub> e MxA<sub>K48R/K259R</sub> foram excluídos das análises posteriores por apresentarem padrões não desejáveis de expressão, estabilidade e oligomerização.

Após a análise da expressão e oligomerização dos mutantes de MxA, o padrão de distribuição celular da proteína MxA também foi investigado. Para tanto, células da linhagem HeLa foram, novamente, transfectadas com os plasmídeos de interesse e submetidas ao ensaio de Imunofluorescência indireta. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 17. Neste ensaio é possível observar que o mutante monomérico MxA<sub>L612K</sub> encontra-se completamente difuso no citoplasma celular como anteriormente descrito (JANZEN et al., 2000). O padrão de distribuição citoplasmática, com granulações, dos demais mutantes pouco difere do padrão observado para a proteína MxA selvagem.

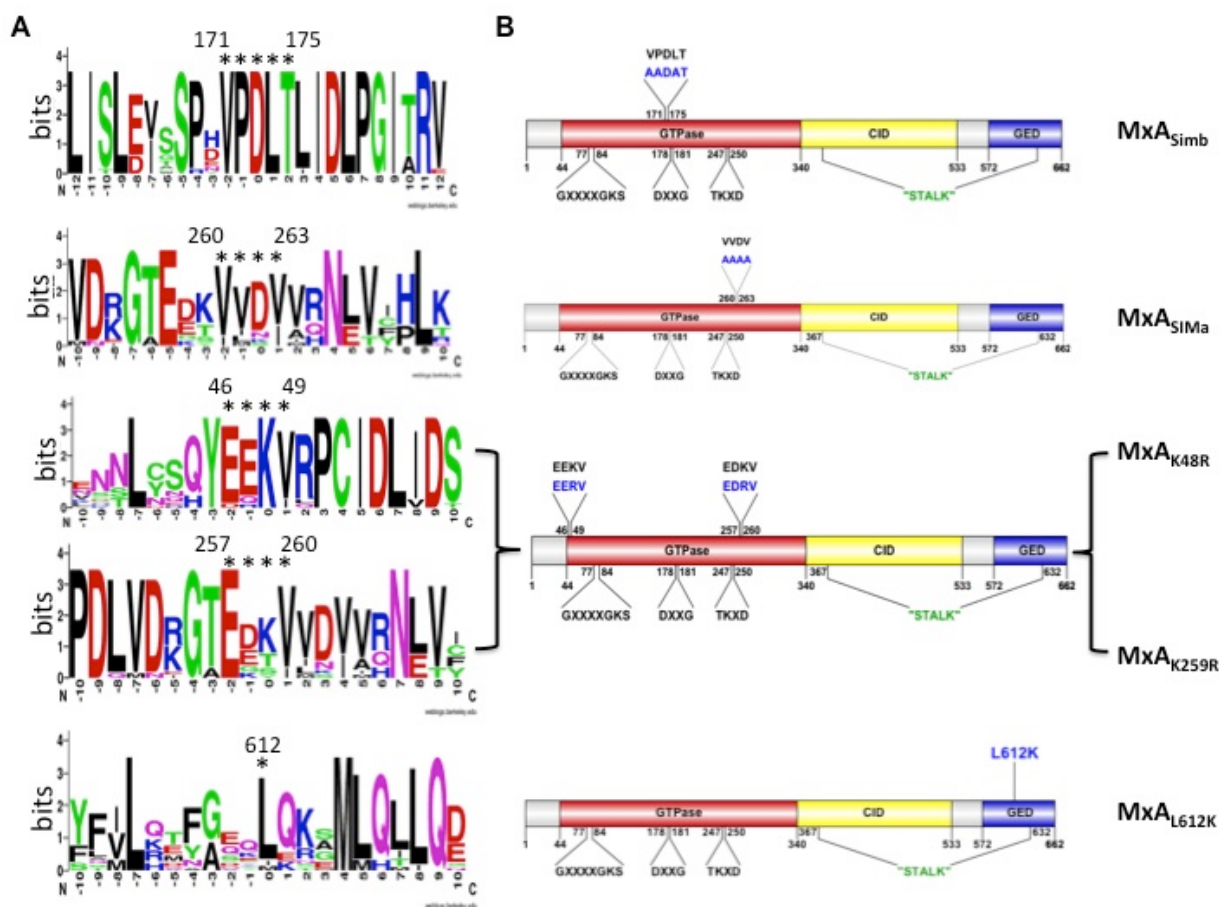
## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

**TABELA 7** – Predição de sítios de ligação a SUMO e SUMOilação em MxA.

| Software                                                                                              | Direcionamento | Posição    | Sequência                           | Score         | Cut-off      | Tipo                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|------------|-------------------------------------|---------------|--------------|--------------------------|
| SUMOsp<br><a href="http://sumosp.biocuckoo.org/online.php">http://sumosp.biocuckoo.org/online.php</a> | MxA            | 31         | GDATVAQKNPGSVAE                     | 24.34         | 24.337       | SUMOilação               |
|                                                                                                       | MxA            | 459        | RTFETIVKQQIKALE                     | 35.401        | 35.288       | SUMOilação               |
|                                                                                                       | <b>MxA</b>     | <b>260</b> | <b>GTEDK<b>VVDV</b>VRNLV</b>        | <b>7.348</b>  | <b>0.17</b>  | <b>SIM (SIMa)</b>        |
|                                                                                                       | MxA            | 243        | DPEGDRITGILTKPDLVDK                 | 58.13         | 55.31        | SIM                      |
|                                                                                                       | MxA            | 73         | QDLALPAIAVIGDQSSGKS                 | 58.079        | 55.31        | SIM                      |
|                                                                                                       | MxA            | 53         | EEKVRPCIDLIDSLRALGV                 | 57.696        | 55.31        | SIM                      |
|                                                                                                       | MxA            | 212        | YIQRQETISLVVPSNVDI                  | 56.789        | 55.31        | SIM                      |
|                                                                                                       | <b>MxA inv</b> | <b>261</b> | <b>VLNR<b>VVDV</b>VKDET<b>G</b></b> | <b>7.348</b>  | <b>0.17</b>  | <b>SIM (SIMa)</b>        |
|                                                                                                       | <b>MxA inv</b> | <b>259</b> | <b>NRVVDV<b>VKDE</b>TGKDV</b>       | <b>45.561</b> | <b>15.22</b> | <b>SUMOilação (ICM2)</b> |
|                                                                                                       | <b>MxA inv</b> | <b>48</b>  | <b>LDICPR<b>VKEE</b>YQSCL</b>       | <b>43.382</b> | <b>15.22</b> | <b>SUMOilação (ICM1)</b> |
|                                                                                                       | MxA inv        | 119        | YSVKGRWKDENVLKK                     | 28.155        | 15.22        | SUMOilação               |
|                                                                                                       | MxA inv        | 317        | ALCPVTAKGEELLDR                     | 18.048        | 15.22        | SUMOilação               |
|                                                                                                       | MxA inv        | 123        | EYDQYSVKGRWKDEN                     | 37.285        | 35.288       | SUMOilação               |
|                                                                                                       | MxA inv        | 216        | AIDVNSPVVLSITEQRQI                  | 67.777        | 55.31        | SIM                      |
|                                                                                                       | MxA inv        | 21         | AVTADGNLLPHSAAAPDA                  | 61.453        | 55.31        | SIM                      |
|                                                                                                       | MxA inv        | 55         | GLARLSDILDICPRVKEEY                 | 60.181        | 55.31        | SIM                      |
|                                                                                                       | MxA inv        | 522        | IQEMQFHLRILKEGEREQE                 | 58.693        | 55.31        | SIM                      |
|                                                                                                       | MxA inv        | 598        | QLMFFQIILPIHSSIRKSA                 | 57.836        | 55.31        | SIM                      |
|                                                                                                       | MxA inv        | 75         | KGSSQDGIVAIAPLALDQE                 | 57.296        | 55.31        | SIM                      |
|                                                                                                       | MxA inv        | 178        | AVRTIGPLDILTDPVDRS                  | 56.977        | 55.31        | SIM                      |
|                                                                                                       | MxA inv        | 378        | IDQNFANVKDILFFMKENE                 | 56.589        | 55.31        | SIM                      |
|                                                                                                       | MxA inv        | 619        | SYTDKDQLQLMAKQLQQG                  | 56.191        | 55.31        | SIM                      |
|                                                                                                       | MxA inv        | 334        | LLPLSKCIHTILESTLKEA                 | 55.527        | 55.31        | SIM                      |
| SUMOplot<br><a href="http://www.abgent.com/tools">http://www.abgent.com/tools</a>                     | MxA            | 10         | SEVDIAKADPAAAS                      | 0.79          | N.E.         | SUMOilação               |
|                                                                                                       | MxA            | 272        | NLVFHLKKGMYMIVK                     | 0.73          | N.E.         | SUMOilação               |
|                                                                                                       | MxA            | 490        | FTDVSINKNFEEFFN                     | 0.59          | N.E.         | SUMOilação               |
|                                                                                                       | MxA            | 435        | LSRKIQKFENQYRG                      | 0.5           | N.E.         | SUMOilação               |
|                                                                                                       | MxA            | 31         | DATVAQKNPGSVAE                      | 0.39          | N.E.         | SUMOilação               |
|                                                                                                       | MxA            | 359        | ITEELQKYGVDIPE                      | 0.33          | N.E.         | SUMOilação               |
|                                                                                                       | MxA            | 371        | PEDENEKMFFLIDK                      | 0.15          | N.E.         | SUMOilação               |
|                                                                                                       | MxA            | 300        | EALQREKIFFENHP                      | 0.15          | N.E.         | SUMOilação               |
|                                                                                                       | <b>MxA inv</b> | <b>48</b>  | <b>DICPR<b>VKEE</b>YQSCL</b>        | <b>0.93</b>   | <b>N.E.</b>  | <b>SUMOilação (ICM1)</b> |
|                                                                                                       | <b>MxA inv</b> | <b>259</b> | <b>RVVDV<b>VKDE</b>TGKDV</b>        | <b>0.93</b>   | <b>N.E.</b>  | <b>SUMOilação (ICM2)</b> |
|                                                                                                       | MxA inv        | 317        | LCPVTAKGEELLDR                      | 0.79          | N.E.         | SUMOilação               |
|                                                                                                       | MxA inv        | 197        | KILTKIKYGIDAPQ                      | 0.77          | N.E.         | SUMOilação               |
|                                                                                                       | MxA inv        | 427        | IKRSLIKHGEQFNN                      | 0.77          | N.E.         | SUMOilação               |
|                                                                                                       | MxA inv        | 519        | FHLRILKEGEREQE                      | 0.73          | N.E.         | SUMOilação               |
|                                                                                                       | MxA inv        | 119        | SVKGRWKDENVLKK                      | 0.64          | N.E.         | SUMOilação               |
|                                                                                                       | MxA inv        | 554        | DWSKKKKKEEELEKE                     | 0.48          | N.E.         | SUMOilação               |
|                                                                                                       | MxA inv        | 555        | FDWSKKKKKEEELEK                     | 0.48          | N.E.         | SUMOilação               |
|                                                                                                       | MxA inv        | 413        | EIITSWKHFEHRLR                      | 0.29          | N.E.         | SUMOilação               |
|                                                                                                       | MxA inv        | 644        | LRALREKLFKRKDS                      | 0.15          | N.E.         | SUMOilação               |

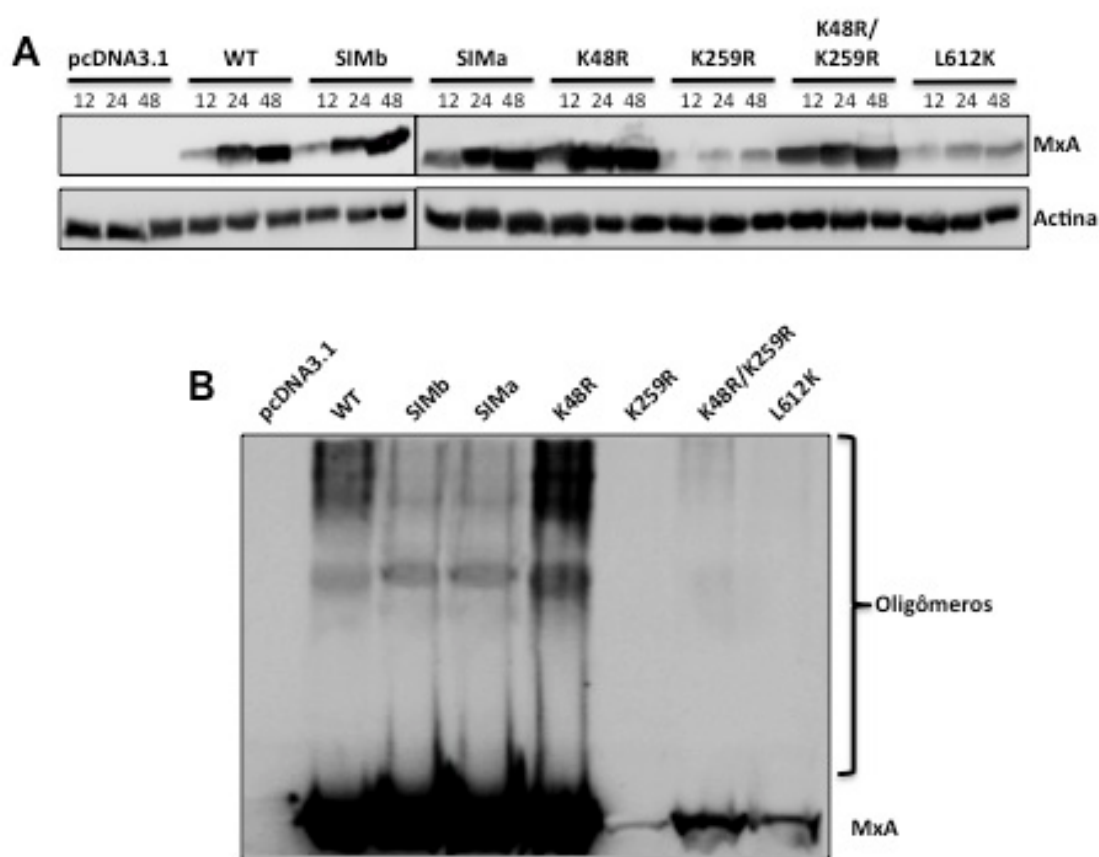
N.E. - não especificado inv - Sequência inversa ICM - sítio consenso de SUMOilação invertido

SIMa - sítio de interação com SUMO do tipo A



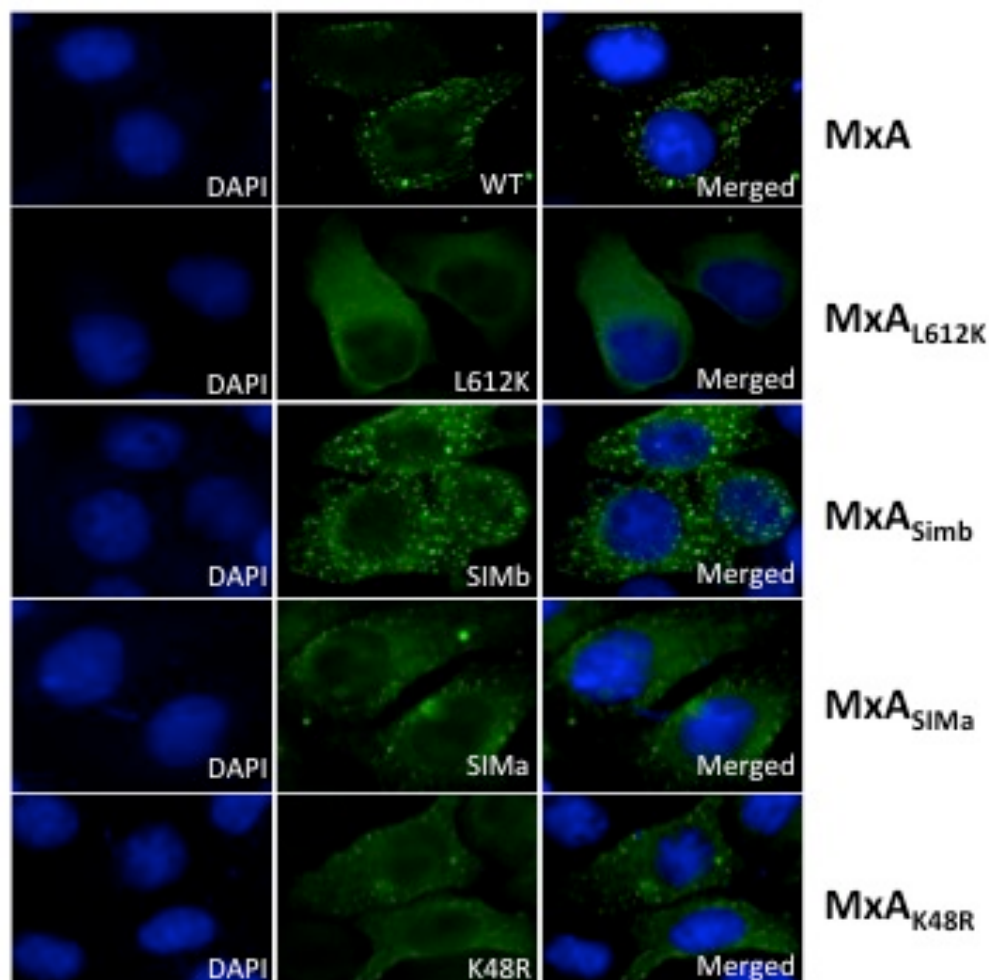
**FIGURA 15. Análise da conservação das regiões mutadas de MxA, bem como a localização das mutações em relação aos seus domínios.**

**A.** Análise da conservação dos aminoácidos presentes nas sequências de interesse e nas suas regiões adjacentes (<http://weblogo.berkeley.edu>). Sequências utilizadas no alinhamento e, posterior, obtenção do WebLogo: Mx de humanos: MxA (huMxA, A33481) e MxB (huMxB, B33481); Mx de cães: Mx1 (caMx1, AAF44684) e Mx2 (caMx2, AAF44685); Mx1 de porcos (poMx1, P27594); Mx1 de bovinos (boMx1, P79135); Mx de ovinos (ovMx, P33237); Mx de camundongos: Mx1 (muMx1, NP\_034976) e Mx2 (muMx2, NP\_038634); Mx de ratos: Mx1 (ratMx1, P18588), Mx2 (ratMx2, P18589) e Mx3 ratos (ratMx3, P18590); Mx de galinhas (chMx, Q90597); Mx de patos (duMx, P33238); Mx de salmão do atlântico: Mx1 (asMx1, AAB40994), Mx2 (asMx2, AAB40995) e Mx3 (asMx3, AAB40996) e Mx de linguado (hhMx, AAF66055). Os resíduos de aminoácidos marcados com (\*) são os resíduos constituintes das sequências consensuais de interesse. **B.** Localização das mutações geradas em relação aos domínios de MxA. Os resíduos de aminoácidos modificados pelo processo de mutação sítio-dirigida estão indicados em relação aos domínios de MxA. Os números indicam a posição dos resíduos de aminoácidos na sequência primária de MxA.



**FIGURA 16. Ensaio de expressão e oligomerização dos mutantes de MxA.**

**A.** Análise de expressão de MxA e seus mutantes. Células da linhagem HeLa foram transfectadas com os plasmídeos pcDNA3.1, pcDNA3.1-MX1<sub>WT</sub>, pcDNA3.1-MX1<sub>SIMb</sub>, pcDNA3.1-MX1<sub>SIMa</sub>, pcDNA3.1-MX1<sub>K48R</sub>, pcDNA3.1-MX1<sub>K259R</sub>, pcDNA3.1-MX1<sub>K48R/K259R</sub> e pcDNA3.1-MX1<sub>L612K</sub> e incubadas por 12, 24 ou 48 horas. Extratos totais de proteínas (50 ug) foram submetidos à eletroforese em SDS-PAGE e, posteriormente, ao ensaio de western blot. As proteínas foram identificadas pelo emprego de anticorpo policlonal anti-MxA. A proteína actina foi utilizada como controle de carregamento. **B.** Ensaio de oligomerização de MxA e seus mutantes. Western blot dos extratos totais de células da linhagem HeLa transfectadas com os mesmos plasmídeos acima e incubadas por 24 horas. Extratos totais de proteínas (50 ug) foram submetidos à eletroforese, em condições não desnaturantes. As proteínas foram identificadas pelo emprego de anticorpo policlonal anti-MxA. Anticorpos utilizados:  $\alpha$ -pMxA (MxA) e  $\alpha$ -Actina (actina). Número amostral = 2.



**FIGURA 17. Análise da distribuição celular de MxA e seus mutantes.**

Ensaio de imunofluorescência indireta utilizando células da linhagem HeLa transfectadas com os plasmídeos pcDNA3.1-MX1, pcDNA3.1-MX1<sub>L612K</sub>, pcDNA3.1-MX1<sub>SIMb</sub>, pcDNA3.1-MX1<sub>SIMa</sub> ou pcDNA3.1-MX1<sub>K48R</sub>. A proteína MxA e seus mutantes foram marcados pelo emprego de anticorpo policlonal anti-MxA. A cromatina celular foi marcada com DAPI (fluorescência azul). Como anticorpo secundário foi utilizado anti-IgG conjugado a Alexa Fluor 488 (fluorescência verde). As imagens foram combinadas pelo emprego do software ImageJ (Merged). Anticorpo utilizado:  $\alpha$ -pMxA (MxA).

### 4.4. Mapeamento dos sítios de interação física entre MxA e SUMO1 ou Ubc9, por duplo-híbrido.

O sistema de duplo-híbrido é baseado na importante característica modular de uma série de fatores de transcrição eucarióticos, bastante estudados durante os anos 80 (FIELDS e STERNGLANZ, 1994). Esses estudos mostraram que o domínio de ligação ao DNA (binding domain - BD) e o domínio de ativação da transcrição (activation domain - AD) desses fatores podem ser separados fisicamente, mantendo sua funcionalidade (BRENT e PTASHNE, 1985; HOPE e STRUHL, 1986; KEEGAN et al., 1986). O domínio BD é responsável pela ligação do fator a sequências específicas do DNA genômico, enquanto o domínio AD recruta a maquinaria de síntese de mRNA para ativar a transcrição gênica. Para que a transcrição seja ativada, os domínios BD e AD não precisam pertencer ao mesmo fator e nem precisam estar presentes no mesmo polipeptídeo (BRENT e PTASHNE, 1985; MA e PTASHNE, 1988). Assim, quando os domínios BD e AD de um fator de transcrição estão separados, a transcrição de um determinado gene não pode ser ativada. No entanto, se os domínios BD e AD forem aproximados através da fusão desses domínios com proteínas que interagem fisicamente, a ativação transcricional é reconstituída no local do DNA onde existe o sítio de ligação do domínio BD.

O sistema de duplo-híbrido utilizado é baseado nas propriedades das proteínas Gal4 de levedura e LexA de procarioto e utiliza a linhagem L40 de *Saccharomyces cerevisiae* que contém dois genes repórteres do sistema de duplo-híbrido *HIS3* e *lacZ*. Quando a proteína em fusão com LexA (BD) é capaz de interagir fisicamente com a proteína em fusão com o domínio de ativação de Gal4 (Gal4-AD) ocorre a ativação dos genes repórteres (*HIS3* e *lacZ*).

Este objetivo buscou caracterizar o local de interação entre MxA e os ligantes SUMO1 e Ubc9, revelados no rastreamento de duplo-híbrido e confirmados por ensaios de co-imunoprecipitação. Para tanto, os genes responsáveis pela codificação da proteína MxA e suas formas mutadas foram clonados em vetor pBTM116 (pVZ993, *LEU2*, Kan<sup>r</sup>), enquanto os genes codificantes para as proteínas SUMO, Ubc9 e suas formas mutadas foram clonados no vetor pACT2 (pVZ149, *LEU2*, Amp<sup>r</sup>).

### 4.4.1. Clonagem dos genes MX1, SUMO1/2/3 e Ubc9, selvagem e mutados, em vetores de duplo-híbrido.

Para a realização das clonagens, os genes codificantes para os mutantes MxA<sub>SIMb</sub>, MxA<sub>SIMa</sub> e MxA<sub>L612K</sub>, presentes no vetor pcDNA3.1 e descritos anteriormente (Item 4.3), foram amplificados por PCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores VZO1685 e VZO1688, e clonados no sítio *EcoRI* do vetor pBTM116 (pVZ993). A presença das mutações em cada um dos insertos foi confirmada através de reação de sequenciamento (resultados não mostrados). As construções plasmidiais geradas foram denominadas pBTM116-MX1<sub>SIMb</sub> (pVZ1448), pBTM116-MX1<sub>SIMa</sub> (pVZ1524) e pBTM116-KAN-MxA<sub>L612K</sub> (pVZ1163).

Decidiu-se também obter duas formas truncadas de MxA (Figura 18A). Assim, os domínios de MxA escolhidos foram amplificados por PCR com seus respectivos oligonucleotídeos, sendo: MxA<sub>GTPase</sub> (VZO1685 e VZO1686) e MxA<sub>CID-GED</sub> (VZO1687 e VZO1688). Os produtos de PCR foram clonados no vetor pBTM116 e as construções plasmidiais obtidas foram confirmadas por diagnóstico de restrição e sequenciamento (resultados não mostrados). Os plasmídeos originados receberam os nomes de pBTM116-MxA<sub>GTPase</sub> (pVZ1452) e pBTM116-MxA<sub>CID-GED</sub> (pVZ1457).

Por outro lado, os genes codificantes para SUMO1/2/3 e Ubc9 foram clonados nos sítios de *BamHI* e *XhoI* do vetor pACT2 (pVZ149) a partir da amplificação por PCR dos genes presentes no vetor pcDNA3.1 ou pLTR. Para tal, foram utilizados os seguintes pares de oligonucleotídeos iniciadores: VZO1679 e VZO1680 (SUMO1), VZO1677 e VZO1678 (SUMO2), VZO1675 e VZO1676 (SUMO3) e VZO1681 e VZO1682 (Ubc9). O produto final do procedimento de clonagem foi confirmado por diagnóstico de restrição e sequenciamento (resultados não mostrados). Aos plasmídeos gerados foram atribuídos os nomes: pACT2-SUMO1, pACT2-SUMO2, pACT2-SUMO3 e pACT2-Ubc9.

Também foram gerados 5 mutantes desses genes por mutação sítio-dirigida utilizando como molde os plasmídeos descritos acima. Assim, para SUMO1 foram gerados os plasmídeos pACT2-SUMO1<sub>K37A/K39A</sub> e pACT2-SUMO1<sub>E67A</sub> através da utilização dos pares de oligonucleotídeos VZO1697/VZO1698 e VZO1699/VZO1700, respectivamente. O plasmídeo codificante para SUMO2 foi utilizado na obtenção do plasmídeo pACT2-SUMO2<sub>D71H</sub> (VZO1701 e VZO1702) e o plasmídeo codificante para SUMO3 foi empregado na obtenção do plasmídeo pACT2-SUMO3<sub>D70H</sub> (VZO1703 e VZO1704). Finalmente, um mutante da proteína Ubc9 foi gerado neste estudo. Assim,

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

o plasmídeo pACT2-Ubc9 foi convertido em pACT2-Ubc9<sub>K14R</sub> pelo emprego dos oligonucleotídeos VZO1695 e VZO1696. Da mesma forma, as mutações foram confirmadas por sequenciamento (resultados não mostrados).

### 4.4.2. Verificação da produção das formas mutadas de MxA, SUMO e Ubc9.

Após os procedimentos de clonagem, a linhagem L40 foi transformada com os plasmídeos descritos acima. Estas linhagens foram submetidas à verificação da produção das proteínas MxA, selvagem e mutada, em fusão com Lex-A por western blot com o anticorpo anti-LexA (1:5.000). Lisados provenientes da linhagem L40 (SVL86) e L40 contendo o vetor plasmidial pBTM116 (VZL929) foram utilizados como controle. Como pode ser visto na Figura 18B, a linhagem L40 não apresenta a banda da proteína LexA e a linhagem L40 contendo pBTM116 produz apenas a proteína LexA (~22 kDa). Ainda, é possível verificar as bandas correspondentes às proteínas de fusão: LexA-MxA<sub>WT</sub>, LexA-MxA<sub>SIMb</sub>, LexA-MxA<sub>SIMa</sub> e LexA-MxA<sub>L612K</sub> (~100 kDa), e LexA-MxA<sub>GTPase</sub> e LexA-MxA<sub>CID-GED</sub> (~60 kDa), produzidas pelas suas respectivas linhagens, confirmando assim a produção das proteínas MxA selvagem e mutadas.

Os mesmos procedimentos de checagem foram realizados para os plasmídeos obtidos com o vetor pACT2. Assim, estas linhagens foram submetidas à verificação da produção das proteínas de fusão com Gal4-AD por western blot com o anticorpo anti-HA (1:5.000). Lisados provenientes da linhagem L40 (SVL86) e L40 contendo o vetor plasmidial pACT2 (149) foram utilizados como controle. Como pode ser visto na Figura 18C, a linhagem L40 não apresenta a banda relativa a proteína Gal4-AD e a linhagem L40 contendo pACT2 produz apenas a proteína Gal4-AD (~15 kDa). Ainda, é possível verificar as bandas correspondentes às proteínas de fusão: Gal4-AD-SUMO1<sub>WT</sub>, Gal4-AD-SUMO1<sub>K37A/K39A</sub>, Gal4-AD-SUMO1<sub>E67A</sub>, Gal4-AD-SUMO2<sub>WT</sub>, Gal4-AD-SUMO2<sub>D71H</sub>, Gal4-AD-SUMO3<sub>WT</sub> e Gal4-AD-SUMO3<sub>D70H</sub>, (~27 kDa), e Gal4-AD-Ubc9<sub>WT</sub> e Gal4-AD-Ubc9<sub>K14R</sub>, (~33 kDa), produzidas pelas suas respectivas linhagens, confirmando assim a produção das proteínas SUMO1/2/3 e Ubc9, selvagem e mutadas.

### 4.4.3. Testes de autoativação das proteínas MxA, SUMO e Ubc9, selvagem e mutadas, em fusão com LexA ou Gal4-AD.

Confirmada a produção das proteínas de fusão com LexA e Gal4-AD, foi realizada a análise da capacidade de autoativação dos genes repórteres do sistema de duplo-híbrido, individualmente, pelas proteínas MxA, SUMO1/2/3 e Ubc9, selvagem e

mutadas. Para tanto, as linhagens de L40 contendo as construções acima foram transformadas com o vetor pACT2 (pSV149), no caso das construções de MxA em pBTM116, ou com o vetor pBTM116 (pVZ993), no caso das construções de SUMO e Ubc9 em pACT2.

Como controles para o teste de autoativação, interações entre proteínas já caracterizadas em nosso laboratório foram utilizadas como controles deste sistema (THOMPSON et al., 2003). Assim, foram utilizadas como controles positivo forte (++) e positivo fraco (+), respectivamente, eIF5A e Dys1 (VZL899) e eIF5A e Lia1 (VZL900). Ainda, a linhagem L40 expressando apenas o gene eIF5A na presença do vetor pACT (VZL901) foi utilizada como controle negativo de interação (-).

A Figura 19 apresenta o teste de autoativação do sistema de duplo-híbrido pelos produtos dos plasmídeos gerados, através da análise do fenótipo de crescimento em meio SC -leu,-trp,-his (repórter *HIS3*), com ou sem 0.5 mM de 3-aminotriazol (3AT), e do teste de  $\beta$ -galactosidase (repórter *lacZ*). O resultado apresentado indica que não há autoativação do sistema pelas formas selvagem e mutadas de MxA e Ubc9, uma vez que não houve crescimento no meio SC-leu,-trp,-his e ausência de coloração azul no teste de  $\beta$ -galactosidase. O resultado também indica que a concentração utilizada de 3AT é suficiente para a inibição do efeito de autoativação de SUMO1 e seus parálogos. No caso das proteínas SUMO1/2/3 a sua capacidade de ligar e SUMOilar proteína pode ter gerado interações inespecíficas com proteínas da levedura que se ligam a proteína LexA ou, até mesmo, ao promotor utilizado para o controle da expressão do repórter *HIS3*. Com estes resultados confirmados, foi dado início aos ensaios de duplo-híbrido.

#### 4.4.4. Análise da interação física entre MxA e SUMO1/2/3 ou Ubc9, por duplo-híbrido

Para a realização do ensaio, cada uma das linhagens produzindo Gal4-AD-SUMO1<sub>WT</sub>, Gal4-AD-SUMO2<sub>WT</sub>, Gal4-AD-SUMO3<sub>WT</sub> ou Gal4-AD-Ubc9<sub>WT</sub> foram transformadas, individualmente, com a construção plasmidial codificante para LexA-MxA<sub>WT</sub> e testadas para a capacidade de ativação dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ*.

A Figura 20 ilustra o resultado obtido para a interação entre MxA e SUMO1/2/3 ou MxA e Ubc9 por duplo-híbrido. Como esperado, MxA interage com SUMO1 e Ubc9 por duplo-híbrido. Ainda, MxA não interage com SUMO2 e SUMO3, confirmando os resultados da co-imunoprecipitação. Sendo assim, fica provado por duas abordagens experimentais que MxA interage com SUMO1 e também com Ubc9.

### 4.4.5. Avaliação da participação das sequências SIM (SIMb e SIMa) na interação de MxA com SUMO1.

Uma vez reconfirmada a interação de MxA com SUMO1, foi dado início ao ensaio de determinação da superfície de interação entre essas. Para tanto, a linhagem L40 contendo o plasmídeo codificante para Gal4-AD-SUMO1<sub>WT</sub> foi transformada com os plasmídeos codificantes para os mutantes de SIM de MxA: pBTM116-MX1<sub>SIMb</sub> (pVZ1448) e pBTM116- MX1<sub>SIMa</sub> (pVZ1524). Após crescimento, os transformantes foram testados para a ativação dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ*.

A Figura 21 ilustra o resultado obtido para a interação entre MxA<sub>WT</sub>, MxA<sub>SIMb</sub> e MxA<sub>SIMa</sub> com SUMO1<sub>WT</sub>. Ao contrário do que se esperava, esses mutantes de MxA ainda possuem capacidade de interagir fisicamente com SUMO1. Assim, os aminoácidos mutados nas sequências SIM da proteína MxA não são aqueles envolvidos diretamente com a interação entre MxA e SUMO1.

O resultado apresentado para a sequência SIMb da Figura 21 foi confirmado por ensaios de co-imunoprecipitação. Neste ensaios, os plasmídeos codificantes para MxA<sub>WT</sub> ou MxA<sub>SIMb</sub> foram co-transfectados com plasmídeos codificantes para SUMO1<sub>WT</sub> ou SUMO1<sub>G</sub>, este último codificando para a proteína SUMO1 desprovida de capacidade de SUMOilação. Os resultados obtidos mostraram que as formas selvagem e mutada (SIMb) de MxA ainda interagiam com SUMO, independente de sua capacidade de SUMOilação (SUMO1<sub>WT</sub> ou SUMO1<sub>G</sub>), evidenciando assim que a sequência SIMb presente na sequência primária de MxA não é a responsável pela interação entre MxA e SUMO1 (resultados não apresentados). Além disso, a interação observada entre MxA e SUMO1<sub>G</sub> indica que essas proteínas podem interagir diretamente e não somente através de proteínas SUMOiladas.

### 4.4.6. Mapeamento, por duplo-híbrido, dos domínios de MxA envolvidos na interação com Ubc9 e SUMO1 e avaliação da interferência da oligomerização de MxA nessas interações

O sistema de duplo-híbrido foi utilizado para mapear o domínio de MxA responsável pela interação com as proteínas SUMO1 ou Ubc9 e também para determinar a importância da formação de oligômeros nestas interações. Para a realização do ensaio, cada uma das linhagens produzindo MxA<sub>WT</sub>, MxA<sub>GTPase</sub>, MxA<sub>CIDGED</sub> ou MxA<sub>L612K</sub>, a partir do vetor pBTM116, foram transformadas, individualmente, com as construções plasmidiais codificantes para Ubc9<sub>WT</sub> ou SUMO1<sub>WT</sub>, no vetor pACT2, e

testadas para a capacidade de ativação dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ*.

Como MxA possui capacidade de formar dímeros/oligômeros, foi utilizado inicialmente, como controle, a capacidade da proteínas MxA<sub>WT</sub>, MxA<sub>GTPase</sub>, MxA<sub>CID-GED</sub> ou MxA<sub>L612K</sub> interagirem com a proteína MxA<sub>181-662</sub>, recuperada, durante o Mestrado, no rastreamento de duplo-híbrido utilizando MxA<sub>WT</sub> como “isca”. A proteína MxA<sub>181-662</sub> não possui cerca de metade dos resíduos de aminoácidos do domínio GTPase presente na região N-terminal, assim, esta proteína só estabelece ligação MxA-MxA por meio do domínio CID-GED.

Deste modo, como esperado, o teste de interação entre a forma mutada MxA<sub>181-662</sub>, presente no vetor pACT2, e as demais formas mutadas de MxA, presentes no vetor pBTM116, apresentou uma forte interação com a proteína MxA<sub>WT</sub>, que retém a capacidade de formar oligômeros, e uma interação moderada com o mutante MxA<sub>CID-GED</sub>, evidenciando a capacidade de formação de dímeros (Figura 22A). Ainda, foi observado um resultado negativo de interação com a construção MxA<sub>GTPase</sub>. Isto se explica pelo fato de o domínio GTPase não estar completo na proteína MxA<sub>181-662</sub>, não podendo assim se associar a moléculas de GTP, o que é determinante para o estabelecimento da interação física com o mesmo domínio presente em MxA<sub>GTPase</sub>. Outro resultado obtido, foi a não interação entre MxA<sub>181-662</sub> e o mutante MxA<sub>L612K</sub>, resultado este esperado, pois tal mutante foi caracterizado como monomérico (JANZEN et al., 2000). Estes resultados validam o experimento de duplo-híbrido utilizado nesse estudo.

A Figura 22 apresenta ainda os resultados obtidos de interação de formas mutadas de MxA com Ubc9 (Figura 22B) ou com SUMO1 (Figura 22C). Como pode ser observado, a interação entre MxA e Ubc9 está prejudicada com o mutante MxA<sub>GTPase</sub> e completamente abolida com o mutante MxA<sub>CID-GED</sub>. Contrariamente, a interação entre MxA e SUMO1 é afetada pelo mutante MxA<sub>CID-GED</sub> e abolida na mutação MxA<sub>GTPase</sub>. Como demonstrado pelos resultados aqui apresentados, a formação de oligômero de MxA é importante para a ligação de MxA com Ubc9 e SUMO1, já que o mutante monomérico MxA<sub>L612K</sub> mostrou uma redução na ligação com esses ligantes..

Em relação a interação entre MxA e Ubc9, os resultados sugerem que o domínio GTPase é essencial para a interação, embora a ausência do domínio CID-GED enfraqueça a interação. De acordo com esse resultado, foi demonstrado para a proteína Drp1 (proteína relacionada a dinamina 1) que os domínios GTPase e um domínio localizado entre os domínios CID e GED estão envolvidos na interação com

Ubc9 (FIGUEROA-ROMERO et al. 2009). De modo curioso, as prováveis lisinas aceptoras da SUMOilação de MxA estão situadas no domínio GTPase, essas lisinas e seus aminoácidos adjacentes seriam, possivelmente, o local de interação entre MxA e o sítio ativo de Ubc9.

Os resultados obtidos com MxA e SUMO1 sugerem que o sítio de interação entre essas proteínas esteja localizado no domínio CID-GED (*stalk*) de MxA e não no domínio GTPase. Novamente, deve ser ressaltado, que a ausência do domínio GTPase interfere negativamente na interação, mas não é essencial para seu estabelecimento. Embora MxA possua no domínio GTPase duas sequências de interação com SUMO (SIMb e SIMa), foi mostrado anteriormente (Item 4.4.5) que proteínas mutadas nessas sequências continuam a interagir com SUMO1 (Figura 21). Interessantemente, um outro membro da superfamília de GTPases dinaminas, a proteína Dyn1, também interage com a proteína SUMO1 através do domínio GED (MISHRA et al., 2004).

### **4.4.7. Identificação, por duplo-híbrido, das regiões de SUMO envolvidas na interação com a proteína MxA.**

De acordo com os resultados obtidos até aqui, a interação entre MxA e SUMO1 não ocorre por meio das sequências SIMb e SIMa, que estão presentes no domínio GTPase (Figura 21), mas sim através de uma região presente no domínio CID-GED (Figura 22). De acordo com os resultados obtidos, as interações de SUMO1 com as proteínas Ubc9, Dyn1, DPP9 e DPP8 ocorrem de forma independente de sequência SIM (MISHRA et al., 2004; KNISPCHEER et al., 2007; PILLA et al., 2012). No caso dessas interações, uma alça da proteína SUMO1 contendo o resíduo de ácido glutâmico na posição 67 (EIL – E67-interacting loop) seria a responsável pela interação e não a região de SUMO responsável por interagir com sequências SIM (SIG – SUMO-interacting groove). Como a região EIL é o local de interação de Ubc9 com SUMO1 (KNISPCHEER et al., 2007), a confirmação de que esta sequência também está envolvida na interação de MxA com SUMO1 poderia explicar o dado de que a presença de SUMO1 interfere negativamente na interação de MxA com Ubc9 (Figura 13), por competirem pelo mesmo sítio de interação.

Para testar essa possibilidade, o sistema de duplo-híbrido foi empregado no estudo da interação de mutantes de SUMO1/2/3 com a proteína MxA<sub>WT</sub>. Como apresentado anteriormente (Item 4.4.1 e 4.4.2), foram gerados, no vetor pACT2, os

mutantes SUMO1<sub>K37A/K39A</sub>, SUMO1<sub>E67A</sub>, SUMO2<sub>D71H</sub> e SUMO3<sub>D70H</sub>. Esses mutantes representam mutações clássicas para as regiões SIG (SUMO-interacting groove) e EIL (E67-interacting loop) das proteínas SUMO (Figura 6). Os mutantes de SUMO1 são mutantes de perda de interação (PILLA et al., 2012; KERSCHER et al., 2007), ou seja, são mutantes que, conhecidamente, perdem a capacidade de interagir com as sequências SIM (SUMO1<sub>K37A/K39A</sub>) ou de estabelecer ligação via a alça EIL (SUMO1<sub>E67A</sub>). Ainda, a alça EIL é tida como um ponto de interação parálogo específica entre as proteínas SUMO, assim, somente a proteína SUMO1 teria a capacidade de interagir com outras proteínas por meio dessa região. Neste sentido, os mutantes SUMO2<sub>D71H</sub> e SUMO3<sub>D70H</sub> são mutantes de ganho de ligação, ou seja, essas mutações conferem a SUMO2 e SUMO3 a capacidade de interagir com os ligantes que interagem com SUMO1 via EIL. (PILLA et al., 2012).

Ainda, para Ubc9, foi demonstrado que o resíduo de lisina 14 é alvo da modificação por SUMO1 e que a SUMOilação de Ubc9 pode levar a uma melhora na interação entre Ubc9 e seus parceiros (KNISPCHEER et al., 2008). Assim, o efeito da mutação Ubc9<sub>K14R</sub> na interação entre MxA e Ubc9 foi também investigado.

No ensaio, transformantes da linhagem L40 contendo os plasmídeos codificantes para Gal4-AD-SUMO1<sub>WT</sub>, Gal4-AD-SUMO1<sub>K37A/K39A</sub>, Gal4-AD-SUMO1<sub>E67A</sub>, Gal4-AD-SUMO2<sub>WT</sub>, Gal4-AD-SUMO2<sub>D71H</sub>, Gal4-AD-SUMO3<sub>WT</sub>, Gal4-AD-SUMO3<sub>D70H</sub>, Gal4-AD-Ubc9<sub>WT</sub> e Gal4-AD-Ubc9<sub>K14R</sub> foram transformadas com o plasmídeo codificante para LexA-MxA<sub>WT</sub> e submetidas a análise da expressão dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ*.

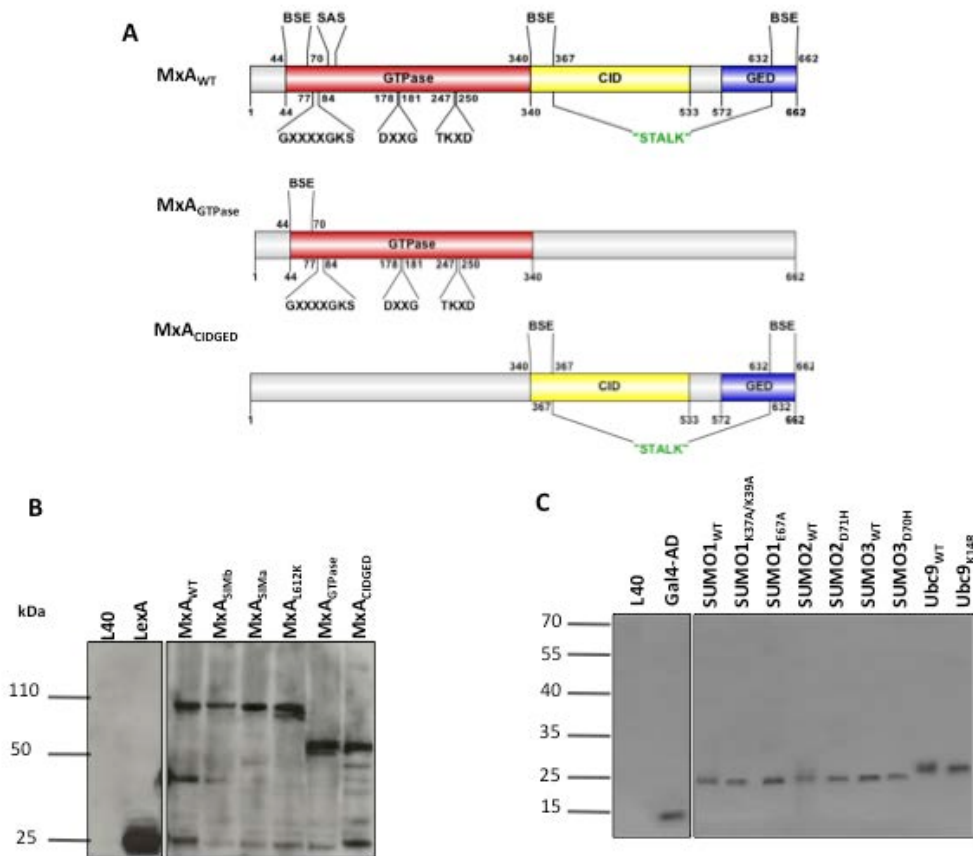
A Figura 23 ilustra os resultados obtidos com este experimento. Nela é possível detectar que a proteína MxA mantém a interação com o mutante SUMO1<sub>K37A/K39A</sub>, que contém as mutações K37A e K39A conhecidas por impedir a interação física entre SUMO e seus parceiros, quando essa é mediada por sequências SIM. Assim, fica demonstrado que a interação entre MxA e SUMO1 é independente das sequências SIM presentes no domínio GTPase de MxA, complementando e fortalecendo os resultados anteriores (Figuras 21 e 22). De modo interessante, o mutante SUMO1<sub>E67A</sub> perde significativamente a interação com MxA, o que indica que a alça contendo o resíduo E67 (EIL) é a região responsável pela interação entre SUMO1 e MxA. Curiosamente, os mutantes SUMO2<sub>D71H</sub> e SUMO3<sub>D70H</sub> adquirem a capacidade de interagir, mesmo que fracamente, com MxA. Esses resultados fortalecem a hipótese de que a interação entre MxA e SUMO1 é realizada por meio da interação entre o domínio CID-GED de MxA e a alça EIL de SUMO1.

#### 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

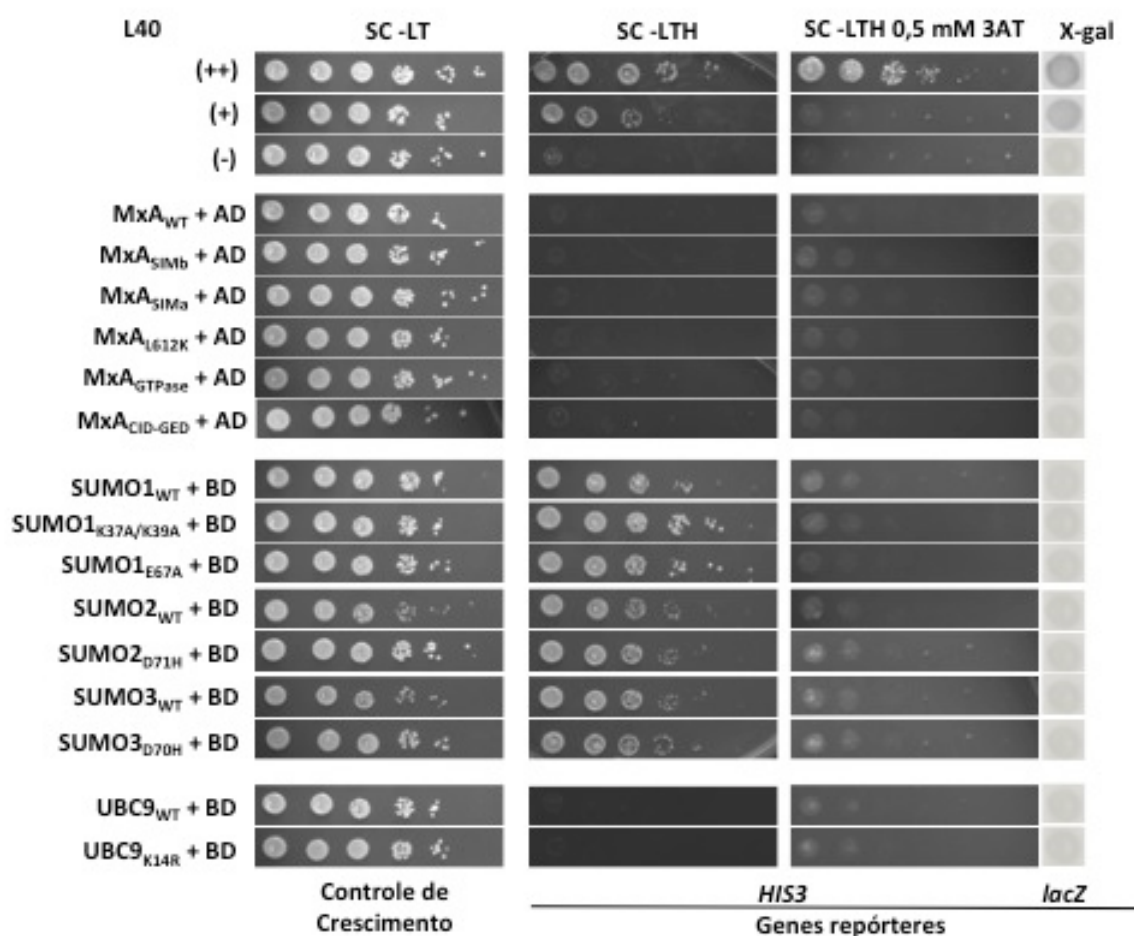
Estes resultados também explicam a falta de interação entre MxA e as proteínas SUMO2 e SUMO3 nos ensaios de co-imunoprecipitação (Figura 12) e duplo-híbrido (Figura 20), uma vez que existem diferenças significativas na sequência de aminoácidos entre SUMO1 e SUMO2/3 na alça EIL responsável pela interação com MxA (Figura 6).

Finalmente, neste ensaio também foi incluído o mutante de SUMOilação de Ubc9, Ubc9<sub>K14R</sub>. A análise do resultado obtido aponta que a presença da lisina K14 em Ubc9 não é determinante para a interação entre Ubc9 e MxA. Tal resultado fortalece os resultados anteriormente obtidos (Item 4.4.6), que mostram que Ubc9 interage com MxA por meio do domínio GTPase. Assim, uma vez que a SUMOilação de Ubc9 é dispensável para sua interação com MxA, os únicos pontos de interação entre MxA e Ubc9 seriam as regiões adjacentes às prováveis lisinas aceptoras de SUMOilação, as quais estão presentes no domínio GTPase da proteína MxA.



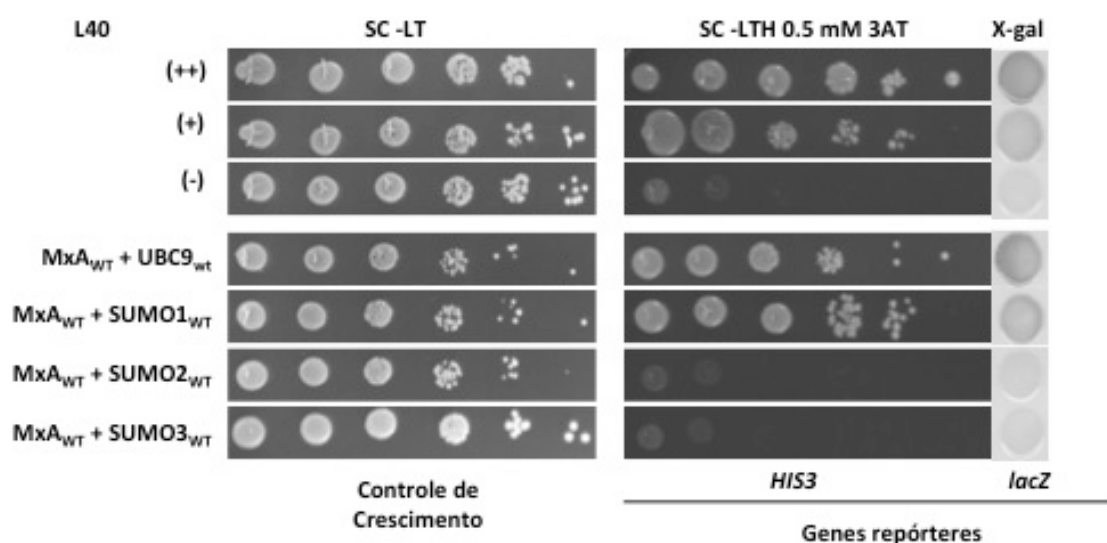
**FIGURA 18. Confirmação da expressão das formas selvagens e mutadas de MxA, SUMO e Ubc9.**

**A.** Esquema ilustrativo das formas truncadas de MxA. **B.** Análise da produção das formas selvagem e mutadas de MxA, em fusão com LexA. Lisados de transformantes da linhagem L40 de *S. cerevisiae* foram analisados por western blot, usando uma diluição de 1:2.000 do anticorpo anti-LexA, para a detecção das proteínas de fusão com LexA: MxA<sub>WT</sub>, MxA<sub>SIMb</sub>, MxA<sub>SIMa</sub> e MxA<sub>L612K</sub> (~100 kDa), e MxA<sub>GTPase</sub> e MxA<sub>CID-GED</sub> (~60 kDa). As linhagens L40 sem qualquer plasmídeo (L40) e contendo o plasmídeo pBTM116 (LexA ~25 kDa) foram utilizadas como controle. **C.** Análise da produção das formas selvagens e mutadas de SUMO e Ubc9 em fusão com Gal4-AD. Lisados de transformantes da linhagem L40 de *S. cerevisiae* foram analisados por western blot, usando uma diluição de 1:5.000 do anticorpo anti-HA, para a detecção das proteínas de fusão com Gal4-AD: SUMO1/2/3 e seus mutantes (~27 kDa) e Ubc9 e seu mutante (~33 kDa). As linhagens L40 sem qualquer plasmídeo (L40) e contendo o plasmídeo pACT (Gal4-AD ~15 kDa) foram utilizadas como controle.



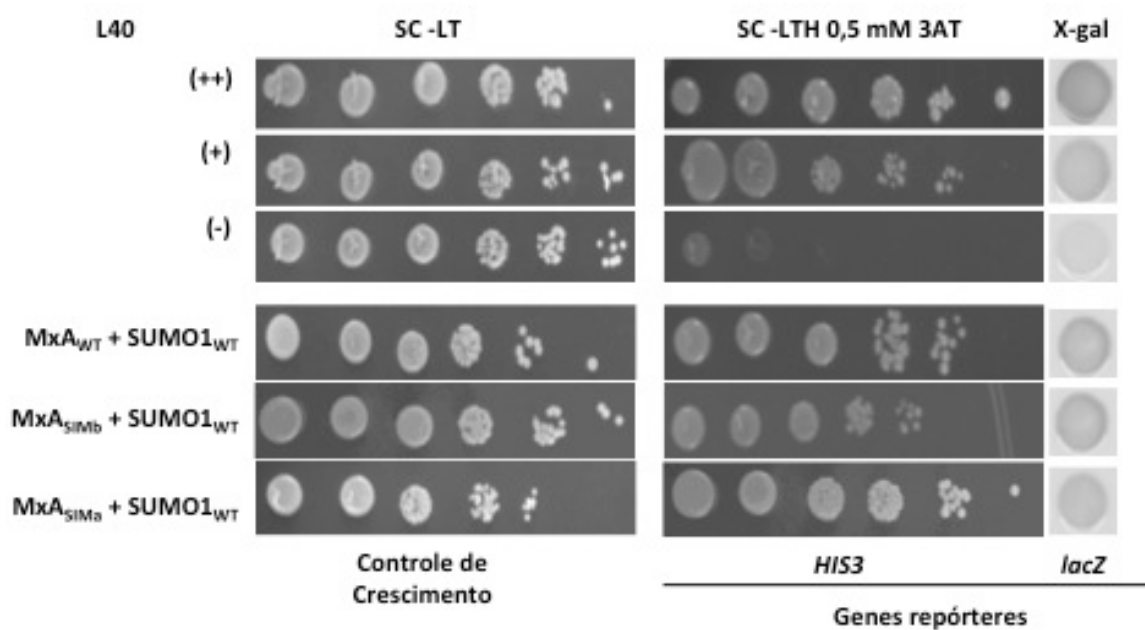
**FIGURA 19. Teste de autoativação das construções de MxA, SUMO1/2/3 e Ubc9.**

Teste de autoativação dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ* para as construções, nos vetores de duplo-híbrido, expressando MxA, SUMO1/2/3 ou Ubc9, selvagem ou mutadas. Transformantes da linhagem L40 contendo um dos plasmídeos pBTM116 (MX1<sub>WT</sub>, MX1<sub>SIMb</sub>, MX1<sub>SIMa</sub>, MX1<sub>GTPase</sub>, MX1<sub>CID-GED</sub> e MX1<sub>L612K</sub>) e o vetor pACT2 (AD) ou um dos plasmídeos pACT2 (SUMO1<sub>WT</sub>, SUMO1<sub>K37A/K39A</sub>, SUMO1<sub>E67A</sub>, SUMO2<sub>WT</sub>, SUMO2<sub>D71H</sub>, SUMO3<sub>WT</sub>, SUMO3<sub>D70H</sub>, Ubc9<sub>WT</sub> ou Ubc9<sub>K14R</sub>) e o vetor pBTM116 (BD) foram cultivados nos meios de cultura SC-leu,-trp (SC-LT) e SC-leu,-trp,-his (SC-LTH), com ou sem 0,5 mM de 3AT, e testados para atividade de  $\beta$ -galactosidase. L40/pBTM116-TIF51A + pACT-Dys1 (++) , L40/pBTM116-TIF51A + pACT-Lia1(+), L40/pBTM116-TIF51A + pACT (-) foram utilizadas como controle positivo forte, positivo fraco e negativo, respectivamente.



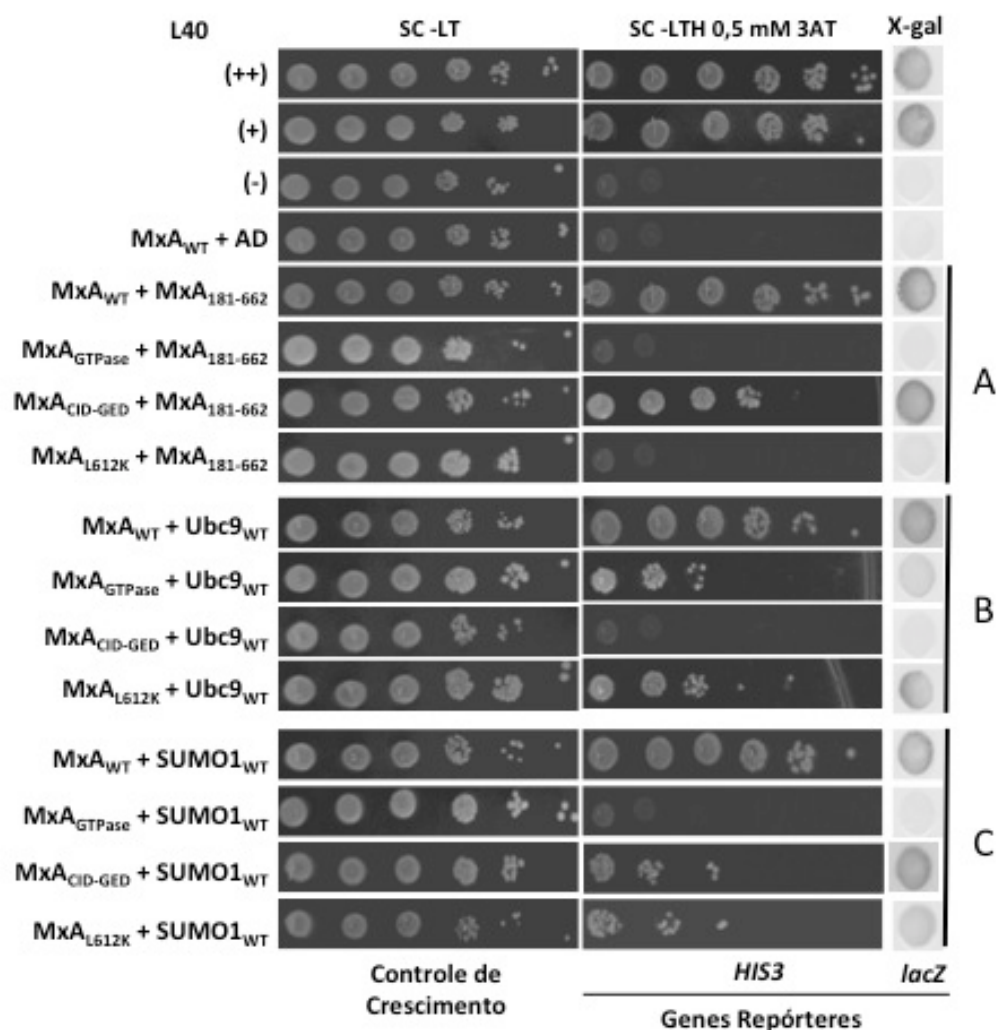
**FIGURA 20. Avaliação da interação física entre MxA e SUMO1/2/3 ou MxA e Ubc9 por duplo-híbrido.**

Transformantes da linhagem L40 contendo o plasmídeo pBTM116-MX1<sub>WT</sub> e um dos plasmídeos pACT2 (SUMO1<sub>WT</sub>, SUMO2<sub>WT</sub>, SUMO3<sub>WT</sub> ou Ubc9<sub>WT</sub>) foram cultivados nos meios de cultura SC-leu,-trp (SC -LT) e SC-leu,-trp,-his (SC -LTH), com 0,5 mM de 3AT, e testados para atividade de  $\beta$ -galactosidase. L40/pBTM116-TIF51A + pACT-Dys1 (++), L40/pBTM116-TIF51A + pACT-Lia1(+), L40/pBTM116-TIF51A + pACT (-) foram utilizadas como controle positivo forte, positivo fraco e negativo, respectivamente.



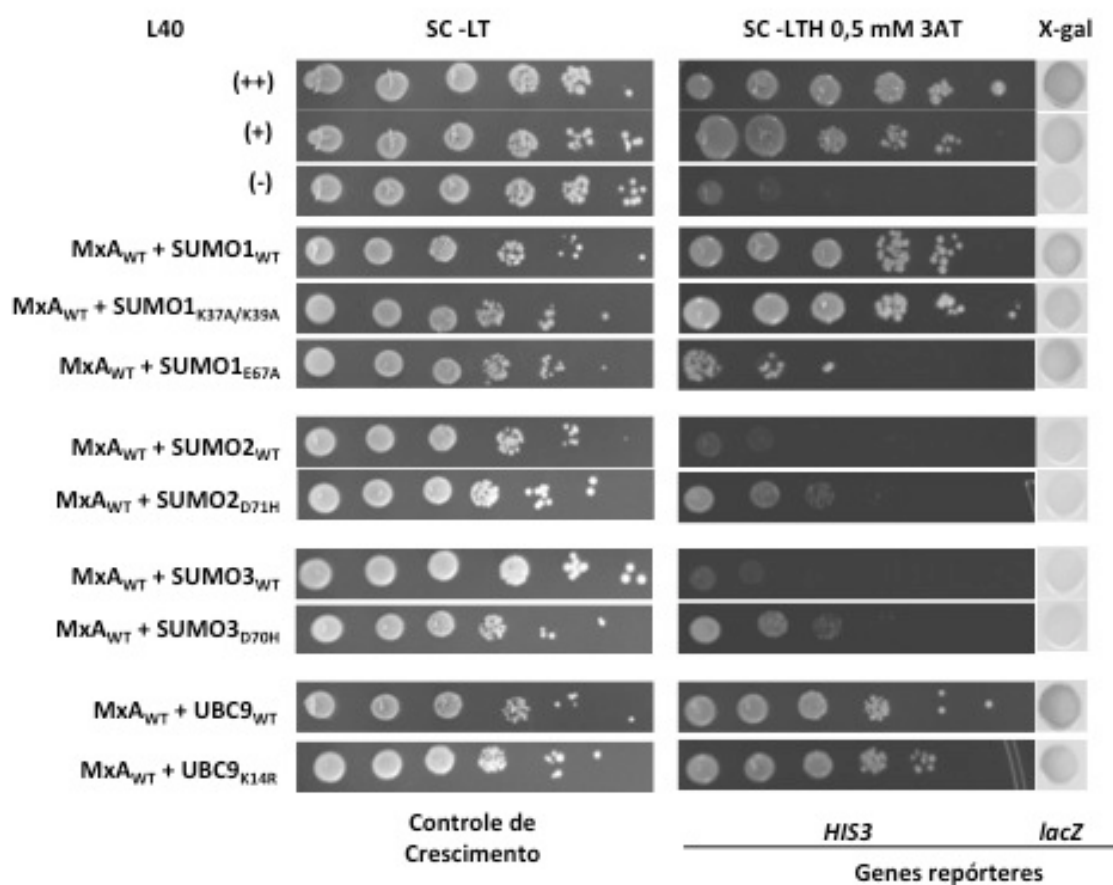
**FIGURA 21. Avaliação do papel das sequências SIM de MxA na sua interação com SUMO1.**

Transformantes da linhagem L40 contendo um dos plasmídeos pBTM116 (MX1<sub>WT</sub>, MX1<sub>SIMb</sub> ou MX1<sub>SIMa</sub>) e o plasmídeo pACT2-SUMO1<sub>WT</sub> foram cultivados nos meios de cultura SC-leu,-trp (SC -LT) e SC-leu,-trp,-his (SC -LTH), com 0,5 mM de 3AT, e testados para atividade de  $\beta$ -galactosidase. L40/pBTM116-TIF51A + pACT-Dys1 (++), L40/pBTM116-TIF51A + pACT-Lia1(+), L40/pBTM116-TIF51A + pACT (-) foram utilizadas como controle positivo forte, positivo fraco e negativo, respectivamente.



**FIGURA 22. Mapeamento do domínio de interação de MxA com Ubc9 e SUMO1 e análise do impacto da oligomerização nessas interações.**

**A.** A funcionalidade do ensaio utilizado foi validada pela capacidade de MxA formar dímeros, utilizando o clone MxA<sub>181-662</sub>, recuperado do rastreamento de duplo-híbrido. Transformantes da linhagem L40 contendo um dos plasmídeos pBTM116 (MxA<sub>WT</sub>, MxA<sub>GTPase</sub>, MxA<sub>CID-GED</sub> ou MxA<sub>L612K</sub>) e a construção pACT2-MX1<sub>181-662</sub> (codificante para Gal4AD-MxA<sub>181-662</sub> encontrada no rastreamento de duplo-híbrido) foram cultivados nos meios de cultura SC-leu,-trp (SC -LT) e SC-leu,-trp,-his (SC -LTH), com 0,5 mM de 3AT, e testados para atividade de  $\beta$ -galactosidase. **B e C.** Mapeamento do domínio de MxA que interage com Ubc9 e SUMO1, respectivamente, e análise do efeito da mutação MxA<sub>L612K</sub> nessas interações. L40/pBTM116-TIF51A + pACT-Dys1 (++), L40/pBTM116-TIF51A + pACT-Lia1(+), L40/pBTM116-TIF51A + pACT (-) foram utilizadas como controle positivo forte, positivo fraco e negativo, respectivamente.



**FIGURA 23. Avaliação da interação física de MxA com mutantes de SUMO e Ubc9.**

Transformante da linhagem L40 contendo o plasmídeo pBTM116-MX1<sub>WT</sub> e um dos plasmídeos pACT2 (SUMO1<sub>WT</sub>, SUMO1<sub>K37A/K39A</sub>, SUMO1<sub>E67A</sub>, SUMO2<sub>WT</sub>, SUMO2<sub>D71H</sub>, SUMO3<sub>WT</sub>, SUMO3<sub>D70H</sub>, Ubc9 ou Ubc9<sub>K14R</sub>) foram cultivados nos meios de cultura SC-leu,-trp (SC -LT) e SC-leu,-trp,-his (SC -LTH), com 0,5 mM de 3AT, e testados para atividade de β-galactosidase. L40/pBTM116-TIF51A + pACT-Dys1 (++), L40/pBTM116-TIF51A + pACT-Lia1(+), L40/pBTM116-TIF51A + pACT (-) foram utilizadas como controle positivo forte, positivo fraco e negativo, respectivamente.

### 4.5. Análise da SUMOilação de MxA por SUMO1 ou pelos seus parálogos.

A confirmação da interação de MxA com SUMO1 e Ubc9 (Figuras 12, 13 e 20), essa última a enzima E2 de conjugação para o processo de SUMOilação, e a presença de proteínas com função de E3 ligase para o processo de SUMOilação entre os ligantes prováveis revelados por duplo-híbrido, tais como CBX4 e PIAS1 (Figura 5), levantam a possibilidade de MxA ser alvo desta modificação pós-traducional.

Nos ensaios de SUMOilação foram utilizadas células da linhagem HeLa, provenientes de uma placa p100, transfectadas um dia após subcultivo com os plasmídeos codificantes para MxA (9 µg - pcDNA3.1-MX1) e SUMO (6 µg - pcDNA3.1-SUMO1<sub>WT</sub>, pcDNA3.1-SUMO2<sub>WT</sub> ou pcDNA3.1-SUMO3<sub>WT</sub>) e cultivadas por 48 horas após a transfecção.

Serviram como controles negativos, células submetidas ao processo de transfecção com vetor vazio (9 µg - pcDNA3.1) e células transfectadas somente com o plasmídeo codificante para MxA (9 µg - pcDNA3.1-MX1). Como controle positivo, foram empregados os plasmídeos codificantes para as proteínas PMLIII (9 µg - pcDNA3.1-PMLIII) e SUMO3<sub>WT</sub> (6 µg - pcDNA3.1-SUMO3<sub>WT</sub>), devidamente acompanhado de seu controle negativo (9 µg - pcDNA3.1) e SUMO3<sub>WT</sub> (6 µg - pcDNA3.1-SUMO3<sub>WT</sub>).

A Figura 24 apresenta os resultados do experimento de SUMOilação de MxA. Como pode ser observado, foi possível identificar duas bandas de MxA modificada por SUMO2 e SUMO3 e uma banda de MxA referente a dupla modificação por SUMO1. Como pode ser observado também, as três bandas esperadas para a modificação de PMLIII estão presentes no controle. Assim, fica demonstrado, pela primeira vez, que a proteína MxA é alvo de modificação por proteínas da família SUMO. Ainda, é possível observar a presença de duas bandas para a proteína MxA SUMOilada (MxA<sub>1xSUMO</sub> e MxA<sub>2xSUMO</sub>). Esse resultado é compatível com a análise da sequência primária de aminoácidos da proteína MxA que indica a existência de duas prováveis lisinas aceptoras de SUMOilação (K48 e K259), as quais fazem parte de duas sequências consenso invertidas de SUMOilação (ICM), presentes no domínio GTPase e descritas anteriormente (Tabela 7 e Figura 15).

Finalmente, para testar a hipótese de que a lisina 48 é o possível sítio aceptor de SUMO na proteína MxA, o ensaio de SUMOilação foi repetido, de acordo com o procedimento anterior, desta vez utilizando a forma mutada MxA<sub>K48R</sub> e a proteína SUMO3. SUMO3 foi utilizada por apresentar um maior nível de expressão e a capacidade de formar cadeias de poliSUMO3. A obtenção e caracterização desse

#### 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

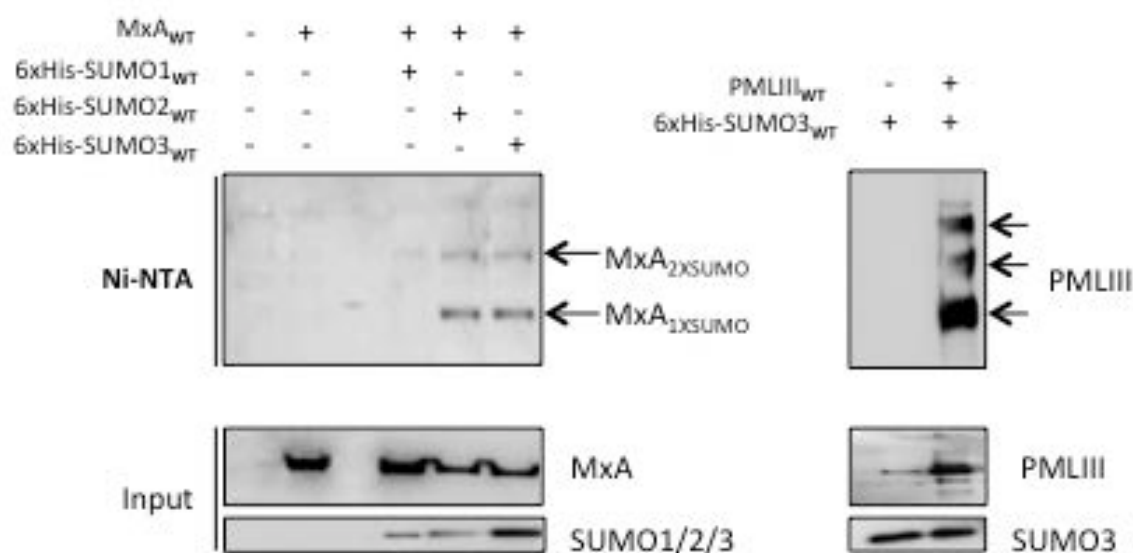
---

mutante também foi descrita anteriormente (Item 4.3, Tabela 7 e Figuras 15-17). Infelizmente, não foi possível avaliar se a lisina 259 também é SUMOilada devido aos problemas apontados anteriormente com o mutante MxA<sub>K259R</sub> (Item 4.3).

A Figura 25 apresenta os resultados obtidos na investigação do sítio de SUMOilação de MxA. Como pode ser observado, o mutante K48R de MxA perde a capacidade de ser SUMOilado por SUMO3. Sendo assim, a lisina K48 é um sítio acceptor de SUMOilação.

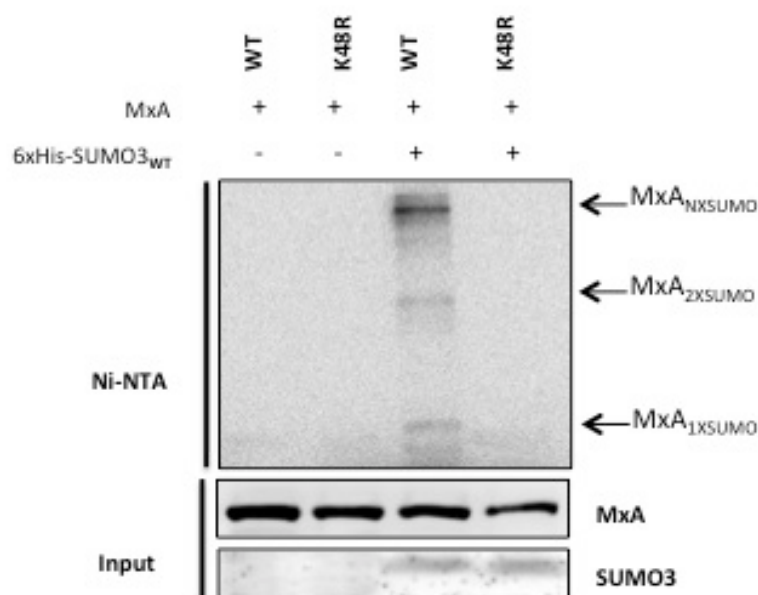
Essa é a primeira descrição da modificação pós-traducional da proteína MxA por SUMOilação. Nos dados aqui apresentados, é possível observar que MxA é SUMOilada pela proteína SUMO1, fracamente, e pelos seus parálogos SUMO2/3. A análise dos resultados apresentados nas Figuras 24 e 25 apontam para a existência de dois possíveis sítios de SUMOilação em MxA, uma vez que foi possível observar o surgimento de duas bandas da proteína MxA modificada (Figura 24). Foi possível demonstrar também que a lisina 48, presente na sequência consenso ICM1 do domínio GTPase, é alvo da modificação por SUMO, pois o mutante MxA<sub>K48R</sub> claramente não é SUMOilado (Figura 25). Outro fato importante a ser observado é a existência de poli-SUMOilação pelo parálogo SUMO3, uma vez que o ensaio realizado apresenta um acúmulo de MxA com massa molecular elevada (MxA<sub>NxSUMO</sub>) (Figura 25).

A fraca SUMOilação de MxA por SUMO1 já foi observada para a proteína PML. Assim, quando a proteína PMLIII, um dos principais alvos de SUMOilação e cujas atividades biológicas são constantemente modeladas pela SUMOilação e deSUMOilação por SUMO1 e seus parálogos, é submetida aos ensaios de SUMOilação por SUMO1, sua modificação nem sempre é evidente (BLONDEL et al., 2010; GALISSON et al., 2011; NISOLE et al., 2013). A ausência de formas SUMOiladas de MxA para SUMO2/3 nos ensaios de co-imunoprecipitação pode ser resultante de baixos níveis de SUMOilação desta proteína. Além disso, a quantidade de proteína utilizada para os experimentos de SUMOilação é muito superior àquela utilizada nos experimentos de co-imunoprecipitação uma vez que estas são provenientes de placas de petri 150mm e placas de 6 poços, respectivamente.



**FIGURA 24. Ensaio de SUMOilação de MxA por SUMO1 e seus parálogos SUMO2 e SUMO3.**

Extratos celulares provenientes de células da linhagem HeLa transfectadas, concomitantemente, com a combinação indicada dos plasmídeos codificantes para as proteínas MxA, SUMO1, SUMO2, SUMO3 ou PMLIII foram submetidos a purificação por afinidade, em condições desnaturantes, à resina de Níquel (Agarose-NINTA, GE). Na parte superior, estão indicados os plasmídeos que foram (+) ou não (-) utilizados no experimento. As bandas correspondentes às proteínas MxA modificadas por SUMO1/2/3 (MxA<sub>1xSUMO</sub> e MxA<sub>2xSUMO</sub>) e a proteína PMLIII modificada por SUMO3 estão indicadas por setas. Anticorpos utilizados:  $\alpha$ -pMxA (MxA);  $\alpha$ -6xHis Clontech (SUMO1/2/3) e  $\alpha$ -PML SantaCruz (PMLIII). Número amostral = 3.



**FIGURA 25. Ensaio de SUMOilação do mutante MxA<sub>K48R</sub>.**

Extratos celulares provenientes de células da linhagem HeLa transfectadas, concomitantemente, com a combinação indicada dos plasmídeos codificantes para as proteínas MxA e 6xHis-SUMO3 foram submetidos a purificação por afinidade, em condições desnaturantes, à resina de Níquel (Agarose-NINTA, GE). Na parte superior, estão indicados os plasmídeos que foram (+) ou não (-) utilizados no experimento. As bandas correspondentes às proteínas MxA modificadas por SUMO3 (MxA<sub>1xSUMO</sub>, MxA<sub>2xSUMO</sub> e MxA<sub>NxSUMO</sub>) estão indicadas por setas. Anticorpos utilizados: α-pMxA (MxA) e α-6xHis Clontech (SUMO3). Número amostral = 2.

### 4.6. Avaliação da atividade antiviral das formas mutadas de MxA

Dois fatores são importantes para a atividade antiviral de MxA: 1- a capacidade de formar oligômeros e 2- a capacidade de hidrolisar GTP em GDP. Alguns dos mutantes aqui apresentados MxA<sub>K259R</sub>, MxA<sub>K48R/K259R</sub> e MxA<sub>L612K</sub> visivelmente perderam a capacidade de formar oligômeros (Figura 6). Porém, todos os mutantes, com exceção do mutante monomérico MxA<sub>L612K</sub>, estão localizados dentro do domínio GTPase, o que abre a possibilidade de perda da atividade GTPásica e, conseqüentemente, da atividade antiviral.

Assim, para testar a atividade antiviral do mutante de SUMOilação (MxA<sub>K48R</sub>), assim como dos mutantes das sequências SIM (MxA<sub>SIMb</sub> e MxA<sub>SIMa</sub>), ensaios de infecção viral foram realizados visando elucidar quais destes mutantes perderam ou mantiveram a capacidade de inibir a replicação viral do Vírus da Estomatite Vesicular (VSV, do inglês: *Vesicular stomatitis virus*). Esse vírus é conhecido por cumprir suas etapas de replicação no citoplasma celular e por ser diretamente inibido por MxA (PAVLOVIC et al., 1990). Assim, células Hela foram transfectadas com os plasmídeos de interesse e incubadas por 24h. Após incubação, as células foram submetidas ao processo de infecção por 1 hora e, após a retirada do vírus pela troca do meio de cultivo, as células foram incubadas por mais 7 h (total de 8 horas) ou 11 h (total de 12 horas). Ao final da incubação, as células foram submetidas à imunofluorescência indireta dupla, utilizando anticorpos anti-MxA ( $\alpha$ -mMxA) e anti-VSV.

A Figura 26 apresenta os resultados obtidos para os ensaios de infecção viral realizados. A capacidade ou incapacidade de MxA e seus mutantes em inibir a replicação viral é visualizada através da ausência ou presença de marcação concomitante para as proteínas G, N e M do vírus VSV (verde) e de MxA (vermelho) em uma mesma célula, respectivamente. É possível observar que após 12 horas de infecção, a simples expressão de MxA não é capaz de inibir a replicação viral, talvez devido aos altos títulos virais alcançados após 1 ciclo de replicação. Porém, é possível ver claramente que no período de 8 horas após infecção, as formas MxA<sub>WT</sub> e MxA<sub>K48R</sub> retêm a capacidade de inibir a infecção e replicação viral do vírus VSV, enquanto os mutantes MxA<sub>SIMb</sub> e MxA<sub>SIMa</sub> perdem essa capacidade. De modo esperado, o mutante monomérico MxA<sub>L612K</sub> apresentou atividade antiviral contra VSV, mesmo sendo incapaz de formar oligômeros (JANZEM et al., 2000).

A perda de atividade antiviral pelos mutantes MxA<sub>SIMb</sub> e MxA<sub>SIMa</sub>, que ainda sofrem oligomerização, se deve provavelmente ao fato de as sequências SIMb e SIMa

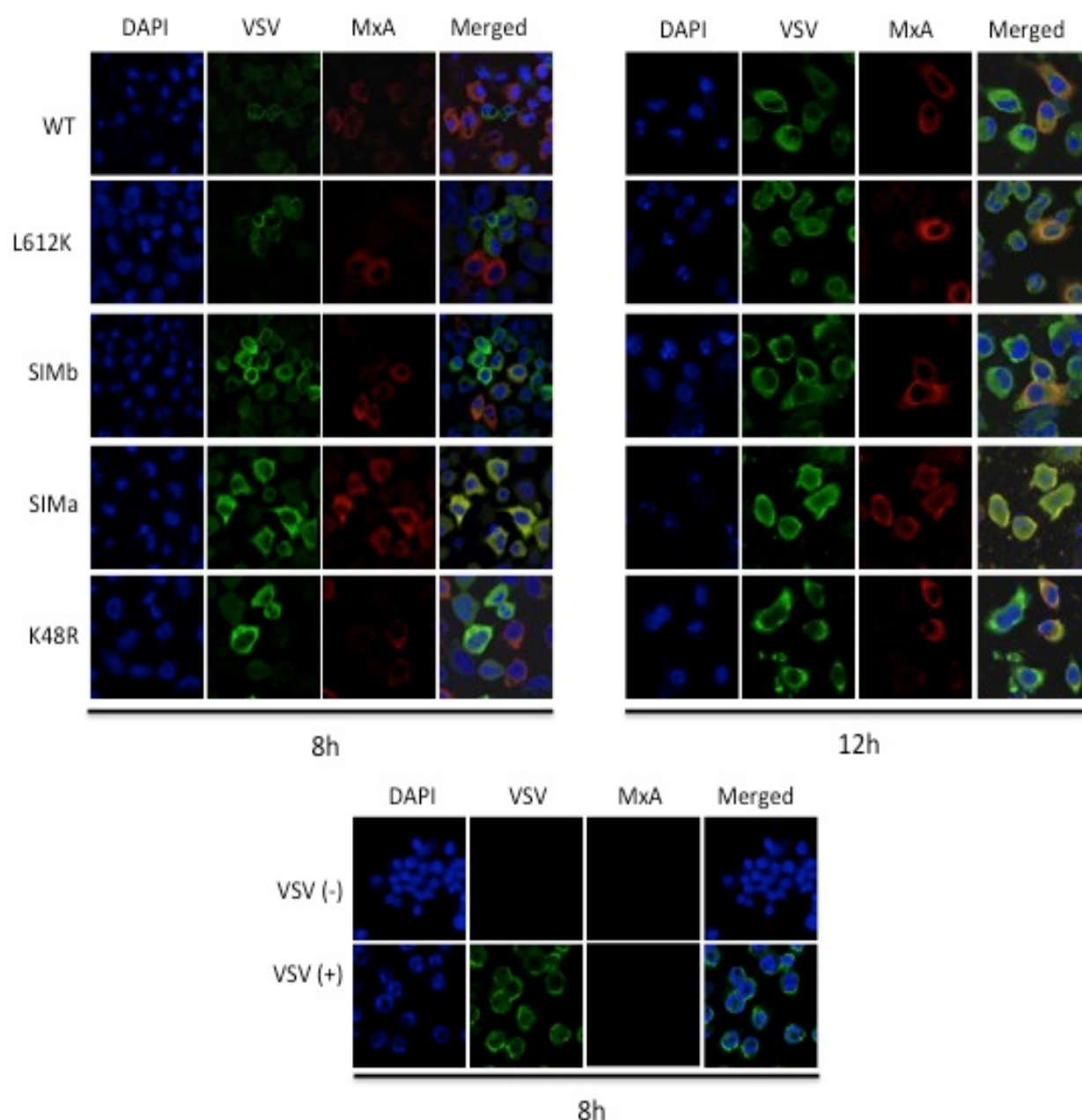
#### 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

estarem na proximidade das sequências importantes para a ligação da molécula de GTP. Dessa forma, as mutações em SIMb e SIMa podem ter interferido negativamente com a ligação e/ou clivagem de GTP, indispensável para sua atividade antiviral. Curiosamente, o mutante MxAK48R que também sofre oligomerização, mas não é SUMOilado, mantém a atividade antiviral. Esse mutante sugere que a SUMOilação de MxA não é essencial para a sua atividade antiviral. Esse resultado será melhor discutido adiante.

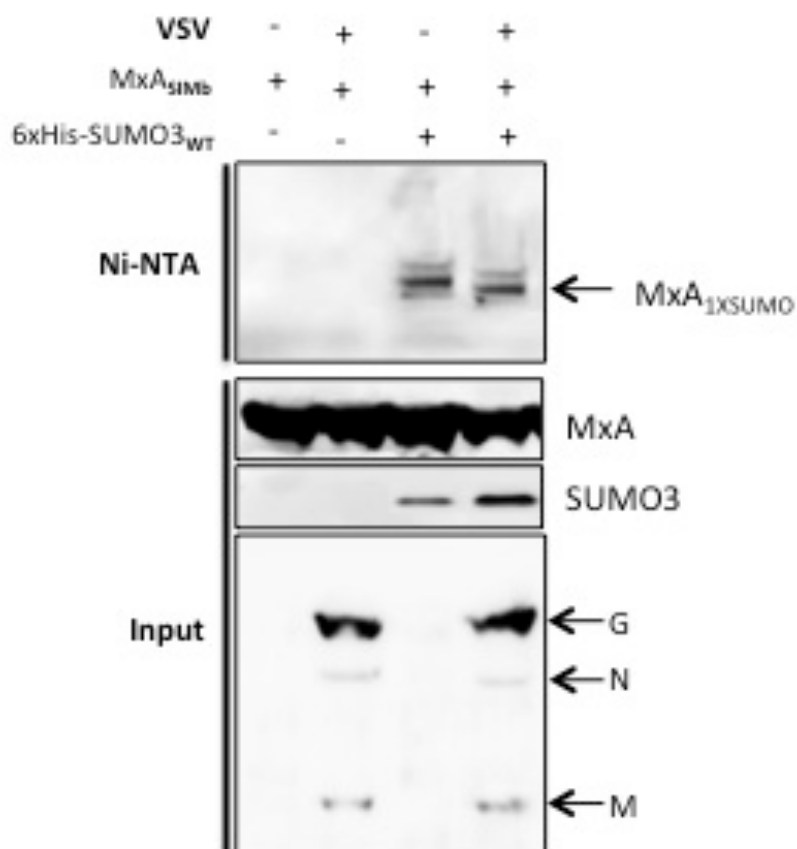
Finalmente, a influência da infecção viral sobre a SUMOilação de MxA foi investigada. Para tanto, o mutante SIMb que não apresentou atividade antiviral alguma foi utilizado. Assim, células da linhagem HeLa, provenientes de uma placa p100, foram transfectadas, um dia após o subcultivo, com os plasmídeos codificantes para MxA (9 µg - pcDNA3.1-MX1<sub>SIMb</sub>) e SUMO3 (pcDNA3.1-6xHis-SUMO3) e cultivadas por 24 horas após a transfecção. Após cultivo, as células foram infectadas com o vírus VSV por 1 hora e incubadas por um período adicional de 7 horas (8 horas totais), após troca do meio para a remoção das partículas virais livres. As células foram coletadas e extratos totais de proteínas foram submetidos a purificação de proteínas com cauda de histidinas em condições não desnaturantes.

A Figura 27 apresenta o resultado obtido para a SUMOilação do mutante SIMb de MxA na presença do vírus VSV. Como pode ser observado, a presença do vírus VSV não afeta a SUMOilação de MxA, uma vez que MxA continua sendo SUMOilada nas células infectadas com o vírus VSV.



**FIGURA 26. Avaliação da atividade antiviral de formas mutadas de MxA por imunofluorescência indireta.**

Células da linhagem HeLa transfectadas com os plasmídeos pcDNA3.1-MX1, pcDNA3.1-MX1<sub>L612K</sub>, pcDNA3.1-MX1<sub>SIMb</sub>, pcDNA3.1-MX1<sub>SIMa</sub> ou pcDNA3.1-MX1<sub>K48R</sub> foram submetidas a infecção viral com o vírus VSV por 8 ou 12 horas. A proteína MxA e seus mutantes foram marcados pelo emprego de anticorpo anti-MxA ( $\alpha$ -mMxA). A presença do vírus VSV foi detectada por anticorpo policlonal anti-VSV. A cromatina celular foi marcada com DAPI (fluorescência azul). Como anticorpos secundários foram utilizados anti-IgG conjugado a Alexa Fluor 488 (fluorescência verde) ou Alexa fluor 594 (fluorescência vermelha). As imagens foram combinadas pelo emprego do software ImageJ (Merged). Anticorpos utilizados:  $\alpha$ -mMxA (MxA) e  $\alpha$ -VSV (VSV). Número amostral = 4.



**FIGURA 27. Avaliação da influência da infecção pelo vírus VSV na SUMOilação de MxA.**

Extratos celulares provenientes de células da linhagem HeLa transfectadas, concomitantemente, com a combinação indicada dos plasmídeos codificantes para as proteínas MxA e 6xHis-SUMO3 e infectadas com VSV foram submetidos a purificação por afinidade, em condições desnaturantes, à resina de Níquel (Agarose-NINTA, GE). Na parte superior, estão indicados os plasmídeos que foram (+) ou não (-) utilizados no experimento. As bandas correspondentes às proteínas MxA modificadas por SUMO3 (MxA<sub>1XSUMO</sub>) e às proteínas virais VSV-G (~63 kDa), VSV-N (~47 kDa) e VSV-M (~27 kDa) estão indicadas por setas. Anticorpos utilizados: α-pMxA (MxA), α-6xHis Clontech (SUMO3) e anti-VSV (proteínas G, N e M do vírus VSV). Número amostral = 1.

#### 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Os resultados obtidos nesse estudo revelam que MxA além de interagir fisicamente com Ubc9, interage também com SUMO1 e é SUMOilada por SUMO1/2/3. Ainda, foi possível demonstrar que a interação entre MxA e SUMO1 se dá através da alça EIL de SUMO1 e do domínio CID-GED de MxA, sem a participação das duas sequências SIM presentes no domínio GTPase.

Nesse sentido, analisando os modelos propostos para SUMOilação (KNISPCHEER et al., 2008), é possível propor mecanismos para a SUMOilação de MxA (Figura 28). No primeiro deles, dependente da participação de SUMO1, a proteína Ubc9 SUMOilada com SUMO1 modificaria MxA com SUMO1/2/3, sendo que SUMO1 participaria na determinação da especificidade pela ligação com MxA. No segundo, a proteína Ubc9 modificaria MxA com SUMO1/2/3, independentemente da participação de SUMO1. No terceiro mecanismo, a proteína Ubc9 modificaria MxA com SUMO1/2/3, também de forma independente de SUMO1 e intensificada pela participação de uma E3 ligase. Finalmente, no quarto mecanismo, a proteína Ubc9 modificaria MxA com SUMO1/2/3, de forma dependente de SUMO1, a qual atuaria no estabelecimento da ligação entre a E3 ligase e MxA.

No primeiro mecanismo (Figura 28A), MxA estaria interagindo com Ubc9 pelo domínio GTPase e com SUMO1 pelo domínio CID-GED. A análise da sequência primária de aminoácidos da proteína MxA indica que as prováveis lisinas aceptoras de SUMOilação estão presentes no domínio GTPase (K48 e K259), dentro de duas sequências consenso de modificação por SUMO conhecidas como Consenso Inverso de SUMOilação (ICM) (Figura 6). Assim, a proteína Ubc9 SUMOilada estaria interagindo com o domínio GTPase, enquanto que a proteína SUMO1 modificadora de Ubc9 estaria interagindo com o domínio CID-GED, promovendo a especificidade pelo substrato MxA. Os resultados obtidos no mapeamento da interação entre MxA com SUMO1 mostram claramente que SUMO1 interage especificamente com o domínio CID-GED de MxA e que o domínio GTPase é necessário para a interação com Ubc9 (Figura 22). Entretanto, esse mecanismo tem que ser desconsiderado, pois envolve a necessidade da modificação de Ubc9 por SUMO1 e nos resultados aqui obtidos, a presença da mutação K14R em Ubc9, mutação que inibe sua modificação por SUMO1, não altera o padrão de interação entre Ubc9 e MxA (Figura 23).

No segundo mecanismo (Figura 28B), a proteína MxA teria que interagir com Ubc9 por meio de duas regiões. Realmente, MxA possui duas regiões de interação com Ubc9 (ICMs), mas essas estão localizadas no mesmo domínio da proteína MxA

(GTPase) e foi demonstrado aqui que a interação de Ubc9 com MxA ocorre exclusivamente com o domínio GTPase de MxA. Entretanto, a ausência do domínio CID-GED interfere negativamente na interação entre MxA e Ubc9 (Figura 22B). É provável que essa interferência negativa exista devido a incapacidade dos mutantes MxA<sub>GTPase</sub> e MxA<sub>L612K</sub> em oligomerizar, uma vez que o impacto negativo dessas duas mutações é semelhante em relação ao selvagem (Figura 22B). Assim, a diminuição da interação das formas mutadas de MxA com Ubc9 poderia ser explicada pela necessidade de oligomerização para a correta interação, ou seja, a interação de Ubc9 com MxA ocorreria com dois domínios GTPases presentes em duas proteínas MxA em oligômeros adjacentes. Assim, esse mecanismo não pode ser descartado por completo, mas deveria ser modificado, pois os dois pontos de contato entre MxA e Ubc9 não estão na mesma proteína MxA.

No terceiro mecanismo (Figura 28C), proteínas com função de E3 ligase intensificariam a SUMOilação de MxA por Ubc9, sem a participação de SUMO1. Fortalecendo esse mecanismo, dois dos 27 ligantes prováveis de MxA, revelados pelo rastreamento de duplo-híbrido, possuem atividade de E3 ligase, a saber: CBX4 e PIAS1 (Figura 5). Assim, esse poderia ser um dos mecanismos de SUMOilação de MxA, porém novos estudos deveriam ser realizados para comprovar o envolvimento dessas ou de alguma outra E3 ligase na SUMOilação de MxA.

Finalmente, no quarto mecanismo apresentado (Figura 28D), as proteínas E3 ligase, SUMOiladas por SUMO1, atuariam na intensificação da SUMOilação de MxA por Ubc9. Como no caso anterior, a comprovação desse mecanismo necessitaria de estudos adicionais. Curiosamente, as duas proteínas CBX4 e PIAS1 são passíveis de SUMOilação (WOTTON et al., 2007; RABELLINO et al., 2012).

A interação entre MxA e SUMO1 poderia ser a chave para explicar a interação de MxA com outros fatores celulares SUMOilados com SUMO1, como aqueles envolvidos na resposta antiviral, na formação dos PML-NBs e mesmo na via JAK/STAT cuja a atividade é modulada pela SUMOilação de seus constituintes (ZHAO, 2007; KRIEGHOFF-HENNING e HOFMANN, 2008; ISAACSON e PLOEGH, 2009). Ressalta-se que vários dos 27 ligantes prováveis de MxA revelados no rastreamento de duplo-híbrido são proteínas SUMOiladas (Figura 5), muitos dos quais envolvidos direta ou indiretamente com a formação de PML-NBs, um sítio de atividade antiviral intensa (BERNARDI et al., 2007).

#### 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

A proteína MxA é conhecida pela sua vasta atividade antiviral, sendo capaz de inibir a replicação de vírus de RNA e DNA, independentemente do seu local de replicação (HALLER et al., 2007b; HALLER et al., 2007c e HALLER et al., 2010). Neste estudo, a atividade antiviral de MxA foi demonstrada contra o Vírus da Estomatite Vesicular (VSV).

Recentemente, foi demonstrado que MxA é ligante de RNA helicases celulares como UAP56/URH49, que são importantes para o processo de exportação nuclear dos RNAs virais necessários para a maturação da partícula viral. Assim, a atividade antiviral da proteína MxA se daria pelo sequestro dessas RNA helicases no citoplasma celular, impedindo a formação de novas partículas virais (READ e DIGARD, 2010; WISSKIRCHEN et al., 2011a; WISSKIRCHEN et al., 2011b). De modo semelhante, MxA poderia se valer da interação com SUMO1, ou da modificação por SUMO1/2/3, para sequestrar outras proteínas importantes para a replicação viral ou para recrutar, na superfície das partículas virais onde se oligomeriza, proteínas importantes para a completa eliminação das vRNPs.

Estudos funcionais sobre a atividade antiviral de MxA contra o vírus Influenza A apontam para a necessidade de sua oligomerização sobre a partícula viral, o que levaria a desestabilização dos complexos ribonucleoproteicos virais (vRNPs), por meio da interferência na ligação entre seus constituintes, entre eles, as proteínas NP (nucleoproteína) e PB2 (polimerase B2), com as quais MxA interage (VERHELST et al., 2013). Interessantemente, ambas as proteínas NP e PB2 de Influenza são modificadas por SUMO1 (PAL et al., 2011; WILSON, 2012; VERHELST et al., 2012) e, de modo muito curioso, a interação entre as proteínas PB2 e NP de influenza com a proteína Mx1 só pode ser detectada na presença de NEM (n-etilmaleimida), o qual inibe a atividade GTPásica de Dyn-1, mas que é comumente usado na inibição da atividade das proteínas SENP (do inglês, SUMO/Sentrin-specific protease) responsáveis reciclagem ou deSUMOilação de proteínas (GALISSION et al., 2011).

Levando em consideração que MxA e SUMO1 interagem por meio da alça EIL de SUMO1 e do domínio CID-GED de MxA, a SUMOilação das proteínas NP e PB2 poderia ser um mecanismo viral de evasão da atividade antiviral de MxA. Tendo em mente que MxA é um membro da superfamília de dinaminas GTPase e que a interação entre a alça EIL de SUMO1 e o domínio GED de Dyn-1 leva a inibição da sua capacidade de oligomerização, as proteínas NP e PB2 virais poderiam ser SUMOiladas e, por meio da interação conjunta NP-SUMO1-MxA ou PB2-SUMO1-MxA, inibir a

formação do oligômero de MxA sobre as vRNPs e, conseqüentemente, sua atividade antiviral. Nesse mecanismo de evasão, as proteínas virais SUMOiladas sequestrariam MxA impedindo a formação do oligômero necessário para atividade antiviral.

No estudo aqui apresentado, foi mostrado que a lisina 48 de MxA é alvo de SUMOilação. Entretanto, o mutante MxA<sub>K48R</sub> mostrou-se capaz de inibir a replicação do vírus VSV. Isso demonstra que a atividade antiviral de MxA é independente da sua SUMOilação. Neste sentido, a SUMOilação de MxA poderia ser induzida por proteínas virais, por exemplo por meio de uma E3 ligase viral, como um mecanismo de escape da sua atividade antiviral. Esse escape poderia ocorrer pela inibição da oligomerização de MxA ou pela indução da sua degradação.

A primeira hipótese é fortalecida pelo fato da lisina 48 do domínio GTPase de MxA estar envolvida na estruturação da região intermediária (BSE) entre o domínio GTPase e o domínio CID-GED (*stalk*) de MxA, a qual coordena a formação do oligômero (GAO et al., 2011). Assim, a poli-SUMOilação da lisina 48 poderia causar a perda da capacidade de oligomerização de MxA, por interferir na correta formação das ligações inter ou intramoleculares essenciais para a oligomerização.

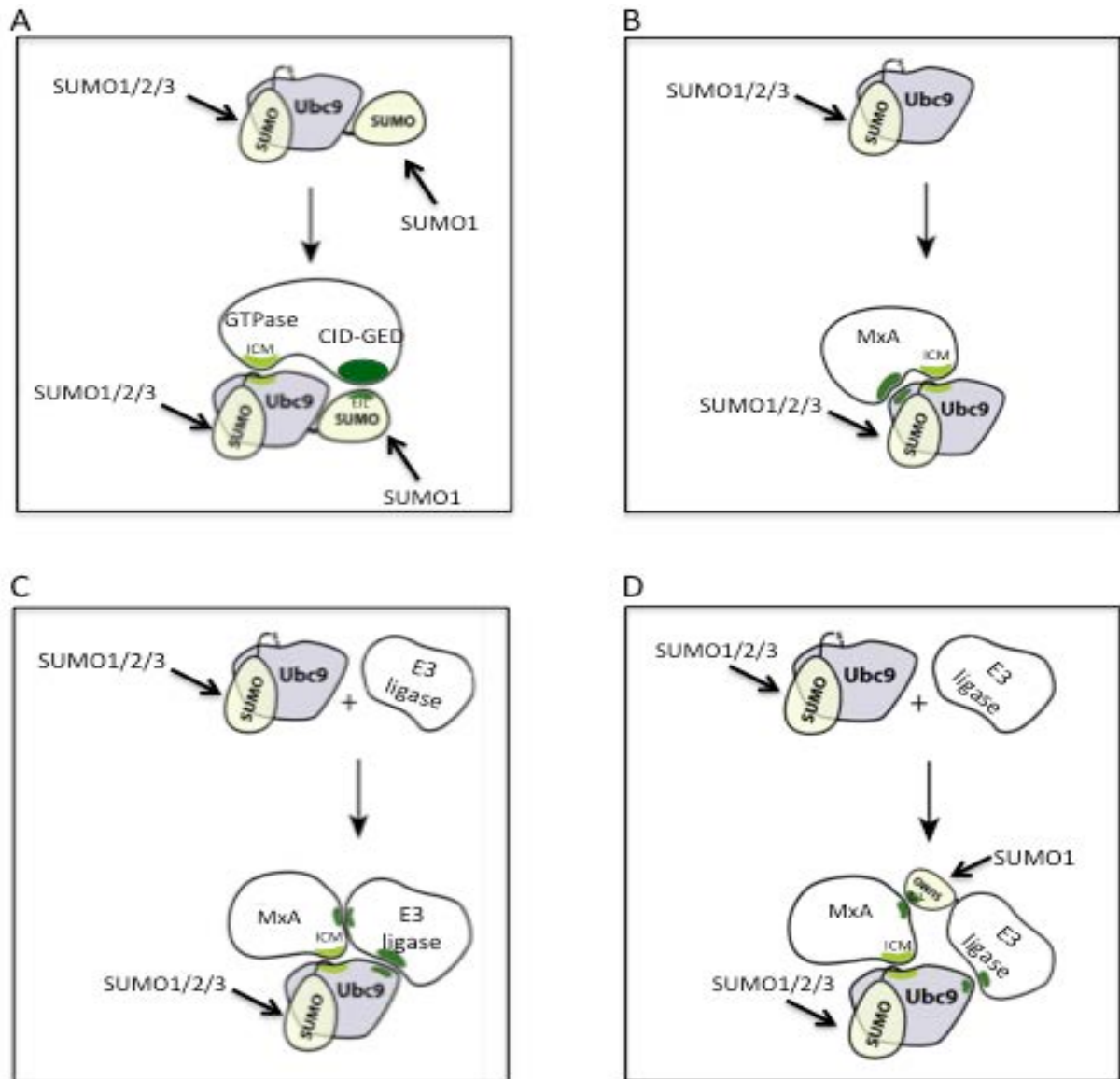
A possibilidade da segunda hipótese pode ser ilustrada pela degradação da proteína PML promovida pelo Vírus Herpes Simples do tipo 1 (HSV-1). As proteínas PMLs quando poliSUMOiladas por SUMO2/3 são alvo da ação de STUBs (do inglês, SUMO-targeted ubiquitin ligases). Essas proteínas apresentam função de ubiquitina E3 ligase sobre proteínas já SUMOiladas, criando assim, um evento de degradação dependente de SUMOilação (PRAEFCKE et al., 2012; WILSON, 2012; SRIRAMACHANDRAN e DOHMEN, 2014). Neste caso do vírus HSV-1, a proteína ICP0 atua como uma ubiquitina E3 ligase dependente de SUMOilação e induz a degradação das proteínas PMLs SUMOiladas e, conseqüentemente, a dispersão dos PML-NBs, evitando assim a atividade antiviral de PML (BOUTELL et al., 2011).

Diversas questões foram levantadas ao longo do presente estudo, como por exemplo, qual seria o papel da interação entre MxA e SUMO1 ou qual a importância da SUMOilação de MxA para sua atividade antiviral. Neste sentido, experimentos visando estudar a interferência das proteínas SUMO na atividade GTPásica e na oligomerização de MxA deveriam ser realizados com a proteína MxA SUMOilada ou na presença de SUMO1. Ainda, será necessário investigar se a SUMOilação de MxA é um mecanismo de evasão viral comum a todos os vírus ou se a SUMOilação de MxA pode, no caso de alguns vírus, ser importante para sua atividade antiviral. Outro ponto

#### **4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

importante seria a identificação de proteínas celulares ou virais que atuem como E3 ligases no processo de intensificação da SUMOilação de MxA. Assim, o aprofundamento do presente estudo contribuirá significativamente para a compreensão dos aspectos funcionais do envolvimento de MxA com a maquinaria de SUMOilação.



**FIGURA 28. Mecanismos prováveis de SUMOilação da proteína MxA.**

**A.** SUMOilação de MxA dependente da SUMOilação de Ubc9 com SUMO1. A proteína Ubc9 SUMOilada com SUMO1 e ligada a SUMO1/2/3 promoveria a transferência de SUMO1/2/3 para a proteína MxA; **B.** SUMOilação de MxA independente da SUMOilação de Ubc9 com SUMO1. Ubc9 interagiria em duas regiões diferentes de MxA e a modificaria com SUMO1/2/3, independente de SUMO1; **C e D.** SUMOilação de MxA independente da SUMOilação de Ubc9 com SUMO1 e intensificada por E3 ligase. A SUMOilação de MxA com SUMO1/2/3 seria intensificada pela participação de uma E3 ligase, provavelmente CBX4 ou PIAS1, independente de SUMO1 (C) ou dependente de SUMO1 (D) (Adaptada de KNISPCHEER et al., 2008).

## 5 – CONCLUSÕES

---

1. O anticorpo obtido contra MxA ( $\alpha$ -pMxA) pode ser aplicado na detecção de MxA em diversos ensaios;
2. MxA interage fisicamente com Ubc9 e SUMO1;
3. A presença de SUMO1 interfere na interação entre MxA e Ubc9;
4. A proteína MxA co-localiza com as proteínas Ubc9 e SUMO1;
5. A interação entre MxA e SUMO1 ocorre pelo seu domínio CID-GED (*stalk*).
6. O domínio GTPase de MxA está envolvidos na sua interação com Ubc9;
7. A oligomerização de MxA é importante para a interação física com SUMO1 e Ubc9;
8. A interação entre MxA e SUMO1 não depende de sequências SIM;
9. A proteína MxA interage com a alça EIL de SUMO1 e não pela região SIG;
10. A proteína MxA sofre SUMOilação;
11. A lisina K48 é um sítio acceptor de SUMOilação em MxA;
12. Os mutantes MxA<sub>SIMb</sub> e MxA<sub>SIMa</sub> não apresentam atividade antiviral no ensaio realizado;
13. O mutante de SUMOilação MxA<sub>K48R</sub> mantém a atividade antiviral no ensaio realizado;
14. O vírus VSV não é capaz de estimular a SUMOilação de MxA.

## REFERÊNCIAS

- AARONSON, D. S.; HORVATH, C. M. A road map for those who don't know JAK-STAT. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1653-1655, 2002.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, 2006.
- ANDERSSON, I.; BLADH, L.; MOUSAVI-JAZI, M. Human MxA protein inhibits the replication of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. **Journal of Virology**, v. 78, n. 8, p. 4323-4329, 2004.
- ANK, N.; WEST, H.; PALUDAN, S. R. IFN- $\lambda$ : Novel antiviral cytokines. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 26, n. 6, p. 373-379, 2006.
- BARTEL, P. L.; FIELDS, S. Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. **Methods in Enzymology**, v. 254, p. 241-263, 1995.
- BERNARDI, R.; PANDOLFI, P. P. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 12, p. 1006-1016, 2007.
- BIENIASZ, P. D. Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. **Nature Immunology**, v. 5, n. 11, p. 1109-1115, 2004.
- BLASIUS, A. L.; BEUTLER, B. Intracellular toll-like receptors. **Immunity**, v. 32, n. 3, p. 305-315, 2010.
- BLONDEL, D. et al. Resistance to rabies virus infection conferred by the PMLIV isoform. **Journal of Virology**, v. 84, n. 20, p. 10719-10726, 2010.
- BODDY, M. N. et al. PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. **Oncogene**, v. 13, n. 5, p. 971-982, 1996.
- BOUTELL, C. et al. A viral ubiquitin ligase has substrate preferential SUMO targeted ubiquitin ligase activity that counteracts intrinsic antiviral defence. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 9, p. e10022451- e100224515, 2011.
- BRAND, S. et al. SOCS-1 inhibits expression of the antiviral proteins 2',5'-OAS and MxA induced by the  $\alpha$ 1 interferon-lambda IL-28A and IL-29. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 331, n. 2, p. 543-548, 2005.
- BRANTIS-DE-CARVALHO, C. E.; BOLDRIN, P. E. Papel da proteína Mx1 na resposta a interferons e no processo neoplásico; role of Mx1 protein in the response to interferons and neoplastic process. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 3, p. 287-295, 2011.
- BRENT, R.; PTASHNE, M. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. **Cell**, v. 43, n. 3, p. 729-736, 1985.
- BROMBERG, J. Stat proteins and oncogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 9, p. 1139-1142, 2002.
- CALMON, M. F. et al. Epigenetic silencing of CRABP2 and MX1 in head and neck tumors. **Neoplasia**, v. 11, n. 12, p. 1329-1339, 2009.
- CALÒ, V. et al. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 197, n. 2, p. 157-168, 2003.

- CHAWLA-SARKAR, M.; LEAMAN, D. W.; BORDEN, E. C. Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)-beta compared with IFN-alpha2: correlation with TRAIL/Apo2L induction in melanoma cell lines. **Clinical Cancer Research**, v. 7, n. 6, p. 1821-1831, 2001.
- CHAWLA-SARKAR, M. et al. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. **Apoptosis**, v. 8, n. 3, p. 237-249, 2003.
- CHELBI-ALIX, M. K.; WIETZERBIN, J. Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research. **Biochimie**, v. 89, n. 6/7, p. 713-718, 2007.
- CHIEUX, V. et al. Inhibition of Coxsackievirus B4 replication in stably transfected cells expressing human MxA protein. **Virology**, v. 283, n. 1, p. 84-92, 2001.
- DESMOND, J. C. et al. Discovery of epigenetically silenced genes in acute myeloid leukemias. **Leukemia**, v. 21, n. 5, p. 1026-1034, 2007.
- DIANOUX, L. et al. Les mécanismes de l'action antivirale des interférons: la voie PML. **Virologie**, v. 12, n. 1, p. 39-52, 2008.
- DOHMEN, R. J. SUMO protein modification. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1695, n. 1/3, p. 113-131, 2004.
- ENGELHARDT, O. G. et al. The homeodomain-interacting kinase PKM (HIPK-2) modifies ND10 through both its kinase domain and a SUMO-1 interaction motif and alters the posttranslational modification of PML. **Experimental Cell Research**, v. 283, n. 1, p. 36-50, 2003.
- ENGELHARDT, O. G. et al. Interferon-induced antiviral Mx1 GTPase is associated with components of the SUMO-1 system and promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. **Experimental Cell Research**, v. 271, n. 2, p. 286-295, 2001.
- ENGELHARDT, O. G. et al. Mx1 GTPase accumulates in distinct nuclear domains and inhibits influenza A virus in cells that lack promyelocytic leukaemia protein nuclear bodies. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 2315-2326, 2004.
- ESPERT, L.; DUSANTER-FOURT, I.; CHELBI-ALIX, M. K. Les régulations négatives de la voie JAK/STAT: implication dans la tumorigenèse. **Bulletin du Cancer**, v. 92, n. 10, p. 845-857, 2005.
- FERNÁNDEZ, M. et al. *In vivo* and *in vitro* induction of MxA protein in peripheral blood mononuclear cells from patients chronically infected with hepatitis C virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 2, p. 262-267, 1999.
- FIELDS, S.; STERNGLANZ, R. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. **Trends in Genetics**, v. 10, n. 8, p. 286-292, 1994.
- FIGUEROA-ROMERO, C. et al. SUMOylation of the mitochondrial fission protein Drp1 occurs at multiple nonconsensus sites within the B domain and is linked to its activity cycle. **FASEB Journal**, v. 23, n. 11, p. 3917-3927, 2009.
- FLOHR, F. et al. The central interactive region of human MxA GTPase is involved in GTPase activation and interaction with viral target structures. **FEBS Letters**, v. 463, n. 1/2, p. 24-28, 1999.
- GALISSION, F. et al. A el proteomics approach to identify SUMOylated proteins and their modification sites in human cells. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, n. 2, p. M110.0047961- M110.00479615, 2011.

- GAO, S. et al. Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA. **Nature**, v. 465, n. 7297, p. 502-506, 2010.
- GAO, S. et al. Structure of myxovirus resistance protein a reveals intra- and intermolecular domain interactions required for the antiviral function. **Immunity**, v. 35, n. 4, p. 514-525, 2011.
- GARCÍA-SASTRE, A. Induction and evasion of type I interferon responses by influenza viruses. **Virus Research**, v. 162, n. 1/2, p. 12-18, 2011.
- GEISS-FRIEDLANDER, R.; MELCHIOR, F. Concepts in sumoylation: a decade on. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 12, p. 947-956, 2007.
- GEY, G. O.; COFFMAN, W. D.; KUBICEK, M. T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. **Cancer Research**, v. 12, p. 264-265, 1952.
- GIETZ, R. D. Yeast two-hybrid system screening. **Methods in Molecular Biology**, v. 313, p. 345-371, 2006.
- GORDIEN, E. et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by the interferon-inducible MxA protein. **Journal of Virology**, v. 75, n. 6, p. 2684-2691, 2001.
- GOUJON, C. et al. Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. **Nature**, v. 502, n. 7472, p. 559-562, 2013.
- GUO, W. et al. Immortalization of human oral keratinocytes is associated with elevation of telomerase activity and shortening of telomere length. **Oncology Reports**, v. 5, n. 4, p. 799-804, 1998.
- HALLER, O.; KOCHS, G. Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 31, n. 1, p. 79-87, 2011.
- HALLER, O.; WEBER, F. The interferon response circuit in antiviral host defense. **Verhandelingen - Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België**, v. 71, n. 1/2, p. 73-86, 2009.
- HALLER, O.; KOCHS, G.; WEBER, F. Interferon, Mx, and viral countermeasures. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 18, n. 5/6, p. 425-433, 2007.
- HALLER, O.; STAEHELI, P.; KOCHS, G. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. **Biochimie**, v. 89, n. 6/7, p. 812-818, 2007.
- HALLER, O.; STERTZ, S.; KOCHS, G. The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 14/15, p. 1636-1643, 2007.
- HALLER, O. et al. Dynamin-like MxA GTPase: structural insights into oligomerization and implications for antiviral activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 37, p. 28419-28424, 2010.
- HOLZINGER, D. et al. Induction of MxA gene expression by influenza A virus requires type I or type III interferon signaling. **Journal of Virology**, v. 81, n. 14, p. 7776-7785, 2007.
- HOPE, I. A.; STRUHL, K. Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of Yeast. **Cell**, v. 46, n. 6, p. 885-894, 1986.
- HORISBERGER, M. A. Interferon-induced human protein MxA is a GTPase which binds transiently to cellular proteins. **Journal of Virology**, v. 66, n. 8, p. 4705-4709, 1992.

- HORISBERGER, M. A.; STAEHELI, P.; HALLER, O. Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 7, p. 1910-1914, 1983.
- HOCHSTRASSER, M. Origin and function of ubiquitin-like proteins. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 422-429, 2009.
- ISAACS, A.; LINDENMANN, J. Virus interference. I. The interferon. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 147, n. 927, p. 258-267, 1957.
- ISAACSON, M. K.; PLOEGH, H. L. Ubiquitination, ubiquitin-like modifiers, and deubiquitination in viral infection. **Cell Host & Microbe**, v. 5, n. 6, p. 559-570, 2009.
- JANZEN, C.; KOCHS, G.; HALLER, O. A monomeric GTPase-negative MxA mutant with antiviral activity. **Journal of Virology**, v. 74, n. 17, p. 8202-8206, 2000.
- JOHNSON, E. S. Protein modification by SUMO. **Annual Review Biochemistry**, v. 73, p. 355-382, 2004.
- KEEGAN, L.; GILL, G.; PTASHNE, M. Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. **Science**, v. 231, n. 4739, p. 699-704, 1986.
- KERSCHER, O.; FELBERBAUM, R.; HOCHSTRASSER, M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, p. 159-180, 2006.
- KNIPSCHIEER, P. et al. Noncovalent interaction between Ubc9 and SUMO promotes SUMO chain formation. **The EMBO Journal**, v. 26, n. 11, p. 2797-2807, 2007.
- KNIPSCHIEER, P. et al. Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination. **Molecular Cell**, v. 31, n. 3, p. 371-382, 2008.
- KOTAJA, N. et al. PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 14, p. 5222-5234, 2002.
- KOTENKO, S. V. et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. **Nature Immunology**, v. 4, n. 1, p. 69-77, 2003.
- KRIEGHOFF-HENNING, E.; HOFMANN, T. G. Role of nuclear bodies in apoptosis signalling. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, n. 11, p. 2185-2194, 2008.
- KULAEVA, O. I. et al. Epigenetic silencing of multiple interferon pathway genes after cellular immortalization. **Oncogene**, v. 22, n. 26, p. 4118-4127, 2003.
- LI, Y.; YOUSSEF, H. MxA overexpression reveals a common genetic link in four Fanconi anemia complementation groups. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 11, p. 2873-2880, 1997.
- LIN, D. Identification of a substrate recognition site on Ubc9. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 24, p. 21740-21748, 2002.
- LIN, D.-Y. et al. Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. **Molecular Cell**, v. 24, n. 3, p. 341-354, 2006.
- LINDENMANN, J. Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus. **Virology**, v. 16, p. 203-204, 1962.

- LIU, Y. et al. NF- $\kappa$ B Repression by PIAS3 Mediated RelA SUMOylation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e37636, 2012.
- LOO, Y-M.; GALE, M. Immune signaling by RIG-I-like receptors. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 680-692, 2011.
- LUSSIER, M. P. et al. MxA, a member of the dynamin superfamily, interacts with the ankyrin-like repeat domain of TRPC. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 19, p. 19393-19400, 2005.
- MA, J.; PTASHNE, M. Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. **Cell**, v. 55, n. 3, p. 443-446, 1988.
- MAHAJAN, R. et al. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. **Cell**, v. 88, n. 1, p. 97-107, 1997.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning**: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- MATUNIS, M. J.; ZHANG, X-D.; ELLIS, N. A. SUMO: the glue that binds. **Developmental Cell**, v. 11, n. 5, p. 596-597, 2006.
- MEULMEESTER, E.; MELCHIOR, F. Cell biology: SUMO. **Nature**, v. 452, n. 7188, p. 709-711, 2008.
- MIBAYASHI, M.; NAKAD, K.; NAGATA, K. Promoted cell death of cells expressing human MxA by influenza virus infection. **Microbiology and Immunology**, v. 46, n. 1, p. 29-36, 2002.
- MISHRA, R. K. et al. Dynamin interacts with members of the sumoylation machinery. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 30, p. 31445-31454, 2004.
- MUSHINSKI, J. F. et al. Inhibition of tumor cell motility by the interferon-inducible GTPase MxA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 22, p. 15206-15214, 2009.
- NISOLE, S. et al. Differential roles of PML isoforms. **Frontiers in Oncology**, v. 3, p. 1251-12517, 2013.
- NOSER, J. A. et al. The RAS/Raf1/MEK/ERK signaling pathway facilitates VSV-mediated oncolysis: implication for the defective interferon response in cancer cells. **Molecular Therapy**, v. 15, n. 8, p. 1531-1536, 2007.
- NUMAJIRI, A.; MIBAYASHI, M.; NAGATA, K. Stimulus-dependent and domain-dependent cell death acceleration by an IFN-inducible protein, human MxA. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 26, n. 4, p. 214-219, 2006.
- NUMAJIRI HARUKI, A. et al. Interferon-inducible antiviral protein MxA enhances cell death triggered by endoplasmic reticulum stress. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 31, n. 11, p. 847-856, 2011.
- OKURA, T. et al. Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. **Journal of Immunology**, v. 157, n. 10, p. 4277-4281, 1996.
- PAL, S. et al. Influenza A virus interacts extensively with the cellular SUMOylation system during infection. **Virus Research**, v. 158, n. 1/2, p. 12-27, 2011.
- PALANCADE, B.; DOYE, V. SUMOylating and deSUMOylating enzymes at nuclear pores: underpinning their unexpected duties? **Trends in Cell Biology**, v. 18, n. 4, p. 174-183, 2008.

- PARK, N. H. et al. Immortalization of normal human oral keratinocytes with type 16 human papillomavirus. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 9, p. 1627-1631, 1991.
- PAVLOVIC, J.; HALLER, O.; STAEHELI, P. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. **Journal of Virology**, v. 66, n. 4, p. 2564-2569, 1992.
- PAVLOVIC, J. et al. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. **Journal of Virology**, v. 64, n. 7, p. 3370-3375, 1990.
- PESTKA, S. et al. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Immunology**, v. 22, n. 1, p. 929-979, 2004.
- PILLA, E. et al. The SUMO1-E67 interacting loop peptide is an allosteric inhibitor of the dipeptidyl peptidases 8 and 9. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 45, p. 32787-32796, 2013.
- PILLA, E. et al. A el SUMO1-specific interacting motif in dipeptidyl peptidase 9 (DPP9) that is important for enzymatic regulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 53, p. 44320-44329, 2012.
- PRAEFCKE, G. J. K.; HOFMANN, K.; DOHMEN, R. J. SUMO playing tag with ubiquitin. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 37, n. 1, p. 23-31, 2012.
- RABELLINO, A. et al. The SUMO E3-ligase PIAS1 regulates the tumor suppressor PML and its oncogenic counterpart PML-RARA. **Cancer Research**, v. 72, n. 9, p. 2275-2284, 2012.
- READ, E. K. C.; DIGARD, P. Individual influenza A virus mRNAs show differential dependence on cellular NXF1/TAP for their nuclear export. **The Journal of General Virology**, v. 91, n. 5, p. 1290-1301, 2010.
- SADLER, A. J.; WILLIAMS, B. R. G. Interferon-inducible antiviral effectors. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 7, p. 559-568, 2008.
- SCHOENBORN, J. R.; WILSON, C. B. Regulation of interferon- $\gamma$  during innate and adaptive immune responses. **Advances in Immunology**, v. 96, p. 41-101, 2007.
- SCHULZ, W. A. et al. Factor interaction analysis for chromosome 8 and DNA methylation alterations highlights innate immune response suppression and cytoskeletal changes in prostate cancer. **Molecular Cancer**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2007.
- SELECTED suppliers of reagents and equipment. In: AUSUBEL, F. M. **Current protocols in molecular biology**. Boston: Wiley, 1987.
- SHEN, T. H. et al. The mechanisms of PML-nuclear body formation. **Molecular Cell**, v. 24, n. 3, p. 331-339, 2006.
- SHEPPARD, P. et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. **Nature Immunology**, v. 4, n. 1, p. 63-68, 2003.
- SILVA-FERRADA, E. da. et al. Strategies to identify recognition signals and targets of SUMOylation. **Biochemistry Research International**, v. 2012, n. 1, p. 875148-16, 2012.
- SRIRAMACHANDRAN, A. M.; DOHMEN, R. J. SUMO-targeted ubiquitin ligases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1843, n. 1, p. 75-85, 2014.

- STAEHELI, P. et al. Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 8, n. 10, p. 4518-4523, 1988.
- THOMPSON, G. M.; CANO, V. S. P.; VALENTINI, S. R. Mapping eIF5A binding sites for Dys1 and Lia1: *in vivo* evidence for regulation of eIF5A hypusination. **FEBS Letters**, v. 555, n. 3, p. 464-468, 2003.
- TODARO, G. J.; GREEN, H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. **The Journal of Cell Biology**, v. 17, p. 299-313, 1963.
- TROST, M.; KOCHS, G.; HALLER, O. Characterization of a novel serine/threonine kinase associated with nuclear bodies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 10, p. 7373-7377. 2000.
- UZÉ, G.; MONNERON, D. IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family. **Biochimie**, v. 89, n. 6/7, p. 729-734, 2007.
- VAN DER VEEN, A. G.; PLOEGH, H. L. Ubiquitin-like proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, p. 323-357, 2012.
- VERHELST, J.; HULPIAU, P.; SAELENS, X. Mx proteins: antiviral gatekeepers that restrain the uninvited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**: MMBR, v. 77, n. 4, p. 551-566, 2013.
- VERHELST, J. et al. Interferon-inducible protein Mx1 inhibits influenza virus by interfering with functional viral ribonucleoprotein complex assembly. **Journal of Virology**, v. 86, n. 24, p. 13445-13455, 2012.
- WILLIAMS, B. R. PKR: a sentinel kinase for cellular stress. **Oncogene**, v. 18, n. 45, p. 6112-6120, 1999.
- WILSON, V. G. SUMOylation at the host-pathogen interface. **Biomolecules**, v. 2, n. 2, p. 203-227, 2012.
- WISSKIRCHEN, C. et al. The cellular RNA helicase UAP56 is required for prevention of double-stranded RNA formation during influenza A virus infection. **Journal of Virology**, v. 85, n. 17, p. 8646-8655, 2011a.
- WISSKIRCHEN, C. et al. Interferon-induced antiviral protein MxA interacts with the cellular RNA helicases UAP56 and URH49. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 40, p. 34743-34751, 2011b.
- WOTTON, D.; MERRILL, J. C. Pc2 and SUMOylation. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1401-1404, 2007.
- YAN, N.; CHEN, Z. J. Intrinsic antiviral immunity. **Nature Immunology**, v. 13, n. 3, p. 214-222, 2012.
- YUAN, W.; KRUG, R. M. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 3, p. 362-371, 2001.
- ZHAO, C. et al. Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 29, p. 10200-10205, 2005.

ZHAO, C. et al. The UbcH8 ubiquitin E2 enzyme is also the E2 enzyme for ISG15, an IFN-alpha/beta-induced ubiquitin-like protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 20, p. 7578-7582, 2004.

ZHAO, J. SUMOylation regulates diverse biological processes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 23, p. 3017-3033, 2007.

## ANEXOS



# Papel da proteína Mx1 na resposta a interferons e no processo neoplásico

Brantis-de-Carvalho, C.E.<sup>1</sup>; Boldrin, P.E.G.<sup>1</sup>; Silva Júnior, W.A.<sup>2</sup>;  
Rahal, P.<sup>3</sup>; Tajara, E.H.<sup>4</sup>; Carraro, D.M.<sup>5</sup>; Camargo, A.A.<sup>6</sup>; Zanelli, C.F.<sup>1</sup>; Valentini, S.R.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina – USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

<sup>3</sup> IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

<sup>4</sup> Faculdade de Medicina – FAMERP, São José do Rio Preto, SP, Brasil. Instituto de Biociências – USP, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>5</sup> Hospital do câncer A.C. Camargo – Centro Médico e de pesquisa, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>6</sup> Instituto Ludwig de pesquisa para o Câncer no Hospital Oswaldo Cruz, São Paulo, SP, Brasil.

Recebido 20/10/2011 / Aceito 17/12/2011

## RESUMO

A proteína Mx1 é codificada por um gene induzido por interferon e compartilha a organização de seus domínios, a capacidade de homo-oligomerização e associação com membranas com as grandes dinaminas GTPases. A proteína Mx1 está envolvida na resposta contra um grande número de vírus de RNA, como aqueles pertencentes à família Bunyavirus e o vírus influenza. Curiosamente, o gene *MX1* foi encontrado como silenciado por metilação em diversos processos neoplásicos, incluindo carcinomas de cabeça e pescoço de células escamosas. Neste cenário, o silenciamento gênico de *MX1* está associado à imortalização de uma série de linhagens celulares neoplásicas. Assim, Mx1 se destaca como uma das principais proteínas envolvidas nas respostas imunes induzidas por interferon e também desempenha um importante papel no controle do ciclo celular. Aqui discutimos os aspectos funcionais da proteína Mx1 abordando sua atividade antiviral, organização estrutural, envolvimento com neoplasias e, principalmente, os aspectos funcionais obtidos pela determinação de seus parceiros celulares.

**Palavras-Chave:** Interferons. MX1. JAK/STAT. Vírus. Neoplasia. PML-NBs. SUMOilação.

## INTRODUÇÃO

### Interferons

Apesar da descoberta dos interferons ter ocorrido há mais de 50 anos, o estudo dos mesmos se mantém até hoje

como uma área de pesquisa altamente atrativa. Atualmente, os interferons são divididos em três subfamílias: interferons dos Tipos I, II e III. A subfamília do tipo I compreende os interferons  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\omega$ ,  $\kappa$ , e  $\tau$ . A do tipo III é composta pelos interferons  $\lambda$ , também conhecidos como interleucinas IL-29 ( $\lambda 1$ ), IL-28a ( $\lambda 2$ ) e IL-28b ( $\lambda 3$ ), e possuem um “link” evolutivo com a família dos IFNs do tipo I. Essas subfamílias são descritas como mediadoras da potente atividade antiviral e do controle da proliferação celular. Finalmente, a subfamília do tipo II compreende somente o interferon  $\gamma$ , envolvido principalmente na modulação da resposta imune (Chawla-Sarkar et al., 2003; Caraglia et al., 2005; Bonjardim et al., 2009; Li et al., 2009).

A ação de interferons é mediada pela capacidade de induzirem à expressão de uma série de genes (>300 genes) por meio da ativação da via JAK/STAT (Bromberg, 2002; Calò et al., 2003; Chawla-Sarkar, 2003; Brand et al., 2005). Nesta via, a ligação de interferons do tipo I e III aos receptores formados pelas proteínas IFNAR1/IFNAR2 e IL-10R2/IFNLR1, respectivamente, leva à fosforilação e interação de STAT1 e STAT2. O heterodímero formado interage fisicamente com IRF9, formando o complexo conhecido como ISG3, que, através da interação com o elemento ISRE no DNA, promove a expressão de *MX1* e de outros genes importantes para a resposta de imunidade inata a vírus (Figura 1). Por outro lado, o interferon do tipo II liga-se ao receptor formado pelas proteínas IFNGR1/IFNGR2, levando à fosforilação das proteínas STAT1, STAT3, STAT5 as quais formam homodímeros que se ligam ao elemento GAS no DNA e promovem a expressão de uma série de outros genes (Aaronson, 2002; Uzé & Monneron, 2007; Sadler & Williams, 2008).

Neste contexto, interferons induzem à apoptose celular pela ativação de receptores de morte celular. Resumidamente, a sensibilização de células por interferons leva à indução da expressão de TRAIL/Apo2L e Fas/FasL, que recrutam e ativam FADD. A ativação de FADD gera a ativação da cascata de caspases iniciada pela clivagem de pro-caspase 8 em caspase 8, a qual, assim como TRAIL,

*Autor correspondente:* Dr. Sandro Roberto Valentini - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - Rodovia Araraquara-Jaú, Km1 CEP.14801-902 - Araraquara - SP - Brasil - fone: (16)3301-6996 - fax:(16)3301-6940 e-mail:valentsr@fcar.unesp.br

Fas/FasL e caspase 4, tem sua expressão induzida por interferons. Caspase 8 atua como protease sobre Bid, um membro pró-apoptótico da família Bcl2 de proteínas mitocondriais, resultando no rompimento do potencial mitocondrial e na liberação do citocromo C da mitocôndria para o citoplasma, que age como um cofator na estimulação da formação do complexo entre Apaf1 e caspase 9. Este complexo potencializa a ativação de caspase 3, que é seguida por alterações na simetria da membrana citoplasmática, pela clivagem de PARP, pela condensação da cromatina, pela fragmentação do DNA e, finalmente, pela morte celular (Ruiz-Ruiz et al., 2000; Chawla-Sarkar et al., 2001; Chen et al., 2001; De Veer et al., 2001; Chawla-Sarkar et al., 2003; Leaman et al., 2003).

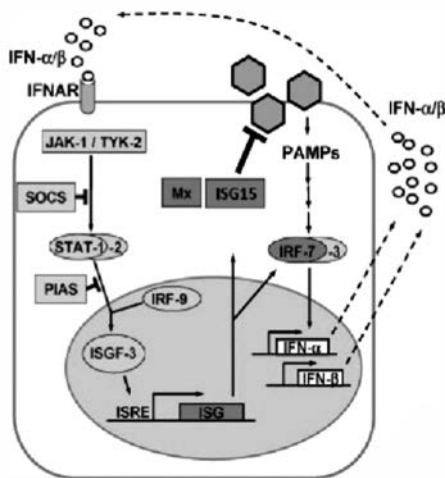


Figura 1. Sinalização por interferon (IFN). Os interferons  $\alpha$  e  $\beta$  ligam-se a seus receptores, presentes na superfície celular, e ativam a expressão de uma série de genes, através da fosforilação consecutiva das proteínas constituintes da via JAK/STAT de sinalização. Os genes expressos mediante a ligação ao receptor atuam nas diversas vias de ação dos interferons, entre eles, IRF-7 atua na amplificação do sinal mediado por receptores de PAMP (padrões moleculares associados a patógenos), levando à transcrição mediada por NF- $\kappa$ B, IRF-3, entre outros, elevando assim a produção e secreção de IFN pelas células. A sinalização por IFN sofre inibição por *feedback* mediada pelas proteínas das famílias SOCS e PIAS (Adaptada de Haller et al., 2007b).

Outro fator envolvido nos mecanismos de ação e regulação da resposta a interferons do tipo I e III é a sua capacidade em induzir à modificação de uma série de proteínas por ISG15 (Figura 2). A via de modificação pela proteína ISG15 se assemelha àquela utilizada por ubiquitina e SUMO-1, na qual a proteína é expressa na forma precursora, a qual é processada para expor a sequência de aminoácidos LRLRGG em sua porção C-terminal, necessária para sua correta ativação e conjugação. Os resíduos de glicina desta região, equivalentes aos de SUMO-1 e Ubiquitina, são adenilados e conjugados por meio de ligações tioéster a resíduos de cisteína de três enzimas: uma enzima de ativação de ubiquitina (E1, UBE1L), uma de conjugação (E2, UBE2E1 ou UBE2L6) e outra de ligação (E3), antes de ser transferida para um resíduo de lisina na proteína alvo. Duas E3 ubiquitinas ligases, HERC5 e TRIM25, foram identificadas por atuar na ligação de ISG15 à proteína alvo via domínio HECT e RING, respectivamente. Este

processo também foi caracterizado como reversível pela atuação de proteases ubiquitina-específicas denominadas USP2, USP3, USP5, USP13 e USP18. Entre as proteínas induzidas por interferon conhecidamente modificadas por ISG15 estão: JAK1, STAT1 e Mx1. Além de proteínas próprias, também foi demonstrado que algumas proteínas virais podem sofrer inibição de sua função via modificação por ISG15. A Figura 2 representa um esquema simplificado de como ocorre a conjugação de ISG15 à proteína alvo. Todas essas enzimas contêm alta homologia de sequência e estrutura com as enzimas envolvidas na via de ubiquitinação (Yuan & Krug, 2001; Zhao et al., 2004; Zhao et al., 2005; Sadler & Willians, 2008).

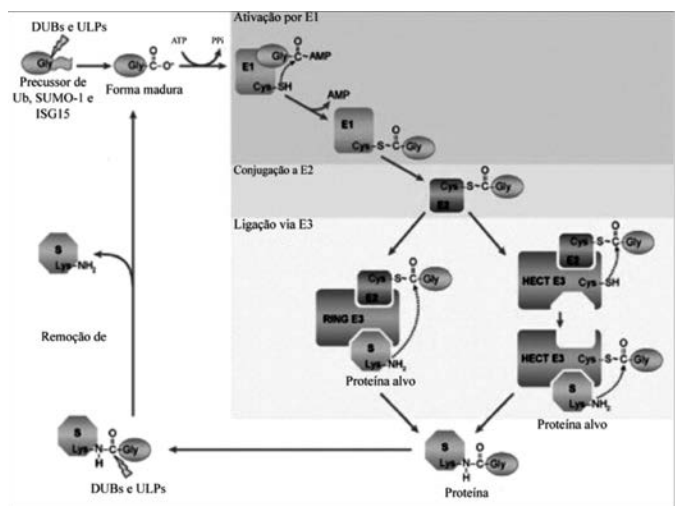


Figura 2. Esquema da conjugação da proteína Ubiquitina (Ub) e de proteínas semelhantes à Ubiquitina (Ubl: SUMO-1 e ISG15) à proteína alvo. Essas proteínas modificadoras são produzidas na forma de precursores inativos que sofrem a ação de proteases específicas (DUB - desubiquitinasas ou ULP - Ubl Proteases específicas) para expor na região C-terminal o resíduo de glicina necessário para a formação da ligação tioéster com o resíduo de lisina na proteína alvo da modificação. Esta modificação ocorre em três etapas: (1) Ativação: as Ub e Ubls são ligadas por adenilação a um resíduo de cisteína da Enzima de ativação (E1), envolvendo o gasto de uma molécula de ATP; (2) Conjugação: Ub e Ubls são transferidas para a enzima de conjugação (E2) através de uma transtilação e, (3) Ligação: Ub e Ubls sofrem a ação das enzimas de ligação (E3), formando a ligação do tipo tioéster com a proteína alvo. As E3 ligases podem atuar tanto mediando a transferência direta de Ub e Ubls para a proteína alvo (RING E3) ou ligando-se covalentemente às proteínas modificadoras antes de transferi-las para a proteína alvo (HECT E3). As Ub e Ubl podem ser removidas pelas proteases que atuam na sua ativação (Adaptado de Kerscher et al., 2006).

## A PROTEÍNA Mx1

### Aspectos estruturais

O gene *MX1* (myxovirus resistance 1), também chamado de *IFI78* (Interferon-inducible protein p78) ou *MxA* para o gene humano, encontra-se entre os genes conhecidos por sua expressão e atuação dependente da indução por interferons do tipo I e III, atuando como mediador da imunidade inata e na resistência a vírus de RNA (Bromberg, 2002; Calò et al., 2003; Brand et al., 2005; Haller et al., 2007a).

A proteína Mx1, um membro da superfamília de GTPases dinaminas, é estruturalmente organizada em domínio de ligação ao GTP (GTPase) e domínio central de interação (CID/MD), em sua porção N-terminal, e domínio efetor de GTPase (GED/LZ), em sua porção C-terminal. Essa família ainda inclui: a proteína dinamina-1 (huDYN1) - que, além dos domínios descritos para Mx1 (huMx1), possui ainda os domínios *pleckstrin homology domain* (PH) e o *proline-rich domain* (PRD). Esta família ainda inclui a proteína Mx2 de humano (huMx2), Mx1 de camundongos (muMx1) e a proteína dinamina-1 (huDYN1), entre outras proteínas (Figura 3A) (Holzinger et al., 2007; Haller et al., 2007a). Ainda quanto à estrutura de Mx1, foi demonstrado, através de ensaios de cristalização, que a região correspondente aos domínios CID e GED é estruturada em 6 alfa-hélices envolvidas na formação de uma única estrutura terciária final (Figura 3B), determinante para a correta formação do homo-oligômero de Mx1 (Gao et al., 2010; Haller et al., 2010).

O homo-oligômero de Mx1 é formado através da interação entre 16 monômeros, os quais se organizam em uma estrutura semelhante a um anel, onde o domínio globular de GTPase encontra-se na face externa do complexo e os domínios CID e GED na face interna (Figura 3C), coordenando a interação (Haller et al., 2010; Gao et al., 2010). Essa capacidade de oligomerização leva à formação de grânulos de Mx1 - frequentemente encontrados em associação com membranas celulares, como a do retículo endoplasmático em mamíferos - sendo necessária para a atividade de GTPase e a manutenção da estabilidade desta proteína, uma vez que uma forma mutada de Mx1 (L612K), incapaz de formar oligômeros, não possui atividade de GTPase e é degradada em aproximadamente duas horas, em contraste com a forma selvagem que tem aproximadamente meia vida de 24 horas (Janzen et al., 2000; Holzinger et al., 2007; Haller et al., 2007a).

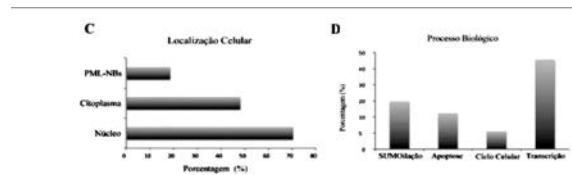
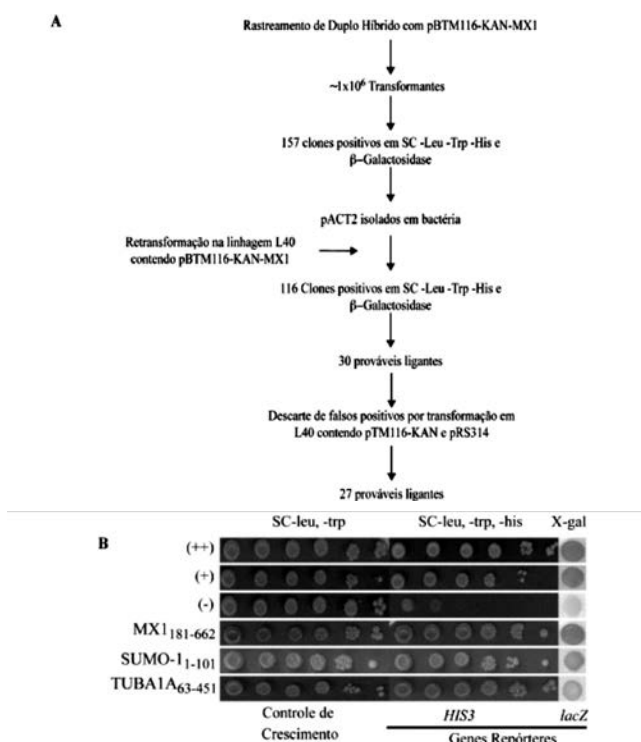


Figura 3. Domínios e estrutura das proteínas Mx e de seu homo-oligômero. (A) Comparação entre a organização dos domínios de Mx1 de humano (huMx1), Mx2 de humano (huMx2), Mx1 camundongos (muMx1) e dinamina-1 de humano (huDYN1). Estas proteínas apresentam os seguintes domínios: o domínio de ligação a GTP, que contém os “motifs” que coordenam a ligação à molécula de GTP (barras) e a região conhecida como domínio de autoassociação (SAD), envolvida na sua dimerização quando ligado à molécula de GTP; o domínio central de interação (CID/MD) e o domínio efetor de GTPase (GED), também chamando de *Zipper* de Leucina em huMx1 (LZ). Além desses, a proteína huDYN1 contém os domínios de ligação a membranas lipídicas (pleckstrin – PH) e o domínio rico em prolina (PR). (B) A estrutura do cristal obtido para a região correspondente aos domínios CID e GED de huMx1, denominado de “stalk”. As posições das alças encontradas e do domínio de ligação a GTP (GTPase) são indicadas na estrutura. (C) Modelo da estruturação do homo-oligômero de huMx1 onde 16 monômeros interagem gerando uma estrutura em anel, a região conhecida como “stalk” está presente no interior da estrutura, sendo a principal responsável pela sua formação enquanto o domínio de ligação a GTP (GTPase) é encontrado em uma posição mais externa à estrutura formada (Adaptado de Haller et al., 2007a e Haller et al., 2011).

#### Função na resposta imune

As proteínas Mx foram descobertas em estudos de resistência ao vírus da influenza realizados em camundongos, os quais mostraram que os animais isogênicos que apresentavam resistência ao vírus da influenza carregavam uma cópia funcional do gene *MX1* contido no cromossomo 16, ao passo que aqueles animais suscetíveis à infecção apresentavam depleções e/ou mutações que tornavam inativo tal gene (Lindenmann, 1962; Horisberger et al., 1983; Staeheli et al., 1988). Além da identificação de proteínas Mx em camundongo e humano, foram descritas proteínas similares em outros organismos vertebrados e invertebrados (Haller & Weber, 2009).

Como mediadora da resposta imune inata desencadeada por interferons, demonstrou-se a capacidade de Mx1 de inibir a replicação viral através do bloqueio do transporte dos nucleocapsídeos virais para o núcleo. Ainda, Mx1 de humanos apresenta um amplo espectro de atividade antiviral, sendo capaz de reconhecer e inibir vírus de replicação citoplasmática e nuclear, como no caso dos vírus pertencentes às famílias bunivírus, ortomixovírus, paramixovírus, rabdovírus, togavírus, entre outras (Haller et al., 2007b). Neste sentido, foi demonstrado que Mx1 não é capaz de impedir a síntese de RNAs virais, o que ocorre no núcleo celular, porém os experimentos conduzidos mostraram que não só a síntese de proteínas virais, mas também a de proteínas celulares é inibida pela presença de Mx1. Além disso, foi demonstrada a influência da oligomerização de Mx1 durante a resposta antiviral, em um mecanismo no qual um monômero de Mx1 se liga ao capsídeo viral e leva à oligomerização de Mx1 sobre a partícula, estabilizando a ligação, fixando o capsídeo

às membranas celulares e impedindo a ligação dos fatores necessários para a translocação nuclear das proteínas virais (Holzinger et al., 2007; Haller et al., 2007b; Haller et al., 2010).

A Tabela 1 apresenta um resumo das principais isoformas de Mx1 encontradas em vertebrados, sua localização celular e atividade antiviral relatada. Na Tabela 1 também é relatado o tipo de material genético encontrado em cada vírus e seu local de replicação. Como pode ser visto, a proteína citoplasmática Mx1 de humanos (huMx1) é capaz de inibir vírus com replicação nuclear, o que não ocorre em nenhum outro organismo testado até o momento.

**Tabela 1.** Atividade antiviral das proteínas Mx de diferentes organismos

| Espécie         | Proteína | Localização       | Atividade antiviral             | Ácido Nucleico | Replicação |
|-----------------|----------|-------------------|---------------------------------|----------------|------------|
| Humano          | Mx1      | Citoplasma        | Influenza A                     | -ssRNA         | Núcleo     |
|                 |          |                   | Influenza B                     | -ssRNA         | Núcleo     |
|                 |          |                   | Influenza C                     | -ssRNA         | Núcleo     |
|                 |          |                   | Thogoto                         | -ssRNA         | Núcleo     |
|                 |          |                   | Parainfluenza Tipo 3            | -ssRNA         | Citoplasma |
|                 |          |                   | Febre do Vale Rift              | -ssRNA         | Citoplasma |
|                 |          |                   | La Crosse                       | -ssRNA         | Citoplasma |
|                 |          |                   | Febre hemorrágica Criméia-Congo | -ssRNA         | Citoplasma |
|                 |          |                   | Hantavírus                      | -ssRNA         | Citoplasma |
|                 |          |                   | Estomatite Vesiculosa           | -ssRNA         | Citoplasma |
|                 |          |                   | Febre suína africana            | dsDNA          | Citoplasma |
|                 |          |                   | Hepatite B                      | dsDNA-RT       | Núcleo     |
|                 |          |                   | Rubeola                         | ssRNA          | Citoplasma |
|                 |          |                   | Coxsackievírus                  | ssRNA          | Citoplasma |
|                 |          |                   | Floresta Semliki                | ssRNA          | Citoplasma |
|                 |          |                   | Doença Infecciosa Bursal        | ssRNA          | Citoplasma |
|                 | Mx2      | Núcleo/Citoplasma | Não apresenta                   |                |            |
| Camundongos     | Mx1      | Núcleo            | Influenza A                     | -ssRNA         | Núcleo     |
|                 |          |                   | Influenza B                     | -ssRNA         | Núcleo     |
|                 |          |                   | Thogoto                         | -ssRNA         | Núcleo     |
|                 | Mx2      | Citoplasma        | Estomatite Vesiculosa           | -ssRNA         | Citoplasma |
| Rato            | Mx1      | Núcleo            | Hantavírus                      | -ssRNA         | Citoplasma |
|                 |          |                   |                                 |                |            |
|                 | Mx2      | Citoplasma        | Influenza A                     | -ssRNA         | Núcleo     |
|                 |          |                   | Thogoto                         | -ssRNA         | Núcleo     |
|                 |          |                   |                                 |                |            |
|                 | Mx3      | Citoplasma        | Estomatite Vesiculosa           | -ssRNA         | Citoplasma |
|                 |          |                   | La Crosse                       | -ssRNA         | Citoplasma |
|                 |          |                   | Febre do Vale Rift              | -ssRNA         | Citoplasma |
| Rato do Algodão | Mx1      | Núcleo            | Não apresenta                   |                |            |
|                 |          |                   |                                 |                |            |
|                 | Mx2      | Citoplasma        | Influenza A                     | -ssRNA         | Núcleo     |
|                 |          |                   | Estomatite Vesiculosa           | -ssRNA         | Citoplasma |
|                 |          |                   | Febre do Vale Rift              | -ssRNA         | Citoplasma |

#### Ligantes de Mx1

Na tentativa de desvendar a função celular da proteína Mx1, uma série de proteínas ligantes de Mx1 foram identificadas pelas mais diversas técnicas. Neste aspecto, foi demonstrada a interação física por duplo-híbrido e *in vitro* entre huMx1 e proteínas da família TRPC

(*Transient receptor potential channel* 1, 3, 4, 5, 6 e 7). Funcionalmente esta interação levou à observação de que, quando superexpressa concomitantemente com TRPC6 em células HEK293T, a proteína huMx1 leva ao aumento da atividade de entrada de  $Ca^{2+}$  nas células e que mutantes de ligação a GTP - mas não os defectivos em atividade GTPásica - não apresentavam o mesmo comportamento

(Lussier et al., 2005). Assim sendo, huMx1 seria uma nova proteína envolvida nos mecanismos de controle das funções celulares atribuídas a íons de cálcio, como diferenciação, controle do ciclo celular e apoptose.

Ainda, foi revelado por rastreamento de duplo-híbrido com a proteína muMx1, que esta interage fisicamente com proteínas constituintes de corpúsculos nucleares denominados PML-NBs (Promyelocytic Leukaemia Nuclear Bodies), entre elas DAXX, SP100, TOPORS, BLM, TDG, FLASH, PIAS1 e proteínas da maquinaria de SUMOilação de proteínas Uba2 (E1) e SUMO-1 (Engelhardt et al., 2001), assim como a interação entre huMx1 e PKM/HIPK2 (Trost et al., 2000). Adicionalmente à identificação destas interações, foi demonstrado que homo-oligômeros da proteína muMx1 agrupam-se em grânulos distintos, porém em íntimo contato com os grânulos de PML (PML-NBs) e podem ser visualizados mesmo em células depletadas da proteína PML (Haller et al., 2007a). Assim, a presença de muMx1 em PML-NBs e a formação de grânulos de muMx1 podem estar relacionadas a estruturação de PML-NBs, uma vez que esta é capaz de ligar uma série de componentes deste corpúsculo.

Assim como as proteínas Mx, muitas das proteínas envolvidas na formação dos PML-NBs são transcricionalmente induzidas por interferons do tipo I e III. Tal fato é observado com as proteínas PML e SP100, entre outras, o que aponta para a possibilidade da atuação conjunta destas proteínas no desenvolvimento das respostas celulares à sensibilização por interferons. Além disso, vários dos componentes dos PML-NBs sofrem modificação por SUMO-1 (Figura 2) ou interagem fisicamente com proteínas SUMOiladas via “motif” de interação com SUMO1 (SIM – *SUMO interactive motif*), como a proteína DAXX. Outro fator interessante é a dependência da tripla SUMOilação e da presença de “motifs” SIM em PML, permitindo a interação física com os outros constituintes deste corpúsculo e, consequentemente, a formação de PML-NBs. Tais corpúsculos estão envolvidos em uma série de processos celulares como apoptose, controle de expressão gênica, mecanismos de reparo do DNA e resistência a vírus, o que demonstra a importância da SUMOilação de proteínas e da formação dos PML-NBs no controle destes processos (Lin, 2006; Bernardi et al., 2007; Haller et al., 2007a; Kriehoff-Henning & Hofmann, 2008).

Ainda, a SUMOilação pode afetar a localização celular, as interações entre proteínas, a estabilidade proteica e a atividade das proteínas alvo. Em um nível molecular, estas variáveis podem ocorrer por três diferentes mecanismos: primeiro, a SUMOilação pode esconder sítios de interação na proteína alvo, inibindo a interação entre esta e seus parceiros físicos; segundo, a SUMOilação pode criar novos sítios de ligação na proteína alvo e assim facilitar a ligação de outras moléculas como proteínas e DNA. Finalmente, se a proteína alvo também contiver um domínio de interação física com SUMO (SIM), isto pode levar à mudança em sua conformação e, consequentemente, em sua atividade (Meulmeester & Melchior, 2008).

Recentemente, nosso grupo realizou um rastreamento de duplo-híbrido com a proteína huMx1, visando elucidar o papel do silenciamento gênico causado pela hipermetilação de seu promotor no desenvolvimento e progressão de carcinomas de cabeça e pescoço (Calmon et al., 2009).

Neste caso, o ensaio de duplo-híbrido foi empregado para rastrear possíveis novos ligantes de huMx1 utilizando uma biblioteca de cDNAs de cérebro fetal humano, de acordo com o esquema apresentado na Figura 4A. Após as etapas de rastreamento, confirmação das interações e remoção de falsos negativos, foram identificados 27 ligantes prováveis (Figura 4A). A Figura 4B ilustra os resultados obtidos na confirmação da interação física entre huMx1 e proteínas previamente descritas como ligantes de muMx1: SUMO-1 (SUMO-1<sub>1-101</sub>), a própria proteína huMx1 (Mx1<sub>181-662</sub>) e TUBA1A (TUBA1A<sub>63-451</sub>) (Horisberger, 1992; Mushinski et al., 2009).

Os gráficos presentes na Figura 4C e 4D mostram os resultados obtidos na análise de ontologia genética dos 27 ligantes prováveis de huMx1 em termos de porcentagem da distribuição dos clones, segundo sua localização celular e envolvimento em processo biológico, respectivamente. A análise de ontologia genética mostrou que os ligantes estão principalmente envolvidos nos processos de regulação da transcrição, da apoptose e no controle do ciclo celular, assim como na SUMOilação de proteínas. Ainda, foram encontradas proteínas constituintes de PML-NBs e de localização nuclear e citoplasmática. Interessantemente, a análise ontológica das proteínas descritas como ligantes de muMx1 é semelhante à obtida para huMx1, independente da diferença de localização celular de Mx1 nesses dois organismos (Engelhardt et al., 2001; Trost et al., 2000).

Apesar de muitos dos ligantes encontrados para as proteínas Mx estarem relacionados à via de modificação pós-traducional de SUMO-1, não há descrição na literatura de que as proteínas Mx sejam SUMOiladas ou atuem diretamente na função desta via. Porém, foi descrito que huMx1 sofre duas modificações pela proteína ISG15 (Zhao et al., 2005), o que provavelmente altere sua capacidade de ligação e iniba a estruturação do homo-oligômero, gerando assim uma forma monomérica de Mx1.

Outro fato importante sobre huMx1 é a associação demonstrada entre as isoformas da proteína PML e a região de contato entre mitocôndrias e retículo endoplasmático, conhecida como membranas associadas a mitocôndrias (MAM). Assim, foi demonstrado que uma porção das proteínas PML (I-VI) não é translocada para o núcleo, podendo ser encontrada em diversos compartimentos citoplasmáticos, entre eles, a região de contato com mitocôndria (MAM) (Carracedo et al., 2011). Em estudo empregando fibroblastos de camundongos normais e depletados de PML (pml<sup>-/-</sup>), foi demonstrado que a presença de PML em associação com mitocôndrias é capaz de modular a liberação de íons Ca<sup>2+</sup> para a mitocôndria, regulando assim o processo apoptótico mediado por indutores conhecidos, como peróxido de hidrogênio, menadiona e tunicamicina (Giorgi et al., 2010). Como citado anteriormente, huMx1 interage fisicamente com proteínas da família TRPC, aumentando o influxo de cálcio (Lussier et al., 2005), interage com PML (Engelhardt et al., 2001), e seus grânulos citoplasmáticos se encontram em associação com a membrana do retículo endoplasmático (Accola et al., 2002; Kochs et al., 2005), o que sugere a possibilidade de Mx1 estar associada ao controle do processo apoptótico através da regulação da disponibilidade de cálcio intracelular ou na liberação deste para mitocôndrias.

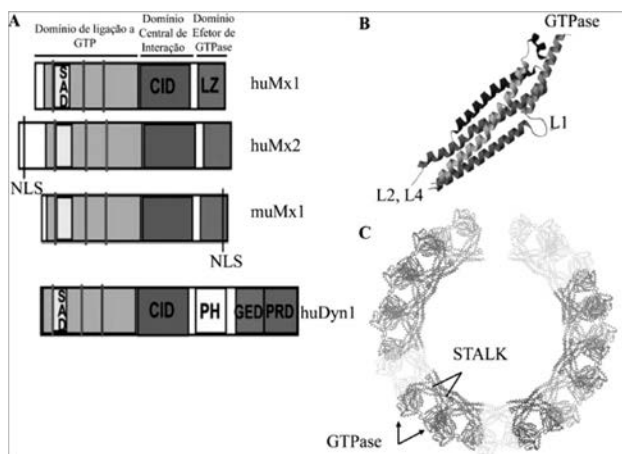


Figura 4. Caracterização funcional de MX1 através da determinação de seus ligantes. (A) Representação esquemática das etapas e resultados do rastreamento de duplo-híbrido em levedura realizado com Mx1 de humano. Neste rastreamento foi empregada uma biblioteca de cDNAs de cérebro fetal humano clonados no vetor pACT2, da qual foi possível isolar 27 prováveis ligantes de Mx1, após a eliminação de falsos positivos. (B) Resultados obtidos no teste de ativação dos genes repórteres HIS3 e lacZ da linhagem L40 de *S. cerevisiae* dos clones codificantes para Mx1 (181-662 aa), SUMO-1 (1-101 aa) e TUBA1A (63-451 aa), cuja interação com muMx1 já havia sido descrita em estudos anteriores. Um transformante de cada linhagem L40 contendo a combinação do plasmídeo pBTM116-KAN-MX1 com um dos plasmídeos isolados da biblioteca pACT2-MX1<sub>181-662</sub>, pACT2-SUMO-1<sub>1-101</sub> e pACT2-TUBA1A<sub>63-451</sub> foi cultivado nos meios de cultura SC-leu,-trp, SC-leu,-trp,-his e testados para atividade de  $\beta$ -galactosidase. L40/pBTM116-AMP-TIF51A + pACT-Dys1 (++), L40/pBTM116-AMP-TIF51A + pACT-Lia1(+), L40/pBTM116-AMP-TIF51A + pACT (-) e L40/pBTM116-KAN-MX1 + pACT (MX1+AD) foram utilizadas como controle positivo forte, positivo fraco e negativo, respectivamente. Após sequenciamento dos clones obtidos e identificação dos genes contidos nestes clones, foi realizada a análise de ontologia genética e agrupados de acordo com sua localização celular (C) e envolvimento em processos biológicos das proteínas codificadas pelos genes identificados (D).

#### Associação com câncer

O silenciamento de diversos genes de resposta a interferons foi relacionado ao processo de desenvolvimento neoplásico devido à sua influência no processo apoptótico (Kulaeva et al., 2003; Fridman et al., 2006). Neste sentido, foi descrito que o gene *MX1* se encontra metilado em carcinoma de células de leucemia mieloide aguda (Desmond et al., 2007), e que seu silenciamento está associado à progressão do câncer e ao fenótipo de imortalização em células tumorais (Kulaeva et al., 2003; Noser, 2007). Além disso, o gene *MX1* é pouco expresso em carcinoma de próstata, onde sua expressão foi ligada à inibição do fenótipo de motilidade e invasão celular (Schulz et al., 2007; Mushinski et al., 2009).

Em concordância com esses dados, nosso grupo identificou o gene *MX1* e este se encontra diferencialmente expresso em linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço (Calmon et al., 2009). Assim, a partir da utilização de uma biblioteca subtrativa de cDNAs obtida da linhagem FaDu (derivada de carcinoma espinocelular de faringe) pré e pós tratamento com o agente inibidor de metilação 5-aza-2'-desoxicitidina (5Aza-dC), foi possível determinar que o gene *MX1* encontrava-se silenciado por metilação na

linhagem FaDu. Após as etapas de validação do resultado inicial, a utilização das técnicas de microarray, PCRs metilação específica e qRT-PCR apontaram que, além da linhagem FaDu, esse gene também se encontrava metilado na linhagem UM-SCC-14A (linhagem derivada de carcinoma escamoso de assoalho de boca). Neste estudo, também foi determinado que há uma correlação estatística entre o aumento do tamanho do tumor e a hipermetilação de *MX1*.

Curiosamente, tratando-se de outras doenças, foi demonstrado uma situação oposta onde o aumento nos níveis de expressão de *MX1* confere uma maior sensibilidade à morte celular induzida por Fas/FasL, irradiação UV e infecção viral (Mibayashi et al., 2002) e que a superexpressão de *MX1* em células de alguns dos grupos de complementação da Anemia Fanconi, está relacionada ao fenótipo característico de indução de morte celular na medula óssea desta doença (Li & Youssoufian, 1997).

#### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Interferons estão entre as primeiras proteínas humanas a serem eficazes no tratamento do câncer e entre os primeiros produtos gerados pela tecnologia do DNA recombinante a serem usados em estudos clínicos (Chawla-Sarkar et al., 2003). Neste contexto, o IFN $\alpha$  é uma das citocinas mais usadas na terapia de diversas neoplasias como os mielomas, melanomas, carcinomas de células renais, tumores de cabeça e pescoço e de células epidermóides, tendo emergido como um importante regulador do crescimento e diferenciação de células cancerosas, afetando a comunicação celular e as vias de transdução de sinal (Caraglia et al., 2005).

Apesar dos efeitos benéficos dos interferons em algumas doenças malignas, mesmo em baixas condições de resposta, parte dos pacientes falha em responder ao tratamento. Assim, a ausência de resposta a interferons é tida como um importante fator no desenvolvimento neoplásico. De acordo com esta observação está o fato de que genes conhecidamente induzidos por interferons e com papel antitumoral foram descritos como diferencialmente metilados em diversas linhagens de células neoplásicas, as quais, após o tratamento com o agente desmetilante 5-azacitidina e interferons, apresentam fenótipos característicos de células apoptóticas, como aumento do tamanho celular e fragmentação de DNA (Karpf et al., 1999; Liang et al., 2002; Kulaeva et al., 2003). Assim, faz-se necessário um melhor entendimento dos mecanismos que mediam a ação antitumoral de interferons e dos fatores responsáveis pela ausência de resposta no tratamento de neoplasias.

De especial interesse, faz-se necessário entender o papel que Mx1 desempenha neste processo, pois seu silenciamento está relacionado à imortalização celular, o que provavelmente se deve à desregulação das vias de ação de interferons. Uma vez que Mx1 é capaz de interagir com as proteínas constituintes dos PML-NBs e da maquinaria de SUMOilação, levanta-se a possibilidade de Mx1 participar, via interferência no processo de SUMOilação, na formação dos PML-NBs, podendo atuar como E3 ligase de seus constituintes. Ainda, as demais investigações sobre seu papel devem buscar identificar a existência de outras modificações pós-traducionais por

SUMO-1 e definir os locais de modificação por ISG15 e como ambas influenciariam na atividade antiviral de Mx1 e na formação do homo-oligômero. Além disso, seria importante investigar a presença de variantes nucleares de Mx1, os quais justificariam a existência de parceiros físicos nucleares para a forma citoplasmática da proteína humana e a associação entre Mx1 e a apoptose desencadeada por  $Ca^{2+}$  e as novas funções atribuídas à proteína PML.

## ABSTRACT

*Role of Mx1 protein in the response to interferons and neoplastic process*

**The Mx1 protein is encoded by an interferon-induced gene and shares domain organization, homo-oligomerization capacity and membrane association with the large dynamin-like GTPases. The Mx1 protein is involved in the response to a large number of RNA viruses, such as the bunyavirus family and the influenza virus. Interestingly, it has also been found as a methylation-silenced gene in several types of neoplasm, including head and neck squamous cell carcinoma. In this scenario, MX1 gene silencing is associated with immortalization in several neoplastic cell lines. Thus, Mx1 stands out as one of the key proteins involved in interferon-induced immune response and also plays an important role in cell cycle control. Here we discuss some of the functions of the Mx1 protein, including its antiviral activity, protein folding and involvement in neoplasia, as well as those revealed by investigating its cellular partners.**

Keywords: Interferons. MX1. JAK/STAT. Virus. Neoplasia. PML-NBs. SUMOylation.

## REFERÊNCIAS

- Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science*. 2002; 296(5573):1653–5.
- Accola MA, Huang B, Masri Al A, McNiven MA. The antiviral dynamin family member, MxA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2002; 277(24):21829–35.
- Bernardi R, Pandolfi PP. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8(12):1006–16.
- Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG. Interferons: signaling, antiviral and viral evasion. *Immunol Lett*. 2009; 122(1):1–11.
- Brand S, Zitzmann K, Dambacher J, Beigel F, Olszak T, Vlotides G, et al. SOCS-1 inhibits expression of the antiviral proteins 2',5'-OAS and MxA induced by the novel interferon-lambdas IL-28A and IL-29. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 331(2):543–8.
- Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest*. 2002; 109(9):1139–42.
- Calmon MF, Rodrigues RV, Kaneto CM, Moura RP, Silva SD, Mota LDC, et al. Epigenetic Silencing of CRABP2 and MX1 in Head and Neck Tumors. *Neoplasia*. 2009; 11(12):1329–39.
- Calò V, Migliavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, et al. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol*. 2003; 197(2):157–68.
- Caraglia M, Marra M, Pelaia G, Maselli R, Caputi M, Marsico SA, et al. Alpha-interferon and its effects on signal transduction pathways. *J Cell Physiol*. 2005; 202(2):323–35.
- Carracedo A, Ito K, Pandolfi PP. The nuclear bodies inside out: PML conquers the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol*. 2011; 23(3):360–6.
- Chawla-Sarkar M, Lindner D, Liu Y, Williams B, Sen G, Silverman R, et al. Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis*. 2003; 8(3):237–49.
- Chawla-Sarkar M, Leaman DW, Borden EC. Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)-beta compared with IFN-alpha2: correlation with TRAIL/Apo2L induction in melanoma cell lines. *Clin Cancer Res*. 2001; 7(6):1821–31.
- Chen Q, Gong B, Mahmoud-Ahmed AS, Zhou A, Hsi ED, Hussein M, et al. Apo2L/TRAIL and Bcl-2-related proteins regulate type I interferon-induced apoptosis in multiple myeloma. *Blood*. 2001; 98(7):2183–92.
- Desmond JC, Raynaud S, Tung E, Hofmann W-K, Haeflrich T, Koeffler HP. Discovery of epigenetically silenced genes in acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2007; 21(5):1026–34.
- Engelhardt O. Interferon-Induced Antiviral Mx1 GTPase Is Associated with Components of the SUMO-1 System and Promyelocytic Leukemia Protein Nuclear Bodies. *Exp Cell Res*. 2001; 271(2):286–95.
- Fridman AL, Tang L, Kulaeva OI, Ye B, Li Q, Nahhas F, et al. Expression profiling identifies three pathways altered in cellular immortalization: interferon, cell cycle, and cytoskeleton. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2006; 61(9):879–89.
- Gao S, Malsburg von der A, Paeschke S, Behlke J, Haller O, Kochs G, et al. Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA. *Nature*. 2010; 465(7297):502–6.
- Giorgi C, Ito K, Lin H-K, Santangelo C, Wieckowski MR, Lebedzinska M, et al. PML regulates apoptosis at endoplasmic reticulum by modulating calcium release. *Science*. 2010; 330(6008):1247–51.
- Haller O, Weber F. The interferon response circuit in antiviral host defense. *Verh K Acad Geneesk Belg*. 2009; 71(1-2):73–86.

- Haller O, Kochs G. Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. *J Interferon Cytokine Res.* 2011; 31(1):79–87.
- Haller O, Gao S, Malsburg von der A, Daumke O, Kochs G. Dynamin-like MxA GTPase: structural insights into oligomerization and implications for antiviral activity. *J Biol Chem.* 2010; 285(37):28419–24.
- Haller O, Stertz S, Kochs G. The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins. *Microbes Infect.* 2007a; 9(14-15):1636–43.
- Haller O, Kochs G, Weber F. Interferon, Mx, and viral countermeasures. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007b; 18(5-6):425–33.
- Holzinger D, Jorns C, Stertz S, Boisson-Dupuis S, Thimme R, Weidmann M, et al. Induction of MxA Gene Expression by Influenza A Virus Requires Type I or Type III Interferon Signaling. *J Virol.* 2007; 81(14):7776–85.
- Horisberger MA. Interferon-induced human protein MxA is a GTPase which binds transiently to cellular proteins. *J Virol.* 1992; 66(8):4705–9.
- Horisberger MA, Staeheli P, HALLER O. Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983; 80(7):1910–4.
- Janzen C, KOCHS G, HALLER O. A monomeric GTPase-negative MxA mutant with antiviral activity. *J Virol.* 2000; 74(17):8202–6.
- Karpf AR, Peterson PW, Rawlins JT, Dalley BK, Yang Q, Albertsen H, et al. Inhibition of DNA methyltransferase stimulates the expression of signal transducer and activator of transcription 1, 2, and 3 genes in colon tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(24):14007–12.
- Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M. Modification of Proteins by Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006; 22(1):159–80.
- Kochs G, Reichelt M, Danino D, Hinshaw J, Haller O. Assay and Functional Analysis of Dynamin-Like Mx Proteins. *Methods Enzymol.* 2005; 404:632–43.
- Krieghoff-Henning E, Hofmann TG. Role of nuclear bodies in apoptosis signalling. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Res.* 2008; 1783(11):2185–94.
- Kulaeva OI, Draghici S, Tang L, Kraniak JM, Land SJ, Tainsky MA. Epigenetic silencing of multiple interferon pathway genes after cellular immortalization. *Oncogene.* 2003; 22(26):4118–27.
- Leaman DW, Chawla-Sarkar M, Jacobs B, Vyas K, Sun Y, Ozdemir A, et al. Novel growth and death related interferon-stimulated genes (ISGs) in melanoma: greater potency of IFN-beta compared with IFN-alpha2. *J. Interferon Cytokine Res.* 2003; 23(12):745–56.
- Li M, Liu X, Zhou Y, Su SB. Interferon- $\gamma$ : the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses. *J Leukoc Biol.* 2009; 86(1):23–32.
- Li Y, Yousoufian H. MxA overexpression reveals a common genetic link in four Fanconi anemia complementation groups. *J Clin Invest.* 1997; 100(11):2873–80.
- Liang G, Gonzales FA, Jones PA, Orntoft TF, Thykjaer T. Analysis of gene induction in human fibroblasts and bladder cancer cells exposed to the methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* 2002; 62(4):961–6.
- Lin D-Y, Huang Y-S, Jeng J-C, Kuo H-Y, Chang C-C, Chao T-T, et al. Role of SUMO-Interacting Motif in Daxx SUMO Modification, Subnuclear Localization, and Repression of Sumoylated Transcription Factors. *Mol Cell.* 2006; 24(3):341–54.
- Lindenmann J. Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus. *Virology.* 1962; 16:203–4.
- Lussier MP. MxA, a Member of the Dynamin Superfamily, Interacts with the Ankyrin-like Repeat Domain of TRPC. *J Biol Chem.* 2005; 280(19):19393–400.
- Meulmeester E, Melchior F. Cell biology: SUMO. *Nature.* 2008; 452(7188):709–11.
- Mibayashi M, Nakad K, Nagata K. Promoted cell death of cells expressing human MxA by influenza virus infection. *Microbiol Immunol.* 2002; 46(1):29–36.
- Mishra RK. Dynamin Interacts with Members of the Sumoylation Machinery. *J Biol Chem.* 2004; 279(30):31445–54.
- Mushinski JF, Nguyen P, Stevens LM, Khanna C, Lee S, Chung EJ, et al. Inhibition of tumor cell motility by the interferon-inducible GTPase MxA. *J Biol Chem.* 2009; 284(22):15206–14.
- Noser JA, Mael AA, Sakuma R, Ohmine S, Marcato P, WK Lee P, et al. The RAS/Raf1/MEK/ERK Signaling Pathway Facilitates VSV-mediated Oncolysis: Implication for the Defective Interferon Response in Cancer Cells. *Mol Ther.* 2007; 15(8):1531–6.
- Ruiz-Ruiz C, Muñoz-Pinedo C, López-Rivas A. Interferon-gamma treatment elevates caspase-8 expression and sensitizes human breast tumor cells to a death receptor-induced mitochondria-operated apoptotic program. *Cancer Res.* 2000; 60(20):5673–80.
- Sadler AJ, Williams BRG. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(7):559–68.
- Schulz WA, Alexa A, Jung V, Hader C, Hoffmann MJ, Yamanaka M, et al. Factor interaction analysis for chromosome 8 and DNA methylation alterations highlights innate immune response suppression and cytoskeletal changes in prostate cancer. *Mol Cancer.* 2007; 6:14.
- Staeheli P, Grob R, Meier E, Sutcliffe JG, HALLER O. Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a

large deletion or a nonsense mutation. *Mol Cell Biol.* 1988; 8(10):4518–23.

Trost M, Kochs G, Haller O. Characterization of a novel serine/threonine kinase associated with nuclear bodies. *J Biol Chem.* 2000; 275(10):7373–7.

Uzé G, Monneron D. IL-28 and IL-29: Newcomers to the interferon family. *Biochimie.* 2007; 89(6-7):729–34.

de Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM, et al. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol.* 2001; 69(6):912–20.

Yuan W, Krug RM. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *EMBO J.* 2001; 20(3):362–71.

Zhao C, Denison C, Huibregtse JM, Gygi S, Krug RM. Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(29):10200–5.

Zhao C, Beaudenon SL, Kelley ML, Waddell MB, Yuan W, Schulman BA, et al. The UbcH8 ubiquitin E2 enzyme is also the E2 enzyme for ISG15, an IFN-alpha/beta-induced ubiquitin-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(20):7578–82.

