



**Kátia Silene de Brito**

**RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA E FUNÇÃO DO  
INTERFERON HUMANO BETA : PAPEL DA  $\alpha$ -HÉLICE E**

DISSERTAÇÃO DE Mestrado APRESENTADA AO  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DO INSTITUTO  
DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UFMG, COMO REQUISITO  
PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM  
MICROBIOLOGIA.

**Orientador : Paulo César Peregrino Ferreira.  
Co-orientadora: Erna Geessien Kroon**

**Belo Horizonte  
2000**

**ESTE TRABALHO FOI REALIZADO NO  
LABORATÓRIO DE VÍRUS DO  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA  
DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS DA UFMG, COM O APOIO  
DA CAPES, CNPQ E FAPEMIG.**

***É melhor tentar e falhar,  
Que preocupar-se e ver a vida passar.  
É melhor tentar, ainda em vão  
Que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
Que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
Que em conformidade viver.***

**Martin Lutther King**

***Dedico este trabalho à minha mãe, por  
todo amor, esforço e dedicação.***

***“Alicerce de tudo que construí”***

## **AGRADECIMENTOS**

### **O meu sincero muito obrigada:**

À Deus, pela oportunidade de cumprir mais uma tarefa em minha vida.

Ao professor Dr. Paulo César Peregrino Ferreira pela orientação, amizade, apoio e incentivo que foram essenciais no meu aprendizado e na minha vida acadêmica.

À professora Dr<sup>a</sup>. Erna Geessien Kroon, pela inestimável colaboração e auxílios prestados.

Ao professor Dr. Cláudio Antônio Bonjardim, pelo estímulo e apoio.

À professora Dr<sup>a</sup>. Edel Figueiredo, pela disponibilidade, apoio e ensinamentos.

Ao professor Dr. Luís Fernando Lima Reis, pela colaboração em parte deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de vírus pelo convívio e colaboração na realização deste trabalho: Angela, Cida, Ilda, Alzira, Anderson, Giliane, João Marques, Maria Amélia, Marina, Maurício, Daniela,. Monique, Olga, Leonéide, Andréia, Lina, Cíntia, Fabrício, Luiz Felipe, Luiz Gonzaga, Valéria, Rodrigo, Jaqueline, Flávio e Renatinha.

Ao “John-John”, pela ajuda, ensinamentos e enorme paciência.

À Bernadete, pelo carinho, pelos primeiros ensinamentos obtidos neste laboratório, pelas células tão bem cuidadas.

Ã Paty, Landa e Cris, pela inestimável amizade, apoio, paciência e porque estiveram presentes numa simples sugestão ou numa palavra de incentivo.

Ao Zezinho, meu amiguinho e “cunhadinho”, pelo apoio e presença constante em todos os momentos desta jornada.

Ã toda minha família, pelo apoio, amor e valiosa existência em minha vida.

Ao meu pai, pelo seu amor.

À minha irmã Cintia e ao meu irmão Adriano, pelo amor e convivência.

À Waleska, pela ajuda mesmo que de longe e pelas palavras amigas e incentivadoras.

Ao Alex, pela colaboração, presteza e ensinamentos.

Às minhas amigas Gabi, Rosana, Poli, Etel e Reislá, pelos gestos carinhosos e por acreditarem em mim e torcerem pelo meu sucesso.

Às amigas Janaína e Claudimeire, pelas palavras animadoras e conselheiras.

À Maria Emília e Betânia, pela calorosa convivência.

À Anna Christina de Matos Salim, do Institute Ludwig for Câncer Research, pelo auxílio no seqüenciamento das construções.

***Ao Marcelo, pelo carinho, paciência, dedicação e por tantas alegrias, as quais eternamente gratas à sua presença como meu namorado.***

## ÍNDICE

	Página
<b>1 - INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	4
2.1 – Os interferons	5
2.1.1 - Generalidades	5
2.1.2 - Classificação	5
2.1.3 – Genes dos interferons	6
2.1.4 - Aminoácidos	6
2.1.5 - Receptores celulares	10
2.1.6 – A estrutura tridimensional	11
2.1.7 - Relação entre estrutura e função	15
<b>3 – OBJETIVOS</b>	19
3.1 – Objetivo geral	20
3.2 - objetivos específicos	20
<b>4 - MATERIAL E MÉTODOS</b>	21
4.1 - Células	22
4.1.1 - Vero	22
4.1.2 - MDBK	22
4.1.3 - Murinas L929	22
4.2 - Os vírus	23
4.2.1 - Vírus da Encefalomiocardite de Camundongo (EMC)	23
4.2.2 - Vírus da Estomatite Vesicular (VSV)	23
4.3 - Medida da atividade biológica	23
4.3.1 - Atividade antiviral	23
4.3.1.1 - Titulação dos Interferons	23
4.3.1.2 - Neutralização da atividade antiviral	24
4.3.1.3 - Interferons e anticorpos padrões utilizados	24
4.3.1.4 – Padrões de tamanho e massa molecular utilizados	25
4.4 – A construção dos híbridos	25
4.4.1 - Construção dos iniciadores	25
4.4.2 – Amplificação por PCR	27
4.4.3 - Fracionamento eletroforético do produto de PCR	27
4.4.4 – Digestão enzimática	28
4.4.5 - Ligação dos produtos de PCR ao vetor de expressão	28
4.4.5.1 – O plasmídeo pDS <sub>56</sub> 6xHIS	28
4.4.5.2 – Reação de ligação	29
4.4.6 – Inserção dos HuIFN mutagenizados em <i>E. coli</i>	29
4.5 - Identificação dos clones	30
4.6 - Extração do DNA plasmidial	31
4.6.1 - Preparação em pequena escala	31
4.6.2 - Preparação em larga escala	31
4.7 - Sequenciamento	31

4.8 - Produção e purificação dos interferons mutagenizados recombinantes	32
4.8.1 - Purificação das proteínas recombinantes	33
4.8.2 - Fracionamento das proteínas - PAGE	33
4.8.3 – Dosagem das proteínas	34
4.9 - Soluções	34
<b>5 - RESULTADOS</b>	<b>35</b>
5.1 – Amplificação dos fragmentos dos interferons	36
5.2 – clonagem dos interferons recombinantes e híbrido	38
5.3 – Sequenciamento	41
5.4 – Produção dos interferons	43
5.5 – Purificação dos interferons	45
5.6 – Atividade antiviral dos interferons	49
5.7 – Neutralização da atividade antiviral dos interferons recombinantes e híbrido	52
<b>6 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES</b>	<b>54</b>
6.1 – Produção dos interferons	55
6.2 – Purificação das proteínas recombinantes	56
6.3 – Atividades biológicas	57
6.3.1 – Atividade específica dos HuIFN recombinantes e controles	57
6.3.2 – Atividade específica do híbrido (rHuIFN- $\beta$ K $\alpha$ )	58
6.4 – Neutralização da atividade antiviral	60
<b>7 – RESUMO</b>	<b>62</b>
<b>8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>65</b>

## LISTA DE FIGURAS E TABELA

	Página
FIGURA 1 - Pareamento dos aminoácidos inferidos da seqüência de nucleotídeos da $\alpha$ -hélice E dos interferons beta murino (Mu $\beta$ ), humano (Hu $\beta$ ) e o interferon humano alfa 2 (Hu $\alpha$ ).	9
FIGURA 2 – Modelo estrutural do rHuIFN- $\alpha_{2a}$	13
FIGURA 3 - Fracionamento em gel de agarose 1% dos produtos de PCR dos rHuIFN- $\alpha_{2b}$ e rHuIFN- $\beta$	37
FIGURA 4 - Fracionamento em gel de agarose dos produtos de PCR das colônias transformadas com a construção do rHuIFN- $\alpha_K$	39
FIGURA 5 - Fracionamento em gel de agarose 1% dos produtos de PCR das colônias transformadas com a construção do rHuIFN- $\beta_K$	39
FIGURA 6 - Fracionamento em gel de agarose dos produtos de PCR das colônias transformadas com a construção do rHuIFN- $\beta_K\alpha$	40
FIGURA 7 - Pareamento dos aminoácidos inferidos da seqüência de nucleotídeos da $\alpha$ -hélice E dos interferons beta murino (Mu $\beta$ ), humano (Hu $\beta$ ) e o interferon humano alfa (Hu $\alpha$ ).	42
FIGURA 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% corado com coomassie blue, dos rHuIFN- $\beta_K$ , rHuIFN- $\beta_K\alpha$ e rHuIFN- $\alpha_K$ produzidos em E.coli M15	44
FIGURA 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%, corado com coomassie blue, das frações eluídas da purificação do rHuIFN- $\alpha_K$ em coluna de quelato de níquel	46
FIGURA 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%, corado com coomassie blue, das frações obtidas da purificação do rHuIFN- $\beta_K\alpha$ em coluna de quelato de níquel	47
FIGURA 11 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%, corado com coomassie blue, das frações obtidas da purificação do rHuIFN- $\beta_K$ em coluna de quelato de níquel	48
FIGURA 12 – Atividade específica dos interferons recombinantes e híbrido	51
FIGURA 13 – Neutralização da atividade antiviral dos interferons recombinantes e do híbrido	53
TABELA 1 - Atividade específica (AE) e título dos interferons (U/ml) em várias células	50

## **ABREVIATURAS**

aa - aminoácidos  
AE – Atividade específica  
BSA - Albumina bovina sérica  
cDNA - DNA complementar ao mRNA  
CHO - Células de ovário de hamster chinês  
CML - Leucemia mielogênica crônica  
CON A - Concanavalina A  
DNA - Ácido desoxiribonucleico  
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) - Deoxinucleotídeos  
D.O - Densidade óptica  
ECP - Efeito citopático  
g - força gravitacional  
G-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos  
GH – Hormônio do crescimento  
IFN - Interferon  
IFNAR-1 e IFNAR-2 - Receptores moleculares para IFN tipo I  
IFN $\gamma$ R-1 e IFN $\gamma$ R-2 – receptores celulares do interferon tipo II  
IL - Interleucinas  
IPTG - Isopropil  $\beta$ -D-Tiogalactopiranosídeo  
Kb - Quilobases  
Kda - Quilodaltons  
MAbs - Anticorpos monoclonais  
MEM - Meio essencial mínimo  
mg - miligramas  
MHC - Complexo de histocompatibilidade  
ml - Mililitro  
mM - Milimolar  
MuIFN- $\beta$  - Interferon beta murino  
 $\mu$ l - Microlitro  
NK - células “natural killer”  
 $\eta$ g - nanograma  
NI-NTA - Ácido nitrilo triacético  
pb - pares de base do DNA  
P/V - Peso por volume  
PAGE - Eletroforese em gel de poliácridamida  
PAGE/SDS - Eletroforese em gel de poliácridamida contendo SDS  
PBS - Solução salina tamponada contendo fosfato  
PCR - Reação em cadeia da polimerase  
PHA - Fitohemaglutinina  
pM - Picomoles  
rHuIFN- $\alpha$ K - Interferon alfa com sítio de Kpn I  
rHuIFN- $\beta$ K - Interferon beta com sítio de Kpn I  
rHuIFN- $\beta$ K $\alpha$  - Interferon beta com sítio de Kpn I e  $\alpha$ -hélice E do rHuIFN- $\alpha$   
RNA - Ácido ribonucleico  
rpm - Rotações por minuto  
SBF - Soro fetal bovino  
SDS - Dodecil sulfato de sódio  
TCID<sub>50</sub> - Dose infectiva para 50% das culturas de células  
U - Unidades  
UI - Unidades internacionais  
v/v - Volume por volume

## **1. INTRODUÇÃO**

Os interferons (IFN) são proteínas envolvidas em processos de defesa do organismo derivadas da resposta celular a microorganismos, tumores e antígenos. Os interferons são classificados em tipo I, compreendendo os IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\tau$ , IFN- $\omega$ , enquanto que o IFN- $\gamma$  é o único membro dos IFN do tipo II. Tendo como base a sua estrutura os IFN são membros da família de citocinas, que se caracterizam por apresentar na sua molécula estruturas em  $\alpha$ -hélice, conhecidas também como família hematopoiética de fatores de crescimento. Estas proteínas uma vez produzidas interagem com receptores específicos das células, ativando sinais citoplasmáticos que, por sua vez, são dirigidos ao núcleo para estimularem genes que codificam proteínas responsáveis pelos mecanismos de defesa celular. Os receptores da superfície celular descritos são de dois tipos: um receptor que interage com os IFN tipo I e um segundo que reage com IFN- $\gamma$ .

Esforços extensivos, particularmente com IFN humanos e murinos, têm sido dirigidos na elucidação da relação entre estrutura e função nas espécies de HuIFN- $\alpha$  e do HuIFN- $\beta$ , através de mutagênese sítio dirigida. Apesar do avanço alcançado na elucidação ou compreensão dessas interações, entre os interferons tipo I com seu ou seus receptores, estes mecanismos não foram ainda satisfatoriamente esclarecidos. Entretanto, a descrição da estrutura tridimensional da molécula do interferon murino recombinante abriu novas perspectivas e aponta para a associação das metodologias de mutações sítio-dirigidas e recombinantes híbridos, já empregadas isoladamente na compreensão das interações dos IFN com seus receptores. O conhecimento da estrutura tridimensional permite manter a estrutura da molécula, no processo de construção de híbridos ou moléculas com modificações de domínios conservados, pela metodologia da engenharia genética. A importância da não alteração da estrutura tridimensional original da molécula é reforçada pelos testes de estabilidade, que mostram a dependência da estrutura conformacional da molécula à atividade antiviral.

Estudos com HuIFN- $\alpha$  mostram significativas mudanças na sua atividade quando seus aminoácidos são modificados, como por exemplo, nas posições dos aminoácidos 121, 122 e 123. O aminoácido da posição 123 parece ser importante na manutenção da interação da hélice **D** com o restante da molécula. A sua deleção causa uma diminuição substancial na atividade e ligação ao receptor dos HuIFN- $\alpha_1$ , em células bovinas. Se a conformação da  $\alpha$ -hélice for mantida, a deleção deste aminoácido muda efetivamente a característica dos aminoácidos 125, 128 e 132.

A existência das 5  $\alpha$ -hélices observadas tanto nos IFN- $\alpha$  quanto nos IFN- $\beta$  e a estrutura conformacional similar dessas moléculas, permite um estudo mais detalhado na relação entre uma determinada  $\alpha$ -hélice e o seu papel na atividade biológica na célula hospedeira. Para isso, a utilização de técnicas como mutagênese sítio-dirigida, permite introduzir sítios de restrição entre estas estruturas, de modo a substituir não apenas 3 ou 4 aminoácidos, mas especificamente a substituição e troca de cada hélice ou suas alças, cuja participação tem sido sugerida em funções biológicas da molécula entre os interferons tipo I. Neste sentido o objetivo deste trabalho foi estudar a relação da  $\alpha$ -hélice **E** na atividade biológica do HuIFN- $\beta$ , usando como estratégia a inserção de sítios de restrição que permitem a substituição e troca desta estrutura pela correspondente do HuIFN- $\alpha$ . Assim a estrutura básica conformacional do HuIFN- $\beta$  seria mantida permitindo o estudo do papel da  $\alpha$ -hélice **E** na sua atividade biológica, bem como das suas interações com o receptor ou receptores celulares.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## **2.1 - OS INTERFERONS**

### **2.1.1 - GENERALIDADES**

Os interferons (IFN) foram primeiramente descritos por ISAACS E LINDENMAN (1957) quando estes observaram que o sobrenadante de células infectadas com vírus era capaz de induzir a resistência à infecção viral de outras células. À esse fator solúvel liberado no meio, foi dado o nome de Interferon, que pertence à família de citocinas, que modulam a expressão de genes celulares. Os genes induzidos são responsáveis pela grande diversidade de atividades biológicas, entre as quais o estabelecimento do estado antiviral, a inibição da multiplicação celular, o estímulo da atividade citotóxica de linfócitos, células NK e macrófagos, dos antígenos de MHC classe I e modulação do sistema imune. Aos IFN foi atribuída durante muitos anos apenas a função antiviral por ter sido esta, quando da sua descoberta, a primeira atividade biológica demonstrada, o que os distingue das demais citocinas descritas.

### **2.1.2 - CLASSIFICAÇÃO**

Os IFN são divididos em tipo I ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$  e  $\tau$ ) e tipo II ( $\gamma$ ) e compreendem proteínas de três classes antigênicas distintas classificadas em IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$  e são produzidos por células de vertebrados em resposta à uma grande variedade de estímulos. Os IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  são produzidos por leucócitos e fibroblastos respectivamente, em resposta à infecção viral, RNA de fita dupla, endotoxinas e exotoxinas bacterianas, micoplasma, rickettsia e a indutores sintéticos como polinucleotídeos. O IFN- $\gamma$  é produzido por linfócitos T e células NK após sua ativação por antígenos ou agentes mitogênicos como a fitohemaglutinina e a concanavalina-A (JOKLIK, 1990). O HuIFN- $\omega$  é produzido por leucócitos após estímulo viral e representa 15% da população dos HuIFN leucocitários (ADOLF, 1987), sendo encontrado em humanos, bovinos, eqüinos e ovinos (ADOLF *et al.*, 1991).

### 2.1.3 – GENES DOS INTERFERONS

Os genes dos interferons tipo I não possuem introns, sendo que os IFN- $\alpha$  são codificados por uma família de genes estreitamente relacionados antigênica e estruturalmente em todas as espécies de mamíferos estudadas. A família dos IFN humanos é constituída por 15 genes não alélicos e 9 pseudogenes localizados no braço curto do cromossomo 9 humano (WEISSMAN & WEBER, 1986). Apesar de todos os IFN apresentarem uma seqüência de nucleotídeos de 80 a 100% os seus genes podem ser codificados em dois distintos *loci*, como ocorre com os IFN- $\alpha_1$  e IFN- $\alpha_{13}$  (DRON & TOVEY, 1992). Os genes dos HuIFN- $\alpha$  codificam para proteínas de 165 a 172 aminoácidos.

O HuIFN- $\beta$  é codificado por um único gene, também localizado no cromossomo 9 humano, não possui introns e codifica uma proteína de 166 aminoácidos (VILCEK E SEN, 1996) e foi clonado por TANIGUCHI *et al.*, (1980a). Os IFN- $\beta$  da maioria das outras espécies de mamíferos provavelmente possui apenas um gene, enquanto que o de bovinos é codificado por múltiplos genes (PESTKA *et al.*, 1987; RYAN *et al.*, 1992).

Não há homologia estrutural significativa entre os IFN do tipo I e do tipo II e, além disso, diferentemente dos genes dos IFN tipo I que se localizam no cromossomo 9, o gene do IFN- $\gamma$  contém 3 introns e localiza-se no cromossomo 12.

### 2.1.4 – OS AMINOÁCIDOS

Os membros da família IFN- $\alpha$  possuem uma seqüência de 165 a 172 aminoácidos, dos quais 4 cisteínas (C) são altamente conservadas nas posições 1; 29; 98, 99 ou 100; 138 ou 139; e responsáveis pela ligação intramolecular (ligações S-S) da molécula (RADHAKRISHAN *et al.*, 1996). Estas ligações são importantes na estabilização da estrutura da molécula do IFN- $\alpha$  (WETZEL *et al.*, 1981) e imprescindíveis para a atividade biológica (SENDA *et al.*, 1992).

O fracionamento em SDS-PAGE evidenciou em torno de 25 proteínas relacionadas aos IFN- $\alpha$  obtidos pela indução com o vírus da leucemia mielogênica crônica humana (CML) de leucócitos do sangue periférico. Estas proteínas mostraram uma mobilidade relativa referente ao peso molecular entre de 16 a 27 kDa, sugerindo diferenças na glicosilação ou influências estruturais na migração dos componentes SDS-PAGE (ZOON *et al.*, 1992).

Outro HuIFN estruturalmente relacionado aos HuIFN- $\alpha$  é o HuIFN- $\omega$  (ADOLF, 1987) com uma similaridade de 60% em nível de aminoácidos. IFN semelhantes aos IFN- $\omega$  também foram observados em células de trofoblasto durante a pré-implantação dos embriões de ovinos e bovinos, tendo sido denominado IFN de trofoblasto ovino (Tro-OIFN) (IMAKAWA *et al.*, 1987) e IFN de trofoblasto bovino (Tro-BOIFN) (ROBERTS *et al.*, 1990). Este IFN também foi encontrado em trofoblasto humano induzido com vírus (TÓTH *et al.*, 1990) ou RNA de fita dupla. O IFN de trofoblasto é secretado durante as fases iniciais da gravidez, tendo a função de promover o reconhecimento materno-fetal (CROSS e ROBERTS, 1991). O IFN de trofoblasto humano é constituído de uma população heterogênea de IFN da qual 75% corresponde ao HuIFN- $\beta$  e o restante corresponde aos HuIFN- $\alpha$  e HuIFN- $\omega$  (ABOAGYE-MATHIESEN *et al.*, 1990).

O HuIFN- $\beta$  é uma glicoproteína com peso molecular entre 22-23 kDa, com uma sequência de 166 aminoácidos. O HuIFN- $\beta$  natural possui várias cadeias de açúcares ligadas à asparagina 80, sendo que 82% destas são um complexo de cadeias de açúcares nas quais estão ligadas vários resíduos de N-lactosamina. Um padrão semelhante foi observado no rHuIFN- $\beta$ , expresso em células CHO, enquanto resíduos de galactosamina foram encontrados quando expresso em células PC8 e C127. A galactosamina não é encontrada no HuIFN- $\beta$  natural, o que indica que diferentes padrões de glicosilação ocorrem dependendo das células nas quais o IFN é produzido (KAGAWA *et al.*, 1988).

A análise da estrutura tridimensional do HuIFN- $\beta$  obtida por difração de raios X (KARPUSAS *et al.*, 1997) mostra que diversos aminoácidos hidrofóbicos, tais como as fenilalaninas 70 e 154 e os triptofanos 79 e 143, estão envolvidos em interações hidrofóbicas e estabilizam o cerne da molécula. Assim também alguns aminoácidos polares presentes no cerne tais como as glicinas 10 e 94, serina 118 e treonina 58 estabilizam as  $\alpha$ -hélices através de ligações por pontes de hidrogênio.

O interferon recombinante rHuIFN- $\beta$ , ou seja, produzido em *E. coli* e portanto não glicosilado, apresentou uma maior hidrofobicidade que o HuIFN- $\beta$  natural baseado no maior tempo de sua retenção em cromatografia de fase reversa. Esta maior hidrofobicidade do rHuIFN- $\beta$  pode ser devida à perda de carboidratos hidrofílicos do HuIFN- $\beta$  (UTSUMI *et al.*, 1987). Segundo KARPUSAS *et al.*, (1997), baseado na estrutura tridimensional do HuIFN- $\beta$ , a presença de cadeias de carboidratos pode interagir de forma a esconder aminoácidos hidrofóbicos (presentes nas vizinhanças do sítio de glicosilação) do contato com o solvente. Esta observação foi feita baseada no fato de que o rHuIFN- $\beta$  não glicosilado é muito mais insolúvel e susceptível à agregação. A atividade antiviral específica (AE) do rHuIFN- $\beta$  ( $1$  a  $2 \times 10^8$  IU/mg) foi menor que a AE do HuIFN- $\beta$  ( $3$  a  $4 \times 10^8$  IU/mg) (UTSUMI *et al.*, 1987). A maior AE do HuIFN- $\beta$  pode ter sido devida à influência da cadeia de carboidratos que de alguma maneira influenciou no aumento da estabilidade da proteína e na afinidade pelo receptor (UTSUMI e SHIMIZU, 1992).

Os estudos comparativos entre o HuIFN- $\beta$  e o HuIFN- $\alpha_1$  demonstraram que estas duas proteínas são estruturalmente relacionadas, sendo que dos 166 aminoácidos, 48 (29%) estão localizados nas mesmas posições. Além disso, existem duas regiões onde a similaridade é maior: a primeira entre os aminoácidos 28 e 80 (41% de similaridade) e a segunda entre as posições 115 e 151 (54% de similaridade). O triptofano, fenilalanina, arginina, cisteína e tirosina são os aminoácidos mais conservados entre moléculas estruturalmente relacionadas (TANIGUCHI *et al.*, 1980).

O alinhamento das sequências dos aminoácidos dos interferons MuIFN- $\beta$ , HuIFN- $\beta$  e HuIFN- $\alpha_2$  nos permite obter informações a respeito da similaridade destas proteínas e conseqüentemente, explorar estes dados para construção de novas moléculas e estudar a função das suas  $\alpha$ -hélices. Os estudos com mutagênese sitio dirigida permitem relacionar funções dos aminoácidos presentes nas moléculas com a estrutura da proteína e as suas interações com o receptor ou receptores celulares. Na figura 1 podemos observar o pareamento das sequências de aminoácidos desses três IFN.

Muβ	INYKQLQLOE	RTNIRKCQEL	LEQLNGKI--	NLTYRADFKI	PMEMTEKMQ-
Huβ	MSYNLLGFLO	RSSNFQCQKL	LWQLNGRLEY	CLKDRMNFDI	PEEIKQLQQF
Huα	CDLPQTHS	LGSRRTLMLL	AQQLKISLFS	CLKDRHDFGF	PQEEFGLQQF
Muβ	-KSYTAFAIQ	EMLQNVFLVR	N NFSSTGWNE	TIVVR	LLDEL HQQLTVFLKT
Huβ	QKEDAALTIY	EMLQNIFAIE	RQDSSSTGWN	ETIVENLLAN	VYHQINHLKT
Huα	QKAETIPVLH	EMIQQIFNLF	STKDSSAAWD	ETLLDKFYTE	LYQQLNLEA
Muβ	VLEEKQE-ER	LTWEMSSTAL	HLKSYWVRVQ	RYLKLMKYNS	YAWMVVRAEI
Huβ	VLEEKLEKED	FTRGKLMSLL	HLKRYYGRIL	(H) RYLKAKEYSH	CAWTIVRVEI
Huα	CVIQGVGVTE	TPLEKEDSIL	AVRKYFQRIT	RY (L) RKEKKYSP	CAWEVVRAEI
Muβ	FRNFLIIRRL	TRNFQN			
Huβ	LRNFYFINRL	TGYLRN			
Huα	MRSFSLSTNL	QESLRSKE			



**FIGURA 1 - Pareamento dos aminoácidos inferidos da seqüência de nucleotídeos da  $\alpha$ -hélice E dos interferons beta murino (Muβ), humano (Huβ) e o interferon humano alfa 2 (Huα). A região das  $\alpha$ -hélices está grifada e o local da inserção do sítio de Kpn I está sublinhado. Entre parênteses foram colocados os aminoácidos substituídos pelo aminoácido Arginina (R) em cada um dos IFN onde a substituição ocorreu.**

## 2.1.5 - RECEPTORES CELULARES

Estudos de competição dos IFN pela ligação às células demonstraram que os IFN tipo I ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\omega$ ) competem pelo mesmo receptor, enquanto que o IFN- $\gamma$  se liga a receptores diferentes (BRANCA, 1981; FLORES, 1991; LI, 1994).

O receptor dos HuIFN tipo I é composto de duas subunidades IFNAR-1, (cadeia  $\alpha$ ), IFNAR-2 (cadeia  $\beta$ ). Os genes que codificam para os componentes deste receptor estão localizados no braço distal do cromossomo 21 e foram clonados por UZÉ *et al*, (1990) e NOVICK *et al*, (1994), respectivamente.

A cadeia  $\beta$  do receptor do HuIFN tipo I é composta de uma forma solúvel, uma forma curta e outra longa ligadas à membrana celular (DOMANSKY & COLAMONICI, 1996; PESTKA, 1997). A forma solúvel do IFNAR-2 foi detectada na urina através de anticorpos monoclonais anti-IFNAR-1 (NOVICK, 1992) e após purificação e purificação parcial foi identificada como uma nova cadeia de receptor de IFN tipo I (NOVICK, 1994). O cDNA deste novo receptor, obtido a partir de uma biblioteca de cDNA de células de linhagem monocítica (NOVICK *et al*, 1994), mostrou dois mRNAs de 1,5 e 4,5 kb. Outros autores (DOMANSKY *et al*, 1995; LUTFALLA *et al*, 1995) também clonaram dois cDNAs correspondentes às formas longa e curta do IFNAR-2 e mostraram que todas as três formas do receptor (solúvel, curta e longa) resultam de um processamento alternativo do mesmo gene.

A diferença nas formas do receptor é que a curta do IFNAR-2 possui 331 aminoácidos e a longa 515 aminoácidos, apresentando ambas as formas um domínio extracelular e transmembrana iguais, porém o domínio intracelular é diferente. Por outro lado, a forma longa contém os motivos comuns à todos receptores membros da superfamília das citocinas que compreende resíduos de cisteínas conservados e numerosos domínios acídicos no citoplasma DOMANSKY, (1996). A forma curta do IFNAR-2 não é funcional e a maioria das células expressa esta forma do receptor na proporção de uma para 20 cadeias da longa (DOMANSKY *et al*, 1995), cuja função pode ser de regulação da resposta celular ao IFN (DOMANSKY & COLAMONICI, 1996).

Ambas as cadeias do receptor de IFN tipo I (IFNAR-1 e IFNAR-2) e tipo II foram classificadas como receptores de citocina classe II (BAZAN, 1990), baseando-se no alinhamento das sequências e elementos estruturais conservados (UZÉ *et al*., 1995).

Tanto IFNAR-1 quanto IFNAR-2 contribuem de diferentes formas, após a interação com o IFN, para as suas diferentes atividades.

O uso de células murinas transfectadas somente com a cadeia IFNAR-2 mostrou que os HuIFN ligaram-se com moderada afinidade (COHEN *et al.*, 1995; CUTRONE *et al.*, 1997). Porém, quando estas células eram co-transfectadas com IFNAR-2 a afinidade de ligação do complexo IFNAR-1/IFNAR-2, aumentou em aproximadamente 10x (LIM *et al.*, 1994). Funcionalmente, tem sido sugerido que IFNAR-1 seja um mediador das diferentes respostas das células aos diferentes IFN tipo I (CLEARY *et al.*, 1994; COOK *et al.*, 1996). Algumas evidências mostram que o mecanismo da transdução de sinal citoplasmática envolve modos alternativos de interação dos receptores com o IFN, que resulta numa via de sinalização alternativa (ABRAMOVITCH *et al.*, 1995; MOGENSEN *et al.*, 1999). Estes dados indicam que a cadeia IFNAR-2 é responsável pela ligação e a cadeia IFNAR-1 é responsável pela formação de um receptor com alta afinidade (DOMANSKY, 1995; LUTFALLA, 1995; PESTKA, 1997), através das quais todos os IFN apresentaram alta afinidade pelo receptor.

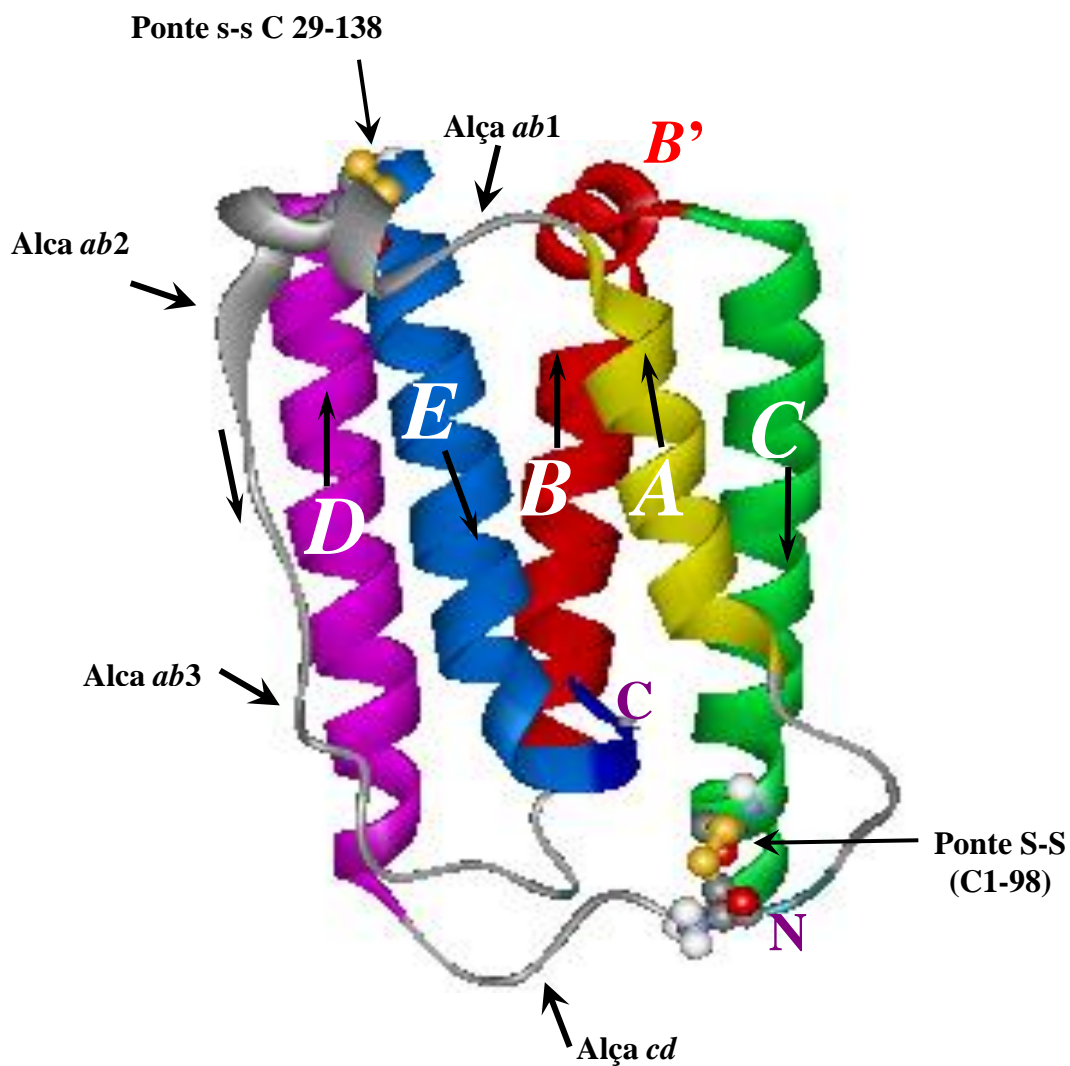
O receptor do HuIFN- $\gamma$  possui duas subunidades denominadas IFN $\gamma$ R-1 (localizada no cromossomo 21) e IFN $\gamma$ R-2 (localizada no cromossomo 6). O IFN $\gamma$ R-1 humano foi clonado por AGUET *et al.*, (1980) e diferentemente dos receptores de IFN tipo I, esta cadeia é suficiente para a ligação do IFN ao receptor com uma alta afinidade. Na região intracitoplasmática, a subunidade IFN $\gamma$ R-1 possui uma seqüência de cinco aminoácidos (Y<sup>457</sup>DKPH<sup>461</sup>) que são necessários para a transdução de sinal (COOK, 1992) sendo que esta seqüência é conservada no receptor dos murinos.

A segunda sub-unidade do receptor do HuIFN- $\gamma$  (IFN $\gamma$ R-2) foi clonada por SOH, 1994 e desempenha um papel menos importante na afinidade do IFN- $\gamma$  com o receptor porém, é muito importante na transdução do sinal (KOTENKO *et al.*, 1995).

### 2.1.6 - A ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL

As estruturas tridimensionais dos rHuIFN- $\alpha_{2b}$  (RADHAKRISHNAN *et al.*, 1996) e rHuIFN- $\alpha_{2a}$  (KLAUS *et al.*, 1997) são praticamente iguais e estão representadas no modelo apresentado na FIG. 2. As cinco  $\alpha$ -hélices estão marcadas **A**, **B**, **C**, **D** e **E**. A  $\alpha$ -hélice **B'** se encontra no final da  $\alpha$ -hélice **B** e corresponde à uma mudança na

direção desta hélice. A ligação entre a  $\alpha$ -hélice **A** e **B** é feita por uma longa alça *ab*, que por sua vez é dividida em três segmentos: *ab1*, *ab2* e *ab3*. Uma segunda alça denominada *cd* faz a ligação entre a  $\alpha$ -hélice **C** e a  $\alpha$ -hélice **D**. Os segmentos das alças *ab2* e *ab3* correm em sentido perpendicular à alça *ab1*. No final da alça *ab1* existe uma ponte S-S entre as Cisteínas 29 e 138 e uma segunda observada entre as Cisteínas 1 e 98. O segmento *ab1* possui duas hélices, sendo que nesta alça está localizada a cisteína 31 ligada à 141, através de pontes S-S. As interações por pontes de hidrogênio entre a tirosina 132 (alça *de*) e ácido aspártico 34 e entre a arginina 147 ( $\alpha$ -hélice **E**) e leucina 24 ajudam a estabilizar o segmento *ab1* da alça *ab*. Nas vizinhanças do sítio de glicosilação localizado na asparagina 80 (hélice **C**) existem diversos aminoácidos hidrofóbicos expostos. A presença da cadeia de carboidrato pode agir de forma a esconder estes aminoácidos do contato com o solvente visto que, o rHuIFN- $\beta$  não glicosilado é muito insolúvel e susceptível à agregação.



**FIGURA 2- Modelo estrutural do rHuIFN- $\alpha_{2A}$ .** As cinco  $\alpha$ -hélices **A**, **B**, **C**, **D** e **E** são mostradas, assim como detalhes da alça **ab**. A  $\alpha$ -hélice **B'** se encontra no final da  $\alpha$ -hélice **B**. A ligação entre a  $\alpha$ -hélice **A** e **B** é feita por uma longa alça **ab**, dividida em três segmentos, **ab1**, **ab2** e **ab3**. Uma segunda alça denominada **cd** aparece como ligação entre a  $\alpha$ -hélice **C** e a  $\alpha$ -hélice **D**. As pontes S-S (C29 e C138; C1 e C98) estão indicadas. As regiões **N** e **C** terminal foram apontadas (**N** e **C**). O sentido de direção das  $\alpha$ -hélices está indicado por setas.

O interior da molécula (cerne) é formado por aminoácidos hidrofóbicos, com exceção de alguns aminoácidos polares. Estes aminoácidos incluem as serinas (S11, S72, S150 e S154), treoninas (T14 e T155), glutaminas (Q91 e Q158), tirosina (Y122) arginina (R144) e ácidos glutâmicos (E141 e E146), que ligam as  $\alpha$ -hélices ao cerne da molécula através de pontes de hidrogênio. A  $\alpha$ -hélice **D** e alça *ab* também estão ligadas ao cerne através de interações hidrofóbicas dos aminoácidos leucina (L), isoleucina (I) e valina (V) na hélice **D** e fenilalanina (F) na alça *ab*. A alça *ab* também é interligada à  $\alpha$ -hélice **E** através de uma ligação S-S entre as cisteínas 29 e 138. Uma pequena  $\alpha$ -hélice, denominada **B'** (aminoácidos 69-75) é observada no sentido da  $\alpha$ -hélice **B**, é uma característica particular do rHuIFN- $\alpha_2$ .

O primeiro IFN- $\beta$  cristalizado foi o rMuIFN- $\beta$  (MITSUI, *et al.*, 1993) sendo a estrutura tridimensional da molécula estabelecida por difração de raios-X, evidenciando uma estrutura tridimensional deste IFN muito semelhante àquela determinada para o rHuIFN- $\alpha_{2b}$  (RADHAKRISHNAN, *et al.*, 1996) e HuIFN- $\beta$  (KARPUSAS, *et al.*, 1997) por difração de raios-X, e do rHuIFN- $\alpha_{2a}$  (KLAUS, *et al.*, 1997) determinada por ressonância magnética nuclear. Contudo, a comparação com o HuIFN- $\beta$  (KARPUSAS *et al.*, 1997) mostra algumas diferenças estruturais básicas. A  $\alpha$ -hélice **B'** adicional, devido a uma brusca mudança de 70° no sentido da  $\alpha$ -hélice **B**, observada no rHuIFN- $\alpha_2$ , não está presente nos rMuIFN- $\beta$  e no HuIFN- $\beta$ . No rMuIFN- $\beta$ , o segmento *ab1* da alça *ab* é menor em 3 aminoácidos e o segmento *ab2* não possui a ligação S-S, bem como as hélices presentes no segmento *ab1* e *ab2* da alça *ab*, dos rHuIFN- $\alpha_{2b}$  e HuIFN- $\beta$ .

A estrutura tridimensional dos IFN tipo I é muito similar àquela apresentada pela interleucina 10 (IL10) (WALTER & NAGABHUSHAN, 1995). Estes IFN fazem parte da família das citocinas que apresentam uma estrutura tridimensional em  $\alpha$ -hélice (SPRANG & BAZAN, 1993), sendo subdivida em três subfamílias: citocinas de cadeia curta: as interleucinas 2(IL2), 4(IL-4) e 5(IL5); de cadeia longa: o hormônio do crescimento (GH) e o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF); e por último as citocinas que possuem estrutura semelhante ao IFN (ROZWARSKI *et al.*, 1994). A diferença estrutural entre as subfamílias das citocinas e os IFN é a presença de uma quinta  $\alpha$ -hélice ( $\alpha$ -hélice **D**) nos IFN, que nas outras subfamílias é substituída por uma longa alça (ROZWARSKI *et al.*, 1994).

A estrutura do rHuIFN- $\beta$  (SENDA *et al.*, 1992), serviu para criar os modelos da estrutura tridimensional do HuIFN- $\alpha_{2b}$  (MURGOLO *et al.*, 1993), do HuIFN- $\alpha_6$  (MIERTUS *et al.*, 1997) e do IFN- $\tau$  ovino (SENDA *et al.*, 1995a). Apesar da estrutura geral dos modelos com o rHuIFN- $\beta$  ter sido muito semelhante a baixa homologia da cadeia polipeptídica (menor que 30%), e a significativa deleção nas seqüências das alças, que são de grande importância biológica, levaram a determinação das coordenadas de diversos aminoácidos destes modelos de forma imprecisa (WALTER, 1997).

A utilização de seqüências consenso e da estrutura tridimensional do rHuIFN- $\alpha_{2b}$  (RADHAKRISHNAN *et al.*, 1996), foram utilizados para criar os modelos dos HuIFN- $\alpha_{CON}$  (consenso), HuIFN- $\alpha_1$  e HuIFN- $\alpha_8$  (WALTER, 1997). A identidade da cadeia polipeptídica dos HuIFN- $\alpha$  indica que a estrutura terciária é altamente conservada, contudo eles apresentam diversos níveis de atividade biológica. Por esse motivo, o uso da engenharia genética se constitui numa ferramenta importante para estudos da relação entre estrutura e função. Para o estudo dos domínios dos IFN relacionados a estrutura e função, os aminoácidos consenso foram preservados, sendo alguns dos demais substituídos. A mudança de alguns aminoácidos dos rHuIFN- $\alpha_8$  na  $\alpha$ -hélice **C** e do rHuIFN- $\alpha_1$  nas  $\alpha$ -hélices **A**, **C** e **D** e na alça *ab* podem estar relacionados com a menor atividade biológica destes IFN em comparação com o rHuIFN- $\alpha_{2b}$ . Entretanto, houve uma maior afinidade do rHuIFN- $\alpha_8$  pela cadeia  $\alpha$  do receptor (HuIFNAR-1) em comparação com o rHuIFN- $\alpha_{CON}$  e rHuIFN- $\alpha_{2b}$ , o que não pode ser explicado. O aumento da antigenicidade deste IFN sintético pode estar relacionado com os 15 aminoácidos diferentes presentes nesta molécula, em relação ao rHuIFN- $\alpha_{2b}$ , que apresentam suas cadeias laterais expostas ao solvente. Entretanto, a maioria das trocas dos aminoácidos foi conservativa e não trouxe mudança conformacional (WALTER *et al.* 1997).

### 2.1.7 - RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA E FUNÇÃO

Estudos de estrutura e função utilizando mutações de ponto, moléculas híbridas entre os IFN- $\alpha$  e utilizando células murinas e bovinas transfectadas com diferentes cadeias do receptor, indicam que existem sítios específicos dentro da molécula do IFN responsáveis pela interação com a subunidade  $\alpha$  (IFNAR-1) e com a  $\beta$  (IFNAR-2) do receptor (UZÉ *et al.*, 1995). Diferenças estruturais foram propostas como sendo responsáveis pelas diferentes atividades dos IFN, especialmente IFN- $\alpha_2$  e IFN- $\beta$

(DOMANSKI *et al.*, 1998; LEWERENZ *et al.*, 1998; RUSSEL-HARDE *et al.*, 1999). A comparação do epitopo funcional do IFN- $\alpha_2$  e IFN- $\beta$  no IFNAR-2 sugeriu que a orientação angular de ambos os ligantes a IFNAR-2, pode diferir, apesar da sobreposição do sítio de ligação (PIEHLER e SCHREIBER, 1999). Isto pode levar a diferentes orientações do domínio intracelular do IFNAR-2 e IFNAR-1 em um complexo ternário, o que pode ser crítico no padrão de ativação da resposta celular ao IFN- $\alpha_2$  e IFN- $\beta$ . Este fato está de acordo com os estudos mutacionais do sítio de ligação do IFN- $\beta$  (RUNKEL *et al.*, 1998). Mutação do aminoácido R35 do IFN- $\beta$  resultou em uma diminuição na atividade deste IFN quando comparado com a mutação homóloga do aminoácido R33 no IFN- $\alpha_2$ . Apesar da considerável homologia na seqüência de aminoácidos entre IFN- $\alpha_2$  e IFN- $\beta$  na alça *ab*, o arranjo espacial da maioria dos resíduos é importante para a ligação ser diferente (PIEHLER e SCHREIBER, 1999).

Alguns experimentos com IFN- $\alpha$ , indicam que a  $\alpha$ -hélice **A** e **C** e região amino-terminal da alça *ab* se ligam ao IFNAR-1 (WEBER, *et al.*, 1987). A atividade antiviral do HuIFN- $\alpha_1$  em células humanas é 100 vezes menor que a do HuIFN- $\alpha_2$  e no entanto os dois IFN apresentam a mesma atividade antiviral em células bovinas (WEBER, *et al.*, 1987). Contudo, em células humanas transfectadas com a molécula do receptor IFNAR-1 bovino, a atividade antiviral do HuIFN- $\alpha_1$  aumenta e se equipara à do HuIFN- $\alpha_2$  (MOUCHEL-VIELH, 1992). Esta diferença está relacionada à seqüência dos aminoácidos compreendidos na posição 16-29 da  $\alpha$ -hélice **A** e região amino-terminal da alça *ab* (WEBER *et al.*, 1987). Alguns estudos mostram que aminoácidos presentes nas posições 29 a 36 da alça *ab* são extremamente importantes para as atividades dos IFN, em particular uma ligação dissulfeto entre os aminoácidos 29-139 (SENDA *et al.*, 1995). Por estas razões, acredita-se que a  $\alpha$ -hélice **A** e a região amino-terminal da alça *ab* sejam importantes na interação com a subunidade IFNAR-1 (UZÉ *et al.*, 1994; UZÉ *et al.*, 1995). No entanto, estudos de mapeamento mutacional de sítios na molécula do IFN- $\beta$ , baseado na estrutura tridimensional, levaram a identificação de duas regiões distintas de ligação ao receptor em faces opostas da molécula. Uma região, definida por mutações nas  $\alpha$ -hélices **A** e **E** e na alça *ab*, foram críticas para a ligação à IFNAR-2. Cada um dos 4 mutantes construídos (*A2*, *AB1*, *AB2* e *E*) mostraram uma diminuição substancial (10x), na afinidade de ligação ao receptor e proporcionalmente, redução na atividade funcional. Esta região da molécula parece estar relacionada com o sítio de ligação do IFNAR-2 e IFN- $\beta$ . Mutações nas  $\alpha$ -hélices **B**, **C** e **D** e partes das alças *bc* e *de*, também mostraram efeitos na ligação ao

receptor, atividade antiviral e antiproliferativa. Para os mutantes *B* e *C2*, a ligação ao IFNAR-2 não foi afetada, sugerindo que a redução da afinidade pelo receptor de células Daudi, pode ser atribuída a alterações na interação desta cadeia com a IFNAR-1. Os mutantes nas alças *bc*, *de1* e  $\alpha$ -hélice *D*, também demonstraram atividade reduzida, ao passo que foi mantida a propriedade de ligação ao IFNAR-2, similar ao IFN- $\beta$ . Isto leva a creditar que esta região da molécula compreende o sítio de ligação do IFN- $\beta$  ao IFNAR-1 (RUNKEL *et al.*, 2000).

Estudos de mutagênese no IFN- $\beta$  (RUNKEL *et al.*, 1998), identificaram os aminoácidos R35 na alça *ab*, K123 na  $\alpha$ -hélice *D* e N84, Y92 na  $\alpha$ -hélice *C*, como estando envolvidos em interações funcionais com o receptor. Os resíduos de aminoácidos expostos ao solvente que interagem com IFNAR-2, não são bem conservados entre os IFN- $\beta$  e IFN- $\alpha$  (MOGENSEN *et al.*, 1999). Estudos com anticorpos monoclonais (mAbs) que bloqueiam a atividade do IFN- $\beta$  *in vitro*, mostraram duas regiões de ligação ao receptor em faces opostas da molécula, uma delas compreendida entre os aminoácidos 40-53 da alça *ab* e  $\alpha$ -hélice *B* (REDLICH *et al.*, 1991). Para os IFN- $\alpha$ , resíduos de aminoácidos expostos ao solvente nas porções da alça *ab1*, *de* e  $\alpha$ -hélices *B* e *E*, foram identificados como funcionalmente importantes (MITSUI *et al.*, 1993) e tem sido sugerido como sendo importantes para as interações com o receptor (RADHAKRISHNAN *et al.*, 1996) e a  $\alpha$ -hélice *C* tem sido implicada nas interações entre IFN- $\alpha_1$  e IFN- $\alpha_8$ , com IFNAR-1 (UZÉ *et al.*, 1994). Portanto, estas são evidências que regiões específicas que entram em contato com IFNAR-1 e IFNAR-2 podem ser diferentes para os subtipos de IFN- $\alpha$ , daquelas definidas para o IFN- $\beta$  (RUNKEL *et al.*, 2000). A comparação dos mutantes *A2* e *de1* sugere que uma ativação do receptor de IFN tipo I por diferentes mutantes IFN- $\beta$ , podem levar a estados ativados distintos do receptor, o que difere na eficiência com a qual ele induz uma resposta funcional (RUNKEL *et al.*, 2000).

A observação da estrutura tridimensional dos IFN tipo I nos mostra que as  $\alpha$ -hélice *A* e *C* se apresentam em um domínio da molécula enquanto o outro domínio da molécula é formada pela  $\alpha$ -hélice *D* e alça *ab* e no centro da molécula as  $\alpha$ -hélices *B* e *E*. Extensivos estudos de mutagênese sítio dirigida (revisado por MITSUI *et al.*, 1993) demonstraram que a alça *ab* e a  $\alpha$ -hélice *D* contêm aminoácidos que são importantes no sentido de que substituições de determinadas posições causam grandes perdas de atividade. Além disso, na alça *ab* foi identificado um aminoácido (R33) que possui um papel chave na relação entre ligação e atividade. WEBER *et al.*, (1987), introduziram

uma série de aminoácidos na hélice **D** do HuIFN- $\alpha_2$ , o que aumentou substancialmente a atividade destes em células murinas. A melhor combinação de substituições foi nas posições 121, 125 e 132, sendo observado uma reatividade parcial comparada com aquela observada nos HuIFN- $\alpha_1$ . Estes dados de atividade biológica e de estrutura tridimensional indicam que a alça **ab** e a  $\alpha$ -hélice **D** é um sítio de ligação e que esta interação ocorre com a subunidade IFNAR-2 (UZÉ *et al* ,1994; UZÉ *et al*; 1995; WALTER, 1997).

O HuIFN- $\alpha_8$  é o único IFN que apresenta afinidade pela cadeia  $\alpha$  do receptor (IFNAR-1) dos IFN tipo I. Estudos feitos por UZÉ *et al* (1994) mostraram que a afinidade pelo receptor pode ter sido causada por mudanças eletrostáticas induzidas pelos aminoácidos isoleucina 86 e ácido aspártico 89 ( $\alpha$ -hélice **C**) que provavelmente interagem com o IFNAR-1. O HuIFN- $\alpha_1$  possui atividade antiviral e afinidade pelo receptor de IFN em células humanas em torno de 20x menores que o HuIFN- $\alpha_{2b}$ . As diferenças em 8 aminoácidos localizados na  $\alpha$ -hélice **A** (ácido aspártico 10), alça **ab** (serina 22, fenilalanina 27 e lisina 31),  $\alpha$ -hélice **C** (treonina 68, ácido aspártico 79 e cisteína 85) e  $\alpha$ -hélice **D** (arginina 124) podem ser os responsáveis pela diminuição na afinidade de ligação ao receptor e à menor atividade antiviral em células humanas.

### **3. OBJETIVOS**

### **3.1 – OBJETIVO GERAL**

**Estudar o papel da  $\alpha$ -hélice *E* nas propriedades biológicas dos interferons tentando estabelecer a relação entre estrutura e função, utilizando como estratégia a substituição da respectiva  $\alpha$ -hélice do HuIFN- $\beta$  pela do HuIFN- $\alpha_{2b}$ .**

### **3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1 - Inserir um sítio para enzima de restrição Kpn I na alça *de* dos HuIFN- $\alpha_{2b}$  e HuIFN- $\beta$ ;**
- 2 – Substituir no HuIFN- $\beta$  a  $\alpha$ -hélice *E* pela  $\alpha$ -hélice respectiva do HuIFN- $\alpha_{2b}$ ;**
- 3 - Expressar em *E. coli* os interferons modificados;**
- 4 - Verificar a atividade antiviral e a atividade específica, dos interferons recombinantes e híbridos construídos.**

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

## **4.1 - CÉLULAS**

### **4.1.1 - VERO (YASUMURA & KAWAKITA, 1963)**

As células de linhagem contínua VERO foram derivadas do rim do macaco verde e obtidas da "American Type Culture Collection", Maryland - U.S.A., na passagem nº 126. Essas células foram sub-cultivadas num número desconhecido de vezes no laboratório de vírus, em meio mínimo essencial autoclavável (MEM-Gibco) acrescido de 5% de soro fetal bovino (SFB) para a manutenção, ou 1% para infecção viral, acrescido dos antibióticos fungizona, penicilina e gentamicina (FERREIRA *et al*, 1979). As células foram mantidas em garrafas de 500 ml, em tambor rolante a 37°C e o sub-cultivo feito em intervalos de 7 a 8 dias após o tratamento com tripsina-EDTA (OCA, 1973 ). As garrafas foram inoculadas com  $18 \times 10^6$  células obtendo-se após 7 dias de cultivo uma média de  $80 \times 10^6$  células.

As células VERO foram empregadas em todos os experimentos de infecção viral e titulação das amostras de vírus e interferons.

### **4.1.2 - MDBK**

Células de rim bovino foram obtidas da American Type Culture Collection, Maryland, E.U.A, isoladas por S. H. Madin e N. B. Darby (1958). As células foram cultivadas em MEM com 5% de SFB utilizando-se o mesmo protocolo das células Vero.

### **4.1.3 - MURINAS L 929**

As células murinas L929 foram obtidas do Roche Institute of Molecular Biologie, Nutley, New Jersey, USA, gentilmente cedidas pelo Dr. Sidney Pestka. Foram mantidas no laboratório em garrafas retangulares, em meio mínimo de Eagle (Gibco, USA), modificado, suplementado com glutamina, 10% de soro fetal bovino (Flow Laboratories, USA) e antibióticos. O implante foi de  $1 \times 10^7$  células/ml em garrafas plásticas 25cm<sup>2</sup>/40ml (Nunc, Denmark) e após formarem uma monocamada completa, as células foram tripsinizadas e transferidas para garrafas redondas, de 500 ml (Cisper, Brasil) com volume final de 80 ml e incubadas a 37°C em tambor rolante. Após a formação da monocamada (48 horas), as garrafas redondas foram utilizadas para multiplicação do vírus da encefalomiocardite de camundongo (EMC).

## **4.2 - OS VÍRUS**

### **4.2.1 - VÍRUS DA ENCEFALOMIOCARDITE DE CAMUNDONGO (EMC)**

O vírus EMC foi cedido pelo Dr. Ian Kerr, Londres, Reino Unido. Estoques de vírus foram obtidos em cultivos de fibroblastos de camundongo, em células derivadas de rim de hamster neonato (BHK21) e foram cultivados em células VERO. O vírus EMC utilizado nos experimentos foi titulado em células VERO, pelo método de microtécnica.

### **4.2.2 - VÍRUS DA ESTOMATITE VESICULAR (VSV)**

A amostra do sorotipo Indiana do VSV foi fornecida pelo Dr. Kurt Paucker, Philadelphia, Pennsylvania, USA. A amostra inicial foi multiplicada em fibroblasto de embrião de galinha e posteriormente adaptada em células VERO.

## **4.3 - MEDIDA DA ATIVIDADE BIOLÓGICA**

### **4.3.1 - ATIVIDADE ANTIVIRAL**

#### **4.3.1.1 - TITULAÇÃO DOS INTERFERONS (FERREIRA, 1979)**

**MÉTODO DIRETO.** A titulação foi feita em sistema de microtécnica, em células VERO, MDBK e L929. O IFN foi diluído em MEM contendo 5% de SFB e 200 ul aplicados na primeira câmara da placa de microtécnica. O IFN foi diluído em série, na razão de dois, utilizando-se uma câmara por diluição. O controle de células e vírus foram feitos em quatro câmaras. Após a diluição dos IFN, foram acrescentados 100 a 200 TCID<sub>50</sub> do vírus EMC nas placas com células VERO e L929 e VSV na placa com células MDBK. O efeito citopático (ECP) de 75% a 100% foi obtido em 36 a 48 horas após incubação a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

O título foi expresso pela recíproca da diluição na qual foi observado uma redução em 50% do ECP quando comparado aquelas nas câmaras do controle de vírus.

Em todas as titulações foi utilizado HuIFN- $\beta$  como padrão, sendo os títulos dos experimentos ajustados de acordo com a variação do título deste padrão e as titulações repetidas pelo menos 3x em experimentos independentes.

**MÉTODO INDIRETO.** O método da titulação indireto foi empregado para as células MDBK e L929. Na titulação indireta, o IFN foi diluído na placa de microtécnica como descrito para titulação direta. Após a diluição dos IFN foram acrescentados 100  $\mu$ l de uma suspensão de células ( $60 \times 10^4$ ) em cada câmara. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> durante 18 à 24 h. Após esta incubação, o meio das placas foi retirado e adicionados 100 a 200 TCID<sub>50</sub> do vírus em volume final de 200  $\mu$ l. Nas câmaras reservadas para o controle células foi adicionado apenas o meio. As placas foram então incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 36 a 48 horas, até atingir um ECP de 75% a 100%.

O EMC foi utilizado como vírus desafio nas titulações em células Vero e L929, enquanto que o VSV foi empregado nas titulações em células MDBK.

#### **4.3.2- NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL**

A neutralização da atividade antiviral foi feita conforme modificação descrita por FERREIRA *et al.*, (1979). Os IFN foram diluídos na razão de 2, em placa de microtécnica de 96 câmaras, em volume de 50  $\mu$ l de MEM, contendo 5% SFB. A seguir, foram adicionados 400 U de anticorpo antiHuIFN- $\alpha$  ou antiHuIFN- $\beta$ , em um volume de 50  $\mu$ l. A placa foi incubada a 37°C por 60 min em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub>. Após este tempo de incubação, foi feita uma titulação do IFN residual.

#### **4.3.3- INTERFERONS E ANTICORPOS PADRÕES UTILIZADOS**

Os IFN padrões utilizados foram: HuIFN- $\beta$  (cat nº 10150 - lot. 82007) do National Institutes of Health (NIH); HuIFN- $\alpha_{2b}$  (cat. nº 6.a.23-902527) NIH, USA.

Os anticorpos policlonais antiIFN de leucócitos (antiHuIFN- $\alpha$  -  $1 \times 10^7$  UN/ml) e antiIFN de fibroblastos humanos (antiHuIFN- $\beta$  -  $2,4 \times 10^4$  UN/ml), foram produzidos em carneiros e gentilmente cedidos pela Dra. Barbara Dalton e Dra. Marilyn Paucker (Children Hospital, PA, EUA).

#### 4.3.4 – PADRÕES DE TAMANHO E MASSA MOLECULAR UTILIZADOS

Os fragmentos do genoma (*env* e *gag*) do vírus HIV, amplificados por PCR, foram utilizados como padrões de tamanhos moleculares em eletroforese em gel de agarose (padrão interno do laboratório de vírus).

Os marcadores de massa molecular utilizados em géis de poliacrilamida “SDS MOLECULAR WEIGHT MARKERS” foram obtidos da Sigma Chemical Company.

#### 4.4 – A CONSTRUÇÃO DOS HÍBRIDOS

##### 4.4.1 - CONSTRUÇÃO DOS INICIADORES

As modificações introduzidas nas moléculas dos HUIFN- $\alpha$  e HUIFN- $\beta$  foram feitas através da técnica do PCR (INNIS & GELFANO, 1990). Para tanto foi necessária a confecção de diversos iniciadores que possibilitaram a inserção de novos sítios para enzimas de restrição, que permitiram a construção do híbrido, tendo como base a estrutura dos HulFN- $\alpha_{2b}$  e HulFN- $\beta$ . A determinação destes iniciadores foi baseada na seqüência de nucleotídeos e no alinhamento das seqüências de aminoácidos dos HulFN- $\alpha_{2b}$  e HulFN- $\beta$  e baseado na estrutura tridimensional do rMulFN- $\beta$  determinada por difração de raios X.

Para permitir a substituição da  $\alpha$ -hélice *E* do HulFN- $\beta$  pela mesma  $\alpha$ -hélice do HulFN- $\alpha_{2b}$ , foi necessário a introdução do sítio da enzima de restrição Kpn I no fragmento que codifica para o HulFN- $\alpha_{2b}$  e HulFN- $\beta$ . Para isto, a seqüência de nucleotídeos do fragmento do HulFN- $\alpha_{2b}$  CTC (L), localizada na posição 128, foi trocada por CGG (R). A seqüência de nucleotídeos na posição 131 (CAT) correspondente ao aminoácido histidina (H) do HulFN- $\beta$ , foi substituída por CGG que corresponde ao aminoácido arginina (R).

Os iniciadores planejados para a inserção do sítio da enzima de restrição Kpn I no fragmento que codifica para o HulFN- $\alpha_{2b}$  foram:

**αK5'** 5'- GAATACCTCGGTACCTGAAGAG -3'  
KpnI

**αK3'** 5'- CTCTTTCAGGGTACCGAGTGATTC -3'  
KpnI

Os iniciadores planejados para a inserção do sítio da enzima de restrição Kpn I no fragmento que codifica para o HulFN-β foram:

**βK5'** 5'- AGGATTCTGCGGTACCTGAAGGCC -3'  
KpnI

**βK3'** 5'- GGCCTTCAGGTACCGCAGAATCCT -3'  
KpnI

Além disso, foram criados iniciadores construídos nas seqüências 5' e 3' dos genes que codificam para os HulFN-α<sub>2b</sub> e HulFN-β. Na região 5' foram criados os iniciadores Pα5' e Pβ5' e na região 3', foram criados os iniciadores Pα3' e Pβ3'. Estes iniciadores foram adicionados das seqüências de nucleotídeos reconhecidas pelas enzimas de restrição Bam HI e Hind III respectivamente, como é mostrado abaixo.

**Pα3'** 5'-CCCAAGCTTCCTTACTTCTTAAAC-3'  
HindIII

**Pα5'** 5'-CGCAGGATCCTGTGATCTGCCTCAAACC-3'  
Bam HI

**Pβ5'** 5'-GCCGGATCCTTACAACCTTGGATTCCT-3'  
BamHI

**Pβ3'** 5'-GCCAAGCTTAGTTTCGGTCATTCCTGTAAGTC-3'  
HindIII

#### 4.4.2 - AMPLIFICAÇÃO POR PCR

A introdução do sítio Kpn I no fragmento que codifica para o HulFN- $\alpha_{2b}$  foi feita através de duas reações de PCR. Uma reação utilizando os iniciadores P $\alpha_5'$  e  $\alpha K3'$  e a outra utilizando os iniciadores P $\alpha_3'$  e  $\alpha K5'$ . Da mesma forma, para a introdução do sítio Kpn I no fragmento que codifica para o HulFN- $\beta$  foram necessárias duas reações de PCR. Uma utilizando iniciadores P $\beta_5'$  e  $\beta K3'$  e a outra utilizando os iniciadores P $\beta_3'$  e  $\beta K5'$ .

As reações de amplificação dos fragmentos de DNA foram feitas utilizando-se 10  $\eta$ g de DNA do plasmídeo pDS<sub>56</sub>/HulFN- $\alpha_{2b}$ , 10 pM de cada iniciador, 0,2 mM de cada desoxiribonucleotídeo, 10  $\mu$ l de tampão 10x Taq polimerase, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.125 U de taq polimerase (Promega, USA) e H<sub>2</sub>Odd estéril q.s.p. 100  $\mu$ l. Após ser homogeneizada, foi adicionado à reação 80  $\mu$ l de óleo mineral Nujol (Schering -Plough S/A) e a incubação feita em aparelho termociclador (Perkin Elmer, USA) seguindo o protocolo abaixo : 01 ciclo a 95°C/ 5min; 45°C / 30 seg; 72°C/1min ; 30 ciclos a 95°C/ 30 seg; 45°C / 30 seg; 72°C/1min ; 01 ciclo a 95°C/ 30 seg ; 45°C/ 30 seg; 72°C/10min.

Os produtos de PCR foram fracionados em gel de agarose 1% em tampão TAE e as bandas correspondentes aos fragmentos de aproximadamente 400 e 100 pb forma recortadas do gel e purificadas utilizando-se o “Kit PCR Preps” (Promega). O fragmento de 400 pb purificado do gel foi digerido com as enzimas de restrição Bam HI e Kpn I e o fragmento de 100 pb, digerido com as enzimas de restrição Hind III e Kpn I. Após digestão, os fragmentos foram ligados entre si e em seguida ligados ao plasmídeo pDS<sub>56</sub> 6xHis, o qual foi previamente digerido com as enzimas de restrição Bam HI e Hind III.

#### 4.4.3 - FRACIONAMENTO ELETROFORÉTICO DO PRODUTO DE PCR

O produto de PCR (5  $\mu$ l) ao qual foi adicionado 1  $\mu$ l de tampão de amostra foi aplicado em gel de agarose (1%), em tampão TAE e o fracionamento efetuado a 50 V, por 40 a 60 minutos. O fragmento de DNA foi visualizado pela coloração com brometo de etídio e fotografado sob iluminação luz UV (320 $\eta$ m).

A purificação do amplificado foi efetuada utilizando-se o "QIAEXII GEL extration kit" (QIAGEN - USA), segundo especificações do fabricante. O DNA foi eluído em 50 µl de água e conservado à -20°C.

#### **4.4.4 – DIGESTÃO ENZIMÁTICA**

Os fragmentos de DNA amplificados (500 ng) e purificados, foram digeridos em presença de 10 U de Kpn I (BRL, USA), conforme especificações do fabricante. O fragmento de DNA de 100 pb foi em seguida digerido com 2,5 U de Hind III (Biolabs, Inglaterra) e o fragmento de DNA de 400 pb, digerido com 2,5 U de Bam HI (Biolabs, Inglaterra).

Em seguida, tanto o inserto quanto o vetor de expressão (plasmídeo pDS<sub>56</sub>) foram fracionados em gel 1,5% agarose em tampão TAE 1x e o DNA visualizado com luz U.V. manual (UVGL-25,UVP inc.,E.U.A) comprimento de onda longa (360nm) para se evitar quebras no DNA. As bandas correspondentes ao fragmento do inserto, foram cortadas do gel e purificadas utilizando-se o "kit GeneClean" (Bio 101 Inc., E.U.A).

#### **4.4.5 - LIGAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR AO VETOR DE EXPRESSÃO**

##### **4.4.5.1 - O PLASMÍDEO PDS<sub>56</sub> 6XHIS**

Para se produzir os HulfN- $\alpha$  e  $\beta$  e os IFN híbridos em *E. coli* foi escolhido o plasmídeo de expressão pDS<sub>56</sub> 6xHis (BUJARD, 1987). Este plasmídeo contém um promotor/operador (P/O2) localizado próximo ao sítio de ligação do ribossomo (RBS). A atividade deste promotor é reprimida pela ligação de uma proteína repressora *lac* ao operador. A atividade do promotor pode ser restabelecida pela adição de  $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) o qual inativa o repressor, liberando assim o operador. Após a região de ligação ao ribossomo (RBS) segue-se o código de iniciação (ATG), as seqüências que codificam para 6 moléculas do aminoácido histidina e um sítio de clonagem adjacente, que permite a inserção do fragmento de DNA a ser expresso. A inserção das histidinas adjacentes, permite a fácil purificação e concentração da proteína recombinante produzida através da cromatografia de afinidade em resina de

quelato de níquel (STÜBER, 1990). Finalmente, este plasmídeo possui três codons de terminação da tradução nas três diferentes janelas de leitura.

#### **4.4.5.2 - REAÇÃO DE LIGAÇÃO**

A reação de ligação foi feita utilizando uma relação molar de 10 partes de inserto para 1 parte de vetor, sendo que a concentração de ambas foi avaliada após corrida em gel a 1% agarose em tampão TAE. Nesta reação foram empregados aproximadamente 100 ng de inserto, 10 ng do vetor, 1 U de T4 DNA Ligase (Biolabs, 400Uweiss/ul), 4 µl de tampão de ligação (Promega, Madison, WI., E.U.A.) e H<sub>2</sub>O q.s.p. 20 µl. A reação foi incubada a 14°C (BOD, FANEN, São Paulo, Brasil) durante 18 h. O controle da ligação foi feito em tubo separado onde foram adicionados os mesmos reagentes da reação de ligação, exceto o inserto.

#### **4.4.6 - INSERÇÃO DOS HUIFN MUTAGENIZADOS EM *E. COLI***

A bactéria *Escherichia coli* M15/pDM1, foi escolhida em nosso trabalho para produção da proteína, por conter o plasmídeo repressor do gene da lactose pDM1, que regula a expressão das proteínas recombinantes. Além disso, este plasmídeo possui o gene de resistência à canamicina, o que facilita a seleção dos clones.

O preparo da bactéria competente *Escherichia coli* M15, foi feito inoculando esta bactéria em 50 ml de 1x Meio LB e incubando sob agitação (180 rpm, Shaker Superohm G-25, Brasil) a 37°C durante 16 h. Desta cultura, foram transferidos 4 ml para 400 ml de LB e incubados nas mesmas condições. O crescimento foi acompanhado até a cultura atingir uma D.O ( $A_{600nm}$ ) igual a 0,375, correspondendo a um crescimento equivalente à metade da fase logarítmica. As bactérias foram centrifugadas a 1600xg durante 30 min a 4°C e o sedimento homogeneizado em 80 ml da solução de 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 8. A suspensão bacteriana foi incubada a 0°C por 20 min. e centrifugada como anteriormente. O sedimento celular foi homogeneizado com 16 ml da mesma solução acrescidos de glicerol a 15%, distribuído em alíquotas (500 µl) e congelado rapidamente em mistura gelo seco-álcool. O tubos foram estocados em temperatura de -70°C.

A bactéria competente foi retirada do freezer  $-70^{\circ}\text{C}$  e incubada em banho de gelo por 30 minutos. Em tubos Eppendorfs (1,5 ml) foram adicionados 100  $\mu\text{l}$  da bactéria M15 (competente) à reação de ligação (20  $\mu\text{l}$ ). A reação foi suavemente agitada e imediatamente incubada em gelo por 30 minutos. Após esse tempo foi feito o choque térmico incubando-se a reação a  $42^{\circ}\text{C}$ , por 120 segundos e novamente em gelo por 30 segundos. Foi então adicionado 1 ml de Meio LB 1x sem antibióticos a cada reação e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos. As bactérias foram sedimentadas em microcentrífuga, homogeneizadas em 100  $\mu\text{l}$  de 1x Meio LB e um volume de 30 e 70  $\mu\text{l}$  foi semeado em placas de Petri contendo LB ágar acrescido de 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina e 25  $\mu\text{g/ml}$  de canamicina. As placas foram incubadas em estufa  $37^{\circ}\text{C}$  por 16 h, e feita em seguida contagem do número de colônias. Paralelamente foram feitos controles do crescimento de bactérias competentes não transformadas, em placas contendo ágar LB suplementado, ou não, com ampicilina.

#### **4.5 - IDENTIFICAÇÃO DOS CLONES**

A identificação dos clones contendo os insertos do IFN foi feita pela PCR, utilizando-se as bactérias transformadas e os iniciadores  $p\beta 5'$ ,  $p\beta 3'$ ,  $p\alpha 5'$  e  $p\alpha 3'$ , descritos anteriormente.

As PCR foram feitas com 1  $\mu\text{l}$  das colônias transformadas crescidas em meio LB, 1  $\mu\text{mol}$  dos iniciadores, 50  $\mu\text{M}$  (0,4  $\mu\text{l}$ ) de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2  $\mu\text{l}$  de tampão 10x, 1,2  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 0,05 U de Taq Polimerase (Promega, E.U.A, Cat. n. M186A) e  $\text{H}_2\text{O}$ dd estéril q.s.p. 20  $\mu\text{l}$ . A reação foi feita como descrito anteriormente.

## **4.6 - EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL**

### **4.6.1 - PREPARAÇÃO EM PEQUENA ESCALA (5 ml)**

As bactérias transformadas foram pré-inoculadas em 5 ml de meio LB suplementado com 100 µg/ml de ampicilina e 25 µg/ml de canamicina e incubadas a 37°C sob agitação a 180 rpm por 16 h. Após incubação, a cultura bacteriana foi centrifugada e o plasmídeo extraído segundo protocolo do Kit "Wizard plus minipreps DNA purification system" da Promega. O plasmídeo foi eluído em 50 µl de água e estocado à -20°C.

### **4.6.2 - PREPARAÇÃO EM LARGA ESCALA (500 ml)**

Uma cultura de 5 ml de bactérias transformadas crescida "overnight" foi inoculada em 500 ml de Meio LB 1x, suplementado com 100 µg/ml de ampicilina e 25 µg/ml de canamicina. Esta cultura foi incubada a 37°C sob a agitação de 100 rpm por 18 h. O DNA plasmidial foi obtido segundo especificações de BIRNBOIN e DOLY, 1979.

O DNA precipitado foi solubilizado em 500 µl de TE estéril e sua concentração calculada, após leitura da  $D.O_{260nm}$  de uma alíquota diluída 1/50 em H<sub>2</sub>O. Para o cálculo foi considerado que uma unidade D.O corresponde a uma solução de DNA de concentração 50 µg/ml (SAMBROOK, 1989). Para se estimar o grau de contaminação do DNA com proteínas, foi realizado o cálculo, que corresponde ao relação entre as D.O ( $A_{260nm}/A_{280nm}$ ).

## **4.7 - SEQÜENCIAMENTO (SANGER, 1977)**

O seqüenciamento do DNA foi feito através do método da terminação da cadeia (SANGER, 1977) sendo utilizado na reação o Kit Sequenase® (United States Biochemical, EUA). A enzima utilizada nesta reação foi a DNA polimerase derivada do fago T7 (Sequenase 2.0 TM, United States Biochemical, EUA), a qual possui alta atividade de polimerase no sentido 5'-3' e baixa atividade de exonuclease no sentido 3'-5'.

Os cDNAs dos HulFN- $\alpha$  e HulFN- $\beta$  e os cDNAs dos IFN recombinantes e híbrido, clonados no plasmídeo pDS<sub>56</sub> e purificados em preparação de larga escala, foram empregados nas reações de seqüenciamento. Para seqüenciar os cDNAs clonados no

plasmídeo pDS<sub>56</sub>, foram utilizados iniciadores pDS5' e pDS3' que flanqueiam o sítio de clonagem desse plasmídeo. Os iniciadores são:

**pDS5'**= Homólogo à região +91 até +110 do plasmídeo pDS<sub>56</sub>

5' TTCATTAAAGAGGAGAAATT 3'

**pDS3'**= Homólogo à região +181 até +200 do plasmídeo pDS<sub>56</sub>. Fita não codificadora.

5' CTATCAACAGGAGTCCAAGC 3'

O sequenciamento automático foi feito em aparelho da Pharmacia, conforme instruções do fabricante.

#### **4.8 - PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS INTERFERONS MUTAGENIZADOS RECOMBINANTES (STÜBER, 1990)**

Os HuIFN- $\alpha$  e HuIFN- $\beta$  e os IFN híbridos, inseridos no plasmídeo pDS<sub>56</sub>, foram produzidos em *E. coli*. Este plasmídeo insere seis histidinas à proteína recombinante permitindo a purificação e concentração da proteína produzida, através da cromatografia de afinidade em resina de quelato de níquel (STÜBER, 1990).

A produção do IFN foi feita pelo inóculo das bactérias contendo o IFN recombinante em 5 ml de meio de cultura LB, contendo antibióticos e incubadas por 18 horas a 37°C sob agitação de 180 rpm. Após este período, a cultura foi diluída 1:50, em 200 ml do mesmo meio e novamente incubada a 37°C, sob agitação de 180 rpm até atingir uma D.O<sub>600nm</sub> de 0,7. Antes da cultura ser induzida com 0,2 mM de IPTG foi retirado uma amostra de 1 ml. A cultura foi incubada por mais 5 h e então, retirados 1 ml (cultura induzida) para análise em gel e o restante centrifugado a 3200xg por 30 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado homogeneizado em 20 ml de tampão A (6M Guanidina HCl, 0,1 M fosfato de sódio, 0,01 M tris/HCl pH 8). O lisado bacteriano foi centrifugado a 10.000xg durante 30 min a 4°C, o líquido sobrenadante coletado e utilizado na purificação.

#### **4.8.1 - PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES**

O sobrenadante obtido no ítem anterior foi purificado em uma coluna de dimensões 1cm diâmetro/6cm altura, contendo 1 ml da resina de quelato de níquel (QIAGEN, EUA) carregada com  $Ni^{2+}$  e previamente equilibrada com tampão A. A amostra foi eluída num fluxo de 10 ml/h, sendo a fração residual (proteínas não ligadas à resina) coletada.

As proteínas foram eluídas com 20 ml de tampão A, coletando-se frações de 1,5 ml. O tampão utilizado (8M guanidina-HCl, 0,1M fosfato de sódio, 0,01M tris/HCl) para as eluições seguintes somente se modificou o pH: B (pH 6), C (pH 5) e D (pH 4). A coluna foi inicialmente equilibrada com o tampão B e, após a aplicação da amostra, os eluatos dos diferentes tampões (B, C, D) foram coletados em frações de 1,5 ml, para dosagem de proteínas e titulação dos IFN. Finalmente, a coluna foi lavada com tampão F (6M Guanidina-HCl, 0,2M  $CH_3COO_4$ , pH 2,7) e o eluato desprezado.

O IFN foi titulado nas amostras de cada fração. Estas amostras foram diluídas 1:2 em tampão de aplicação de proteína 2x e analisadas em gel de poliacrilamida 12,5% /SDS (PAGE) sob condições desnaturantes.

#### **4.8.2 - FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS – PAGE (LAEMMLI, 1970)**

As proteínas recombinantes purificadas após fervura em tampão de amostra, foram separadas eletroforéticamente em PAGE-SDS a 12,5%. Como marcador de peso molecular foram usados padrões de proteínas de massas que variaram entre 10,6 a 66,0 kDa. O gel foi corado 1 hora a 37°C com agitação em solução de corante coomassie blue diluído em solução fixadora I, descorado por no mínimo 2 h na sol. fixadora I e então mantido em solução de etanol 10% até desaparecer o fundo azul do gel. O gel foi seco entre duas folhas de papel celofane.

As frações que apresentaram maior título de IFN e maior grau de pureza quando fracionadas em PAGE, foram agrupadas e dialisadas em tampão 0,1M citrato de sódio pH 4, 0,1% SDS, 1 mM DTT, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA e conservadas à -70°C.

### 4.8.3 – DOSAGEM DAS PROTEÍNAS

A concentração das proteínas foi determinada por espectrofotometria através do “Kit Bio-Rad Assay” (Bio-Rad laboratories USA), conforme especificações do fabricante.

### 4.9 - SOLUÇÕES E MEIOS

**Ágar LB:** 1,5% p/v ágar, 0,5% p/v extrato de levedura, 0,1% p/v triptona, 0,5% p/v NaCl, acertar pH 7,5 com sol. 2 N de NaOH.

**Etanol wash:** etanol 75%, 0,01M Tris-HCl, pH 7,6, 0,01M EDTA pH 8

**FENOL:** fenol destilado, 0,1 g de B-hidroxiquinolina, saturado em de Tris-HCl, pH 8.

**GEL 1% AGAROSE TAE :** 1% (p/v) Agarose, 1x TAE, 0,5 ug/ml EtBr

**GTE:** 50 mM glicose, 25 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA

**H<sub>2</sub>O DEPC :** H<sub>2</sub>O deionizada tratada com 0.05% de dietilpirocarbonato (DEPC) por 12 h a 4<sup>o</sup>C e após, autoclavada durante 45min.

**ISOTIOCIANATO DE GUANIDINA 4M:** 4M isotiocianato de guanidina (BRL), 30 mM acetato de Sódio pH 5,2; 0,1 M DTT, 0.5% p/v N-laurylsarkosyl

**MEIO LB:** Bacto triptona 1% p/v, extrato de levedura 0,5% p/v, 171 mM NaCl

**MEM:** Meio mínimo de Eagle, suplementado com sais de Earle (Sigma, E.U.A), 2 mM de glutamina (Sigma, EUA), 20% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, lote 1125, Campinas, SP) e com as mesmas concentrações dos antibióticos do PAF.

**PBS:** 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.

**SOLUÇÃO DO CORANTE COOMASSIE BLUE:** 0,25% p/v do corante coomassie blue R 250 (Sigma, EUA) diluído em solução fixadora 1.

**SOLUÇÃO DE FOSFATO ESTOQUE:** 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; o pH foi ajustado para 7,2 com ácido fosfórico.

**SOLUÇÃO FIXADORA DE PROTEÍNAS I:** 40% Metanol, 10% ácido acético gálcial.

**SOLUÇÃO NAI:** 9 ml de sol. (8 M NaI + 0.022 M DTT) + 1 ml de 1 M tampão fosfato de sódio pH 6.

**STET:** 8% p/v sacarose, 5% p/v NP40, 50 mM Tris-HCl, pH 8; 50 mM EDTA pH 8.

**TAMPÃO DE AMOSTRA DE PROTEÍNAS:** 20% glicerol, 2% SDS, 0,375 M Tris pH8,8; 0,75 M β-Mercaptoetanol e 0,25 % v/v do corante azul de bromofenol (Sigma, EUA).

**TAMPÃO DE AMOSTRA DNA:** 50% glicerol, 40% azul de bromofenol 0.85% p/v, 10% v/v 10x TAE

**TAMPÃO DE LIGAÇÃO 5x:** 0.25 M Tris-HCl (pH 7,6), 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% p/v polietileno glicol-8.000

**TAMPÃO DE SEQUÊNCIA 5x:** 200 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM NaCl

**TAMPÃO 1x TAE:** 20,3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10,04 M Tris Acetato, 10 mM EDTA pH 8

**TAMPÃO DE TAQ POLIMERASE 10x:** 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9 a 25°C), 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% triton X-100

**TE:** Tris pH 7,4 10 mM, EDTA 1 mM

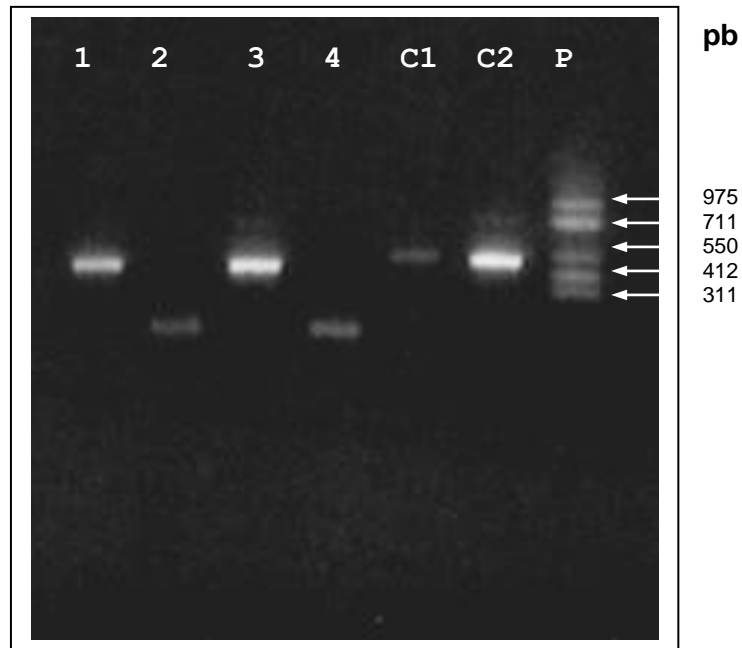
**TAMPÃO A - GUANIDINA/HCL 6M:** 6 M Guanidina HCl, 0.1 M fosfato de sódio, 0,01 M tris/HCl pH 8.

**TRIPSINA:** 0.25% p/v (Difco E.U.A), 0.085% de NaHCO<sub>3</sub>, em salina de Hanks 1x. Acertar pH para 7,2 a 7,4 com NaHCO<sub>3</sub>. Filtrar em membrana esterilizante 0,22 μm e estocar em freezer a -20°C.

## **5. RESULTADOS**

## 5.1 - AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DOS INTERFERONS.

Os produtos das amplificações em que foram utilizados os iniciadores IFN $\alpha$ 5' e IFN $\alpha$ K3', 406 pb, (FIG. 3, canaleta 3) e os iniciadores IFN $\beta$ 5' e IFN $\beta$ K3', 405 pb, (FIG. 3, canaleta 1) e os produtos das amplificações em que foram utilizados os iniciadores IFN $\alpha$ 3' e IFN $\alpha$ K5', 125 pb, (FIG. 3, canaleta 4) e os iniciadores IFN $\beta$ 3' e IFN $\beta$ K5', 120 pb, (FIG. 3, canaleta 2), foram fracionados em gel de agarose 1% em tampão TAE e purificados utilizando-se o "QIAEXII GEL extration kit" (QIAGEN - USA), segundo especificações do fabricante. Como controles positivos, foram feitas reações utilizando os iniciadores IFN $\alpha$ 5'/IFN $\alpha$ 3' e IFN $\beta$ 5'/IFN $\beta$ 3' e os DNAs dos rHuIFN- $\alpha$ <sub>2b</sub> e rHuIFN- $\beta$  respectivamente, nas quais foram amplificados fragmentos de 540 pb (FIG.3, canaletas 5 e 6).



**FIGURA 3 - FRACIONAMENTO EM GEL DE AGAROSE 1% DOS PRODUTOS DE PCR DOS rHuIFN- $\alpha_{2b}$  E rHuIFN- $\beta$ .** Os produtos amplificados (5 $\mu$ l) foram fracionados em gel 1% agarose corado com EtBr e fotografado sob luz UV. Os fragmentos amplificados dos rHuIFN- $\beta$  (canaletas 1 e 2) e rHuIFN- $\alpha_{2b}$  (canaletas 3 e 4), possuem diferentes tamanhos moleculares; canaletas C1 e C2, fragmentos amplificados do rHuIFN- $\beta$  e do rHuIFN- $\alpha_{2b}$ , respectivamente; canaleta P, padrão de tamanho molecular.

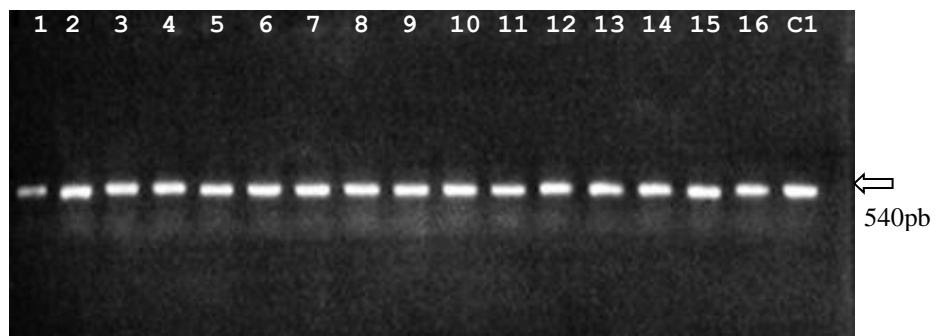
## 5.2- CLONAGEM DOS INTERFERONS RECOMBINANTES E HÍBRIDO.

O IFN híbrido, ou seja, rHuIFN- $\beta$  com sítio para enzima de restrição Kpn I e  $\alpha$ -hélice E do HuIFN- $\alpha_{2b}$ , o qual chamamos de rHuIFN- $\beta K\alpha$ , foi construído pelas ampliações do DNA com os iniciadores IFN $\beta 5'$ /IFN $\beta 3'$  e IFN $\alpha 3'$ /IFN $\alpha K5'$ . Após a digestão, os DNAs foram submetidos à reação de ligação na qual além dos dois insertos, foi adicionado o DNA do plasmídeo pDS<sub>56</sub> digerido com as enzimas de restrição Bam HI e Hind III.

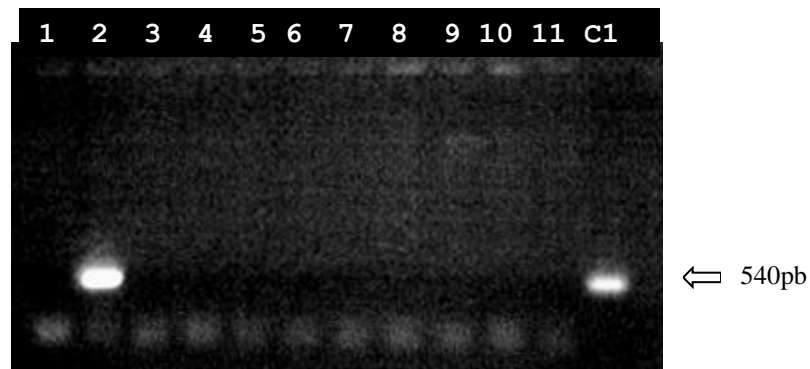
Os rHuIFN- $\alpha$  e rHuIFN- $\beta$  com sítio para enzima de restrição Kpn I, foram denominados rHuIFN- $\alpha K$  e rHuIFN- $\beta k$ , respectivamente.

As bactérias *E.coli* M15/pDM1 transformadas com o plasmídeo pDS<sub>56</sub> contendo os genes dos IFN recombinantes e do híbrido, rHuIFN- $\alpha K$ , rHuIFN- $\beta k$  e rHuIFN- $\beta K\alpha$ , foram crescidas em meio LB contendo 100  $\mu$ g/ml de ampicilina e 25  $\mu$ g/ml de canamicina, sendo que as culturas foram utilizadas para o PCR. Para verificar a presença do DNA do híbrido rHuIFN- $\beta K\alpha$ , foram utilizados os iniciadores específicos (IFN $\beta 5'$ /IFN $\alpha 3'$ ). Neste PCR, foram feitas duas reações como controle positivo, utilizando-se iniciadores IFN $\beta 5'$ /IFN $\beta 3'$  e IFN $\alpha 5'$ /IFN $\alpha 3'$  com os rHuIFN- $\beta$  e rHuIFN- $\alpha_{2b}$ , respectivamente. Dos vinte e dois clones testados, sete (FIG 6, canaletas 1, 3, 5, 6, 7, 8 e 10) amplificaram fragmentos de igual tamanho molecular dos controles positivos. Para verificar a presença do DNA dos rHuIFN- $\alpha K$  e rHuIFN- $\beta k$ , foram utilizados os iniciadores específicos para o rHuIFN- $\alpha K$  IFN $\alpha 5'$ /IFN $\alpha 3'$ , (FIG. 4) e IFN $\beta 5'$ /IFN $\beta 3'$  para o rHuIFN- $\beta K$  (FIG. 5). Em todos os clones testados para o rHuIFN- $\alpha K$ , foram observados fragmentos de aproximadamente 540 pb (FIG.4 canaletas 1 a 16) sendo estes de igual tamanho do observado no controle positivo "+" (*E.coli* M15/ pDM1 + rHuIFN- $\alpha_{2b}$ ). Em apenas um clone, dos onze testados para o rHuIFN- $\beta K$ , foi observado fragmento de 540 pb (FIG 5, canaleta 2). A confirmação da presença do sítio da enzima de restrição Kpn I nos cDNAs foi feita através da digestão dos produtos de PCR dos clones com esta enzima e o fracionamento em gel 1% agarose. Para todos os clones testados na PCR que foram positivos, foram feitas extrações do plasmídeo em pequena escala, sendo estes estocados à -20°C e as bactérias congeladas à -70°C. Os clones 2, rHuIFN- $\beta K$  (FIG 5, canaleta 2); 3, rHuIFN- $\alpha K$  (Fig 4, canaleta 3) e o 5, rHuIFN- $\beta K\alpha$  (FIG 6, canaleta 7), foram escolhidos para a produção das proteínas.

A confirmação da exata localização do sítio da enzima de restrição Kpn I nos cDNAs do rHuIFN- $\alpha K$ , rHuIFN- $\beta K$  e rHuIFN- $\beta K\alpha$ , foi feita através do sequenciamento manual (SANGER *et al.*, 1977) e do sequenciamento automático.



**FIGURA 4 - Fracionamento em gel de agarose dos produtos de PCR das colônias transformadas com a construção do rHuIFN- $\alpha$ K.** Os produtos do PCR foram amplificados a partir dos clones crescidos por 16 h, sendo estes fracionados em gel 1% agarose, corado com EtBr e fotografado sob luz UV. Canaletas 1 a 16, fragmentos amplificados do rHuIFN- $\alpha$ K (clones 1 à 16); canaleta C1, fragmento amplificado do rHuIFN- $\alpha$ 2b.



**FIGURA 5 - Fracionamento em gel de agarose 1% dos produtos de PCR das colônias transformadas com a construção do rHuIFN- $\beta$ K.** Os produtos das reações de PCR foram fracionadas em gel 1% agarose, corado com EtBr e fotografado sob luz UV. Canaletas 1 a 11, fragmentos amplificados do rHuIFN- $\beta$ K (clones 1 à 11); Canaleta C1, fragmento amplificado do rHuIFN- $\beta$ .

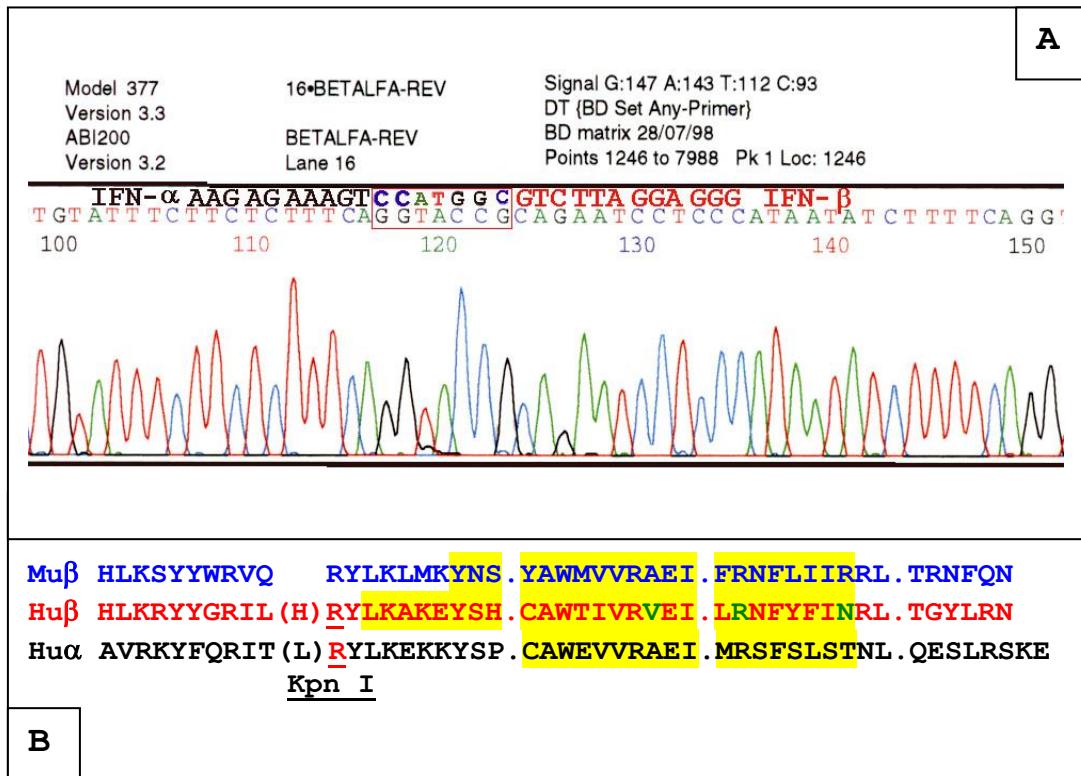


**FIGURA 6 - Fracionamento em gel de agarose dos produtos de PCR das colônias transformadas com a construção do rHuIFN- $\beta$ K $\alpha$ .** Os produtos de PCR foram amplificados à partir dos clones crescidos por 16 h e fracionados em gel 1% agarose, corado com EtBr e fotografado sob luz UV. Canaletas 1 a 22, fragmentos amplificados do rHuIFN- $\beta$ K $\alpha$  (clones 1 a 22); canaletas C1 e C2, fragmentos amplificados dos rHuIFN- $\alpha$ <sub>2b</sub> e rHuIFN- $\beta$ , respectivamente.

### 5.3 – SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento do DNA dos IFN híbrido e recombinantes obtidos, foi feito através do método da terminação da cadeia (SANGER *et al.*, 1977) e através do sequenciamento automático.

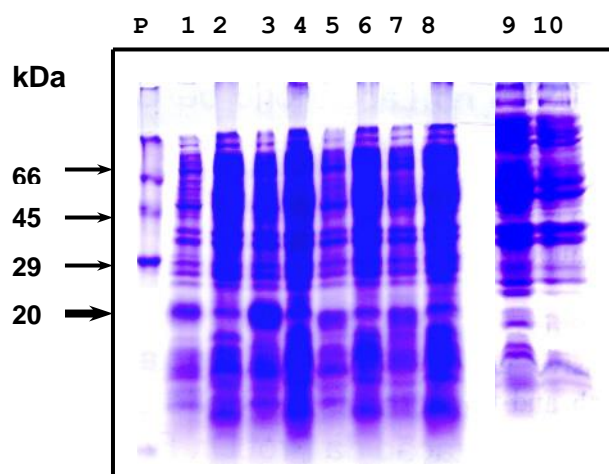
Na figura 7A, observamos parte do sequenciamento obtido do rHuIFN- $\beta$ K $\alpha$ , o que evidenciou a presença do sítio para a enzima de restrição Kpn I (grifado em vermelho) e confirmou a substituição da  $\alpha$ -hélice E do rHuIFN- $\beta$ , pela do rHuIFN- $\alpha$ . Na figura 7B, podemos observar o pareamento de parte das sequências de aminoácidos dos interferons MuIFN- $\beta$ , HuIFN- $\beta$  e HuIFN- $\alpha$ , mostrando a substituição dos aminoácidos H e L pelo R, nos HuIFN- $\beta$  e HuIFN- $\alpha$ , respectivamente



**FIGURA 7 – Pareamento dos aminoácidos inferidos da seqüência de nucleotídeos da  $\alpha$ -hélice E dos interferons beta murino (Mu $\beta$ ), humano (Hu $\beta$ ) e o interferon humano alfa (Hu $\alpha$ ). A – Sequenciamento de nucleotídeos mostrando o sítio de restrição da enzima Kpn I e parte da seqüência dos HuIFN- $\alpha$  e HuIFN- $\beta$ . Os números correspondem a posição dos nucleotídeos levando-se em consideração toda a seqüência. B - A região da  $\alpha$ -hélice E esta marcada em amarelo, para cada IFN, bem como determinado o local da inserção do sítio de Kpn I. Entre parênteses foram colocados os aminoácidos substituídos pelo Arginina (R) em cada um dos IFN.**

#### 5.4 - PRODUÇÃO DOS INTERFERONS.

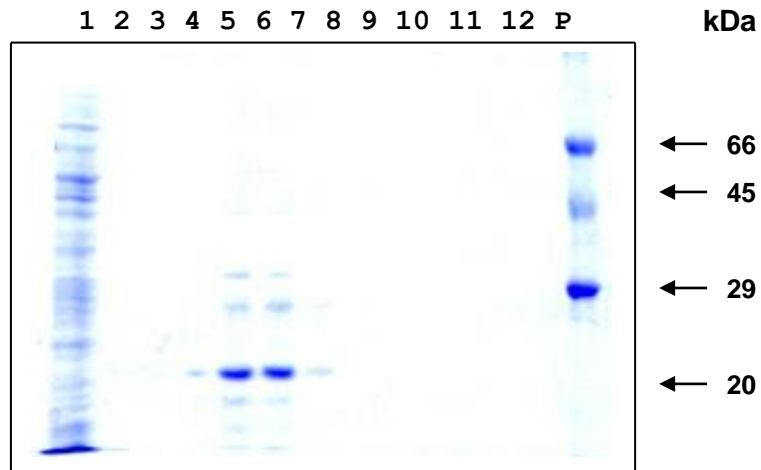
A produção dos IFN em *E. coli* M15 pôde ser observada através do fracionamento eletroforético em SDS-PAGE 12,5%, corado com coomassie blue, das amostras obtidas após indução com IPTG. Na FIG.8, podemos observar bandas correspondentes aos rHuIFN, com tamanho molecular aparente em torno de 20 kDA. As culturas dos clones que expressam os rHuIFN- $\beta$ k $\alpha$  e rHuIFN- $\beta$ k foram induzidas nas D.O ( $A_{600nm}$ ) 0,7 e 1,2, sendo que a cultura do clone que expressa rHuIFN- $\beta$ k $\alpha$ , produziu maior quantidade de proteína em D.O ( $A_{600nm}$ ) 1,2, comparada com a mesma cultura induzida em D.O ( $A_{600nm}$ ) 0,7. Estes dados confirmam aqueles obtidos por CARVALHO, (1998), o qual observou que a indução do clone rHuIFN- $\beta$  com D.O. 1,2, resultou em uma maior quantidade de proteína produzida, uma vez que a massa final de bactérias foi 40% maior. STÜBER *et al.*,(1990) descreveram a técnica recomendando a indução com IPTG quando a D.O ( $A_{600nm}$ ) da cultura atingisse 0,7. A cultura do clone que expressa o rHuIFN- $\alpha$ K foi induzida em DO ( $A_{600nm}$ ) 0,7.



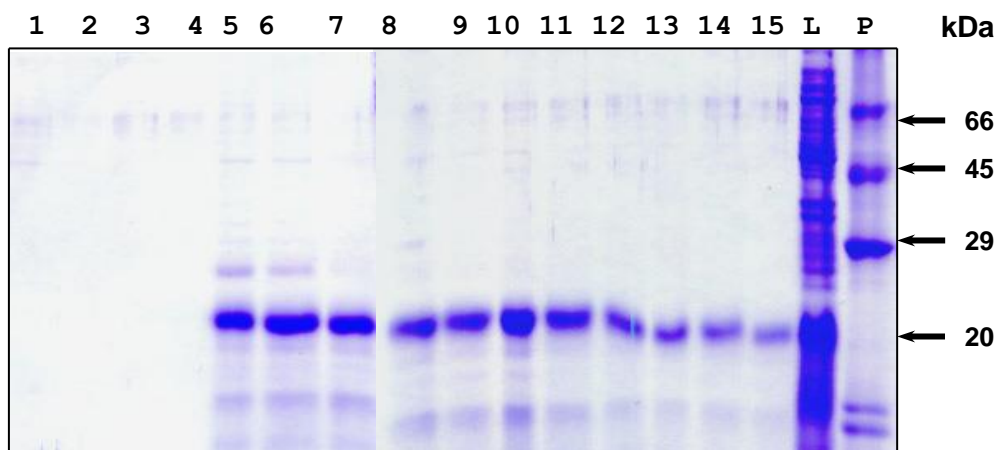
**FIGURA 8 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% corado com coomassie blue, dos rHuIFN- $\beta$ K, rHuIFN- $\beta$ K $\alpha$  e rHuIFN- $\alpha$ K produzidos em *E.coli* M15.** Os IFN híbridos e recombinantes induzidos com IPTG ou não foram fracionados em gel de poliacrilamida, após ser adicionado tampão de amostra. Canaletas 1 e 3, rHuIFN- $\beta$ K $\alpha$  induzidos em D.O. 0,7 e 1,2 respectivamente; canaletas 2 e 4, rHuIFN- $\beta$ K $\alpha$  não induzidos; canaletas 5 e 7, rHuIFN- $\beta$ K induzidos em D.O. 0,7 e 1,2 respectivamente; canaletas 6 e 8, rHuIFN- $\beta$ K não induzidos; canaletas 9 e 10, rHuIFN- $\alpha$ k induzido e não induzido, respectivamente (D.O. 0,7); canaleta P, padrão de massa molecular (1 $\mu$ g de proteína).

## 5.5 - PURIFICAÇÃO DOS INTERFERONS.

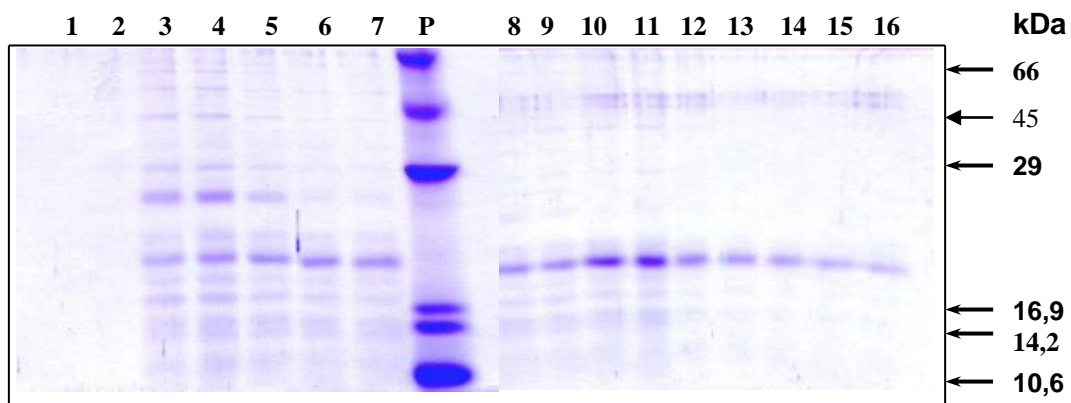
A purificação de proteínas recombinantes foi feita conforme STÜBER *et al.*, (1990). Aos interferons recombinantes foram adicionados na porção amino-terminal 6 histidinas, provenientes do plasmídeo pDS<sub>56</sub>, que permitem a purificação por afinidade em coluna de Ni<sup>++</sup>. A purificação foi modificada pela utilização de um gradiente de pH durante a eluição das frações, a fim de se melhorar o grau de pureza e conseqüentemente aumentar a atividade específica das proteínas produzidas. Nas figuras 9, 10 e 11 são mostradas proteínas produzidas e a purificação dos rHuIFN- $\alpha$ K, rHuIFN- $\beta$ K $\alpha$  e rHuIFN- $\beta$ K. O IFN ligado à coluna de quelato de níquel foi eluído com o tampão uréia 8 M nos pH 5 (FIG 9, canaletas 4 a 10), pH 5 e 4 (FIG 10, canaletas 5 a 15) e pH 5 e 4 (FIG 11, canaletas 3 a 16). A fração 5.2 (FIG 9, canaleta 5) do rHuIFN- $\alpha$ K eluída em pH 5,0 foi escolhida para os experimentos subseqüentes, por estar com maior quantidade da proteína purificada. As frações 4.1 (FIG 10, canaleta 10) e 4.3 (FIG 11, canaleta 10), eluídas em pH 4,0 dos rHuIFN- $\beta$ K $\alpha$  e rHuIFN- $\beta$ K, respectivamente, também foram selecionadas para os experimentos subseqüentes por estarem com maior quantidade de proteínas purificadas.



**FIGURA 9 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%, corado com coomassie blue, das frações eluídas da purificação do rHuIFN- $\alpha$ K em coluna de quelato de níquel.** Os IFN híbridos e recombinantes construídos foram fracionados em gel de poliacrilamida, após ser adicionado tampão de amostra. As frações foram eluídas em tampão uréia 8 M. Canaleta 1, pH 8; canaletas 2 e 3, pH 6; canaletas 4 a 10, pH 5; canaletas 11 e 12, pH 4; canaleta P, padrão de massa molecular (cada banda corresponde a 1  $\mu$ g de proteína).



**FIGURA 10 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%, corado com coomassie blue, das frações obtidas da purificação do IFN híbrido (rHuIFN- $\beta$ K $\alpha$ ) em coluna de quelato de níquel** Os IFN híbridos e recombinantes construídos foram fracionados em gel de poliacrilamida, após ser adicionado tampão de amostra. As frações foram eluídas em tampão uréia 8 M. Canaleta 1, pH 8; canaletas 2 a 4, pH 6.0; canaletas 5 a 9, pH 5; canaletas 10 a 15, pH 4; canaleta L, lisado de bactérias expressando o rHuIFN- $\beta$ K $\alpha$ , induzidas com IPTG; canaleta P, padrão de massa molecular (2 $\mu$ g de proteína).



**FIGURA 11 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%, corado com coomassie blue, das frações obtidas da purificação do rHuIFN- $\beta$ K em coluna de quelato de níquel.** Os IFN híbridos e recombinantes construídos foram fracionados em gel de poliacrilamida, após ser adicionado tampão de amostra. As frações foram eluídas em tampão uréia 8 M. Canaleta 1, pH 8; canaleta 2, pH 6; canaletas 3 a 7, pH 5; canaletas 8 a 16, pH 4,0; canaleta P, padrão de massa molecular (2 $\mu$ g de proteína).

## 5.6 - ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS INTERFERONS.

As células tratadas com os IFN adquirem a capacidade de resistir à infecção contra diversos vírus. A atividade antiviral dos IFN foi medida em células de macacos (Vero), murinas (L929) e bovinas (MDBK), através da determinação do título dos interferons. A tabela 1 mostra os valores obtidos em atividade específica (unidades de IFN/mg de proteína) e unidades de interferon por ml (U/ml). As unidades representam valores obtidos nas titulações em relação a um padrão interno de uma mesma partida, mantida a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Os rHuIFN- $\alpha_{2b}$ , rHuIFN- $\alpha_k$  mostraram atividade antiviral em células MDBK e nenhum dos interferons utilizados (rHuIFN- $\alpha_{2b}$ , rHuIFN- $\alpha_k$ , rHuIFN- $\beta$  e o rHuIFN- $\beta k\alpha$ ) foi capaz de inibir o crescimento do vírus em células murinas L929.

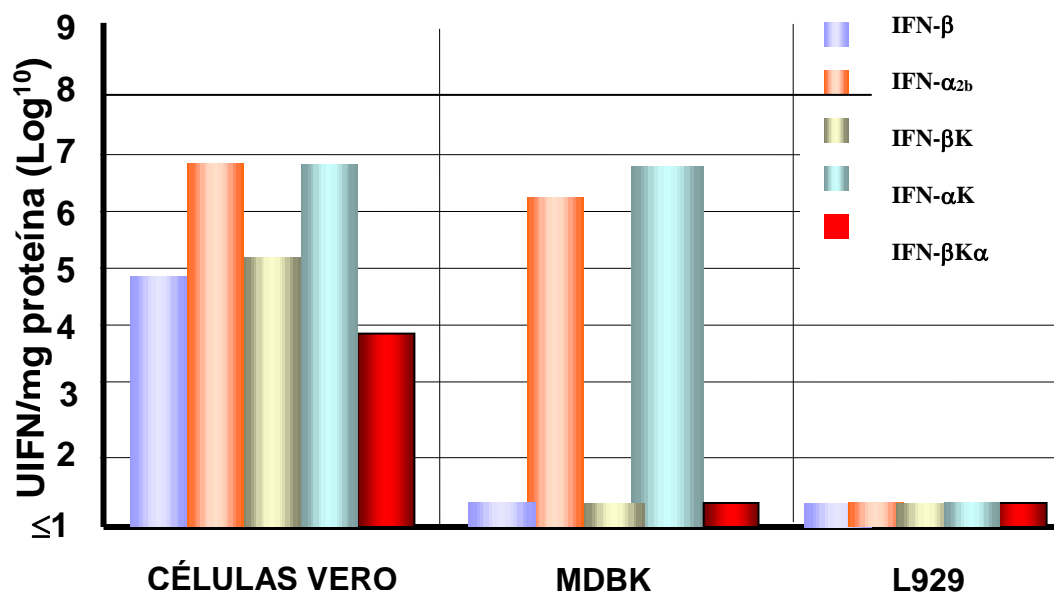
Os rHuIFN- $\beta k$  e rHuIFN- $\beta k\alpha$  não apresentaram atividade antiviral detectável em células L929 e MDBK, porém apresentaram título de  $1,9 \times 10^5$  e  $1,2 \times 10^4$  UIFN/mg em células Vero, respectivamente .

Os títulos dos interferons recombinantes e híbrido e sua espécie especificidade são mostrados na FIG.12. Em células Vero, o rHuIFN- $\beta k\alpha$  apresentou uma AE menor (um log), em relação ao rHuIFN- $\beta$  e ambos não apresentaram atividade antiviral em células MDBK e L929.

O rHuIFN- $\beta k$  apresentou uma AE muito semelhante aquela apresentada pelo rHuIFN- $\beta$  em células Vero, assim como não apresentou título em células MDBK e L929. A atividade específica do rHuIFN- $\alpha_k$  foi semelhante à do rHuIFN- $\alpha_{2b}$  em células Vero, mas em células MDBK, a AE rHuIFN- $\alpha_k$  ( $1,1 \times 10^7$ ), foi maior (um log) que a do rHuIFN- $\alpha_{2b}$  ( $4,6 \times 10^6$ ).

**TABELA 1****Atividade específica (AE) e título dos interferons (U/ml) em várias células**

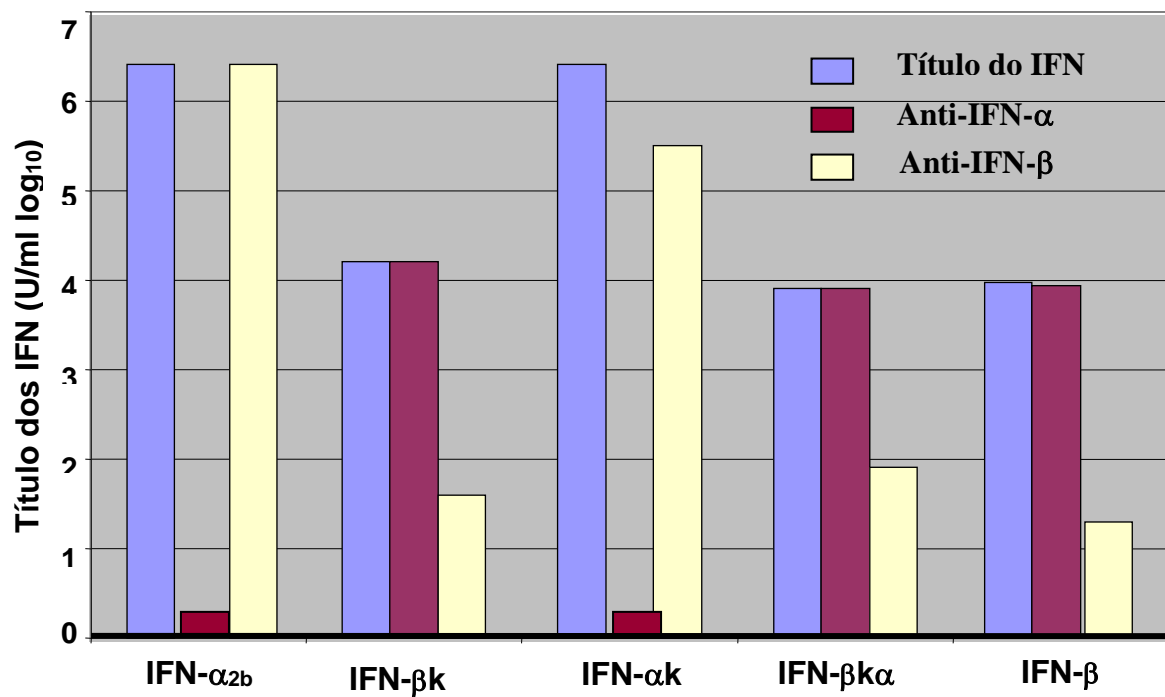
INTERFERONS	VERO		MDBK		L929	
	AE	U/mL	AE	U/mL	AE	U/mL
rHuIFN- $\alpha_{2b}$	$9,3 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$\leq 1$	$< 10$
rHuIFN- $\alpha_k$	$8,6 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$3,2 \times 10^6$	$\leq 1$	$< 10$
rHuIFN- $\beta$	$1,2 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$\leq 1$	$< 10$	$\leq 1$	$< 10$
rHuIFN- $\beta_k$	$1,9 \times 10^5$	$1,6 \times 10^4$	$\leq 1$	$< 10$	$\leq 1$	$< 10$
rHuIFN- $\beta_k\alpha$	$1,2 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	$\leq 1$	$< 10$	$\leq 1$	$< 10$



**FIGURA 12 – Atividade específica dos interferons recombinantes e do híbrido.** As diluições seriadas das diferentes preparações de IFN recombinantes purificados foram incubadas por 24 horas com células Vero e L929 sendo em seguida, desafiadas com vírus EMC (100 TCID<sub>50</sub>) e células MDBK desafiadas com vírus VSV (100 TCID<sub>50</sub>), por 48 horas.

## **5.7 - NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS INTERFERONS RECOMBINANTES E HÍBRIDO.**

A neutralização da atividade antiviral dos IFN recombinantes, pelos anticorpos policlonais antiHuIFN- $\alpha$  e antiHuIFN- $\beta$ , em células Vero infectadas com o vírus EMC, é mostrado na figura 13. A atividade antiviral dos rHuIFN- $\alpha_{2b}$  e rHuIFN- $\alpha_k$  foi neutralizada pelo anticorpo antiHuIFN- $\alpha$ . A atividade do híbrido rHuIFN- $\beta_k\alpha$  foi neutralizada parcialmente com o anticorpo antiHuIFN- $\beta$  assim como os rHuIFN- $\beta_k$  e rHuIFN- $\beta$ .



**FIGURA 13 – Neutralização da atividade antiviral dos interferons recombinantes e do híbrido.** Os IFN recombinantes purificados foram diluídos em série, em placa de microtécnica e incubados a 37°C com anticorpo antiHulIFN- $\alpha$  ou antiHulIFN- $\beta$ , por 1 hora. Após esse intervalo foram adicionados células Vero e vírus EMC e incubados em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C, por 48 h e após esse período, foi titulado o IFN residual.

## **6. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

## 6.1- PRODUÇÃO DOS INTERFERONS

A produção dos rHuIFN utilizados neste trabalho, foi feita em *E. coli* M15 utilizando-se como plasmídio de expressão o pDS<sub>56</sub>. A produção dos rHuIFN- $\alpha_{2b}$ , rHuIFN- $\beta$ , e dos IFN mutagenizados, apresentou grandes variações, sendo que a quantidade de proteínas variou entre níveis de  $\leq 1$  mg/L a 6 mg/L.

A produção de IFN, levando-se em consideração a quantidade de proteína produzida (FIG. 8), indica que os melhores níveis de produção foram alcançados após cinco horas de indução com IPTG. Estes dados assemelham-se aos obtidos por STÜBER *et al.*, 1990, que também descreveu uma grande variação nos níveis de produção de fragmentos do receptor de HuIFN- $\gamma$  pelo pDS<sub>56</sub>.

As culturas de bactérias produtoras do rHuIFN- $\beta K\alpha$ , induzidas com IPTG, expressaram uma quantidade maior da proteína quando induzidas em DO 1,2 (aproximadamente 6 mg/L), comparada com aquelas induzidas com DO 0,7 (aproximadamente 2 mg/L). As culturas de bactérias produtoras do rHuIFN- $\beta K$  não apresentaram variação na produção (aproximadamente 1 mg/L), em função da DO. O HuIFN- $\beta$  é uma proteína extremamente hidrofóbica (MITSUI *et al.*, 1993) e a presença de regiões hidrofóbicas em proteínas recombinantes geralmente tem um efeito tóxico sobre a bactéria hospedeira. Acredita-se que este efeito seja ocasionado pela associação da proteína a sistemas de membranas vitais para a bactéria hospedeira (STÜBER *et al.*, 1990). A alta hidrofobicidade do HuIFN- $\beta$  além de causar um efeito tóxico também é responsável pela dificuldade de purificação e cristalização deste IFN (FRESENIUS *et al.*, 1997). Este autor propôs a mutação de 10 resíduos hidrofóbicos fenilalanina e leucina (expostos nas  $\alpha$ -hélices **D** e **E**) pelo aminoácido serina. Os resultados preliminares mostraram que em três moléculas em que apenas um destes aminoácidos foi trocado, houve aumento da solubilidade e produção do rHuIFN- $\beta$  sem modificação da atividade biológica (FRESENIUS *et al.*, 1997).

Os níveis de produção dos rHuIFN- $\alpha_{2b}$  e rHuIFN- $\alpha K$  foram em média 3 mg/L de cultura. Proteínas de eucariontes são muito pouco expressas em *E. coli*, quando estas contêm seqüências de codons raramente usados pela bactéria, inseridas nos vetores de expressão, também chamada "hungry codon syndrome" (KURLAND e GALLANT, 1996).

## 6.2- PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

O sistema de purificação escolhido foi descrito por HOCHULI *et al.*(1987) e é baseado na cromatografia de afinidade de Ni<sup>2</sup>. Isto permite a obtenção de uma proteína altamente purificada (geralmente >95%) em um só passo de purificação, mesmo em preparações cuja proteína esteja presente em concentrações menores que 1% (JAKNECHT *et al.*, 1991).

O grau de produção dos HulFN foi observado em quantidades iguais ou inferiores a 6 mg/L. A purificação do rHulFN-βK<sub>α</sub> mostrou quantidades superiores em relação aos rHulFN-βK e rHulFN-αK. Estes dados são esperados, uma vez que o grau de purificação das proteínas recombinantes não depende do tipo de proteína, mas principalmente do nível de expressão. Os níveis de purificação maiores que 95% foram possível apenas em proteínas produzidas em quantidades de, pelo menos, 20 mg/L de cultura (STÜBER *et al.*, 1990).

Os rHulFN foram eluídos nos pH 5 e/ou 4 (FIG. 9, 10 e 11) o que impediu que estas frações fossem contaminadas com outras proteínas eluídas no pH 5,5 favorecendo um aumento do grau de purificação das frações eluídas em pH 5. Estes dados estão de acordo com aqueles obtidos no método de purificação descrito por STÜBER (1990), cujas proteínas recombinantes foram eluídas nos pH 5,9 e 4,5, não utilizando, portanto, um gradiente de pH.

Os rHulFN-βK e rHulFN-βK<sub>α</sub>, foram obtidos com maior grau de purificação, quando comparados com o rHulFN-αK. Contudo o grau de purificação ainda não é satisfatório e precisa ser aprimorado. A dificuldade da purificação de proteínas que possuem Cisteínas (HulFN-α<sub>2b</sub> e HulFN-β possuem respectivamente 4 e 3 Cisteínas), já é conhecida e é aconselhável a purificação em presença de 20 mM 2-mercaptoetanol, afim de se evitar a captura de contaminantes via pontes dissulfeto (STÜBER *et al.*, 1990).

O tamanho molecular aparente do rHulFN-β e rHulFN-βk<sub>α</sub>, após purificação, foi estimado em 20kDa, a partir dos dados de mobilidade relativa (Rf) obtidos em SDS-PAGE (FIG. 9, 10 e 11). A diferença observada, em relação ao HulFN-β natural (22 a 23kDa) (VILCEK & SEN, 1996), é devida a sua glicosilação, pois o rHulFN-β, produzido em *E. coli*, apresentou mobilidade similar.

## 6.3 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS

As modificações feitas na estrutura dos controles rHuIFN- $\alpha_{2b}$  e rHuIFN- $\beta$ , assim como no rHuIFN híbrido, modificado em sua alfa hélice **E**, foram testadas em relação a atividade antiviral e espécie especificidade destes interferons. Estes experimentos foram feitos para confirmar a possibilidade do uso de modelagem molecular computacional, em associação com a engenharia genética, como ferramentas fundamentais para os estudos da relação entre estrutura e função. A base para estes estudos foi o fato de que os HuIFN- $\alpha_{2b}$  e HuIFN- $\beta$ , além de possuírem estrutura tridimensional muito semelhante (KARPUSAS *et al.*, 1997; RADHAKRISHNAN *et al.*, 1996; KLAUS *et al.*, 1997) induzem atividades biológicas similares, porém, mostrando diferenças quantitativas e qualitativas quando testados em sistemas homólogos ou heterólogos (MITSUI *et al.*, 1993; WEBER *et al.*, 1987).

### 6.3.1 – ATIVIDADE ANTIVIRAL ESPECÍFICA DOS HUIFN RECOMBINANTES E CONTROLES

A atividade antiviral específica (AE) apresentada pelos rHuIFN- $\alpha_{2b}$  e rHuIFN- $\alpha_K$  (FIG.12), observada nas células Vero, MDBK e L929, foi muito semelhante. Assim, a substituição do aminoácido L128 para R128, porção final da  $\alpha$ -hélice **D** na molécula do rHuIFN- $\alpha_{2b}$ , não determinou nenhuma alteração conformacional da molécula que pudesse interferir na atividade antiviral ou espécie especificidade. A substituição foi necessária para poder ser criado o sítio para a enzima de restrição Kpn I. A AE do rHuIFN- $\alpha_{2b}$  em células Vero e MDBK foi de  $9,3 \times 10^6$  e  $4,6 \times 10^6$ , respectivamente. Em células murinas L929 não foi detectada atividade antiviral. A alta AE do rHuIFN- $\alpha_{2b}$ , tanto em células de macaco como em bovinas e baixa AE em células murinas também, foi descrita por outros autores (PESTKA, 1997a; WEBER *et al.*, 1987).

Extensivos estudos através da mutagênese sítio dirigida dos IFN- $\alpha$ , mostraram que a maioria dos aminoácidos conservados é muito importante na manutenção da plena atividade biológica. Dentre eles os C1, C29, C98 e C138 importantes na formação de pontes S-S e na manutenção da conformação da molécula; os aminoácidos S28 e os R33 e R125 importantes na interação com receptor e na transdução de sinais; os aminoácidos L80, L81, L130, A139 e W140 importantes na formação de hélice (KLAUS *et al.*, 1997). Contudo, alguns resíduos altamente conservados, como o F47, Q48, K49 e Q62, quando substituídos, não alteram a atividade antiviral ou

antiproliferativa (VALENZUELA, 1985). Entretanto, o mesmo prediz que estes aminoácidos conservados podem estar ligados à outro tipo de atividade biológica ainda não conhecida.

A introdução do sítio de Kpn I, no rHuIFN- $\beta$  acarretou a substituição do aminoácido H131, pelo aminoácido R131. Esta modificação não alterou a AE do rHuIFN- $\beta$ K não sendo muito diferente daquela observada para o rHuIFN- $\beta$  em células Vero (FIG 12). A troca do aminoácido histidina (H), pelo aminoácido arginina (R) no último aminoácido da  $\alpha$ -hélice **D** do rHuIFN- $\beta$ , parece não ter alterado a estrutura conformacional da molécula. Embora os dois sejam básicos, o aminoácido histidina é hidrofóbico e a arginina hidrofílico, esta alteração parece não interferir com as interações entre os aminoácidos da molécula e do receptor que interfiram com a atividade, não alterando a espécie especificidade do rHuIFN- $\beta$ K em células MDBK e L929.

O rHuIFN- $\beta$  apresentou AE somente em células Vero, de  $1,2 \times 10^5$ , cerca de 77,5 vezes menor do que a AE observada para o rHuIFN- $\alpha_{2b}$ , nas mesmas células. Em células MDBK e em células L929, o rHuIFN- $\beta$  não apresentou nenhuma atividade antiviral detectável. Esta grande diferença entre a atividade antiviral entre rHuIFN- $\alpha_{2b}$  e rHuIFN- $\beta$  (MITSUI *et al.*, 1993), principalmente em células bovinas (MDBK) e murinas (L929) foi também observada no IFN híbrido construído.

### 6.3.2- ATIVIDADE DO HÍBRIDO (RHUIFN- $\beta$ K $\alpha$ )

O rHuIFN- $\beta$ K $\alpha$ , apresentou em células Vero AE menor quando comparado aos controles do rHuIFN- $\beta$ k (15 vezes) e do rHuIFN- $\alpha$ k (716 vezes), entretanto as diferenças entre os recombinantes não modificados (rHuIFN- $\beta$  e o rHuIFN- $\alpha_{2b}$ ) também é acentuada (Tabela 1). Por outro lado, em células bovinas ou murinas, não houve atividade antiviral detectável, da mesma forma que o observado para o rHuIFN- $\beta$ . Estes dados sugerem que a  $\alpha$ -hélice **E** não tem influência na determinação da espécie especificidade em células MDBK ou L929, assim como na atividade antiviral do rHuIFN- $\beta$ . Estes dados estão em desacordo com os achados RUNKEL *et al.* (2000) que ao substituírem vários aminoácidos, sendo alguns na  $\alpha$ -hélice **E** (V148, R152 e N158) por alanina, descreveram uma diminuição de 5 a 50 vezes na atividade antiviral. A substituição da  $\alpha$ -hélice **E** natural do rHuIFN- $\beta$  pela do rHuIFN- $\alpha_{2b}$  (rHuIFN- $\beta$ K $\alpha$ ) não trouxe maiores conseqüências em termos de título, tendo o rHuIFN- $\beta$  não

modificado apresentado uma atividade um pouco maior (1,2 vezes). Por outro lado quando observado a quantidade obtida após purificação o rHuIFN- $\beta$ K $\alpha$  mostrou maiores quantidades (0,660mg/mL) em comparação com o rHuIFN- $\beta$ k (0,082mg/mL). Estes dados indicam que as alterações processadas, em relação à ligação com o receptor para este IFN, não interferiram significativamente. Além disso, sugerem que os aminoácidos V148 e N158, modificados por RUNKEL *et al.* (2000), não interferem com a atividade biológica do rHuIFN- $\beta$ . Inclusive o V148 foi substituído por A148 na substituição da  $\alpha$ -hélice **E** e o N148 por T148 (Fig. 7)

O motivo da pequena diferença em título observada entre os rHuIFN- $\beta$  e rHuIFN- $\beta$ K $\alpha$  pode ser devida a substituição do T143, aminoácido hidrofóbico, envolvido na estabilização da molécula do rHuIFN- $\beta$  (Karpusas *et al.*, 1997). Por outro lado, considerando a cristalização descrita por Senda *et al.*, (1993), em que a  $\alpha$ -hélice **E** esta compreendida entre os aminoácidos 133 e 155, há uma quebra, pela prolina (P140) na  $\alpha$ -hélice o que ou diminui o tamanho da  $\alpha$ -hélice **E** natural do rHuIFN- $\alpha_{2b}$  ou divide em duas  $\alpha$ -hélices (uma anterior a prolina e outra posterior a prolina). Desta forma, a substituição feita no rHuIFN- $\beta$ K pela  $\alpha$ -hélice **E** do rHuIFN- $\alpha_{2b}$ , apesar de introduzir 10 aminoácidos (**R**YLKEKKY**S**P), que não fazem parte desta estrutura no rHuIFN $\beta$  (Fig 7B), não altera significativamente a sua atividade antiviral.

O fato é que em qualquer circunstância, a proteína produzida não apresentou perda da atividade antiviral, antes pelo contrário o híbrido mostrou um aumento de 1,6 vezes no título, o que pode indicar que a alteração feita melhora a interação com o receptor. Estes dados não são conclusivos, em virtude das variações na titulação que podem chegar a um fator de 2, mas devem ser melhor investigados.

A atividade antiviral do rHuIFN- $\alpha_{2b}$  não pode ser comparada com a do rHuIFN- $\beta$ K, porque a diferença de título em relação ao rHuIFN- $\beta$  é da ordem de 266 vezes. Além disso, a cristalização deste IFN aponta para a sua dimerização (KARPUSAS *et al.*, 1997) através de íons de zinco, possivelmente importantes na interação com o receptor. Entretanto, a diferença da AE em células Vero, sugere que a  $\alpha$ -hélice **E**, pode ter modificado a estrutura conformacional da molécula do rHuIFN- $\alpha_{2b}$  mostrando a importância desta  $\alpha$ -hélice na interação deste IFN ao seu ou seus receptores celulares. Estas modificações por certo alteram a interação entre os aminoácidos das  $\alpha$ -hélices entre si como também destas com o receptor celular.

Estes dados e as considerações feitas, tomados em conjunto, apontam para a interação de unidades de receptores diferentes para os HuIFN- $\beta$  e HuIFN- $\alpha_{2b}$ . A interação destes interferons com um único receptor, ou mesmo o uso de sub-unidades ou cadeias (UZÉ *et al.*, 1995), para os dois IFN é, atualmente, insustentável, tendo em vista que a dimerização da molécula do HuIFN- $\beta$  ocorre pelo contato de superfícies opostas, enquanto a do HuIFN- $\alpha_{2b}$  acontece no mesmo lado (KARPUSAS *et al.* 1997).

Experimentos com moléculas híbridas entre os HuIFN- $\alpha_2$  e HuIFN- $\alpha_1$  (REHBERG *et al.*, 1982; STREULI *et al.*, 1981; SEN *et al.*, 1984; WEBER *et al.*, 1987) ou entre os HuIFN- $\alpha_8$  e HuIFN- $\alpha_1$  (MEISTER *et al.*, 1986) demonstraram que a região N-terminal (aa 1-63/ $\alpha$ -hélice **A**, alça *ab* e região N-terminal da  $\alpha$ -hélice **B**) do HuIFN- $\alpha_2$  ou HuIFN- $\alpha_8$  respectivamente são essenciais na manutenção da alta atividade antiviral em células humanas. Outro estudo utilizando moléculas híbridas entre os HuIFN- $\alpha_7$  e o IFN bovino  $\alpha_C$  (BoIFN- $\alpha_C$ ) demonstrou que a região C-terminal da  $\alpha$ -hélice **A** e a alça *ab* do HuIFN- $\alpha_7$  (aa 10-44) são responsáveis pela alta atividade deste IFN em células humanas. Entretanto, em nenhum destes estudos foi possível a determinação das estruturas importantes na espécie-especificidade dos IFN- $\alpha$  em células bovinas porque todos os IFN alfas humanos apresentam atividades biológicas iguais nestas células. Em nosso trabalho, com a utilização da molécula híbrida rHuIFN- $\beta K\alpha$ , foi possível avaliar que a  $\alpha$ -hélice *E* não está relacionada com espécie especificidade da molécula. Experimentos com moléculas híbridas entre os HuIFN- $\alpha_8$  e HuIFN- $\alpha_1$  (MEISTER *et al.*, 1986), entre os HuIFN- $\alpha_2$  e HuIFN- $\alpha_1$  (WEBER *et al.*, 1987) descreveram um segundo sítio localizado na região central da molécula do IFN (C-terminal  $\alpha$ -hélice **B** e  $\alpha$ -hélice **C**) importante no aumento da atividade antiviral, porém, em células humanas.

#### 6.4 - NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL

A neutralização da atividade antiviral dos rHuIFN- $\alpha_K$  e do rHuIFN- $\alpha_{2b}$  pelo anticorpo antiHuIFN- $\alpha$  mostram que a substituição do L131 por R131 não alterou a localização do epítipo ou epítipos reconhecidos por estes anticorpos policlonais, já descritos. A neutralização parcial da atividade antiviral dos rHuIFN- $\beta K\alpha$ , rHuIFN- $\beta K$  e rHuIFN- $\beta$  pelo anticorpo antiHuIFN- $\beta$ , pode ter ocorrido por causa de uma menor quantidade de anticorpos em relação à quantidade de IFN na reação.

A maioria dos epítipos imunodominantes dos HuIFN- $\alpha$ , como demonstrado por

diversos estudos, estão localizados em três regiões hidrofílicas,  $\alpha$ -hélice **A**, a alça *ab* e a alça *cd*/ $\alpha$ -hélice **D/E**. No entanto, a grande maioria dos anticorpos monoclonais estudados se ligam à epitopos localizados na região da alça *cd*/ $\alpha$ -hélice **D** e **E** (HORISBERGER e DIMARCO, 1995; KONTSEK, 1994). A maior parte destes anticorpos inibe a atividade antiviral e antiproliferativa dos IFN- $\alpha$ , o que pode ser devido a modificações na conformação da molécula após a interação com o anticorpo, prejudicando de alguma forma a ligação do IFN ao receptor (HORISBERGER *et al.*, 1995)

Diferente dos HuIFN- $\alpha$ , poucos estudos de localização de epitopos foram realizados com o HuIFN- $\beta$ . REDLICH *et al.* (1991) utilizando um painel de anticorpos monoclonais anti-HuIFN- $\beta$ S (HuIFN- $\beta$  onde foi trocada a C17 por S), testaram a imunoreatividade destes anticorpos (em ensaio imuno-enzimático, ELISA) contra 159 octapeptídeos. Estes octapeptídeos eram representativos de toda a seqüência do HuIFN- $\beta$ . Foram identificados por esta técnica, três anticorpos denominados A1, A5 e A7 que se ligam à epitopos localizados na região dos aminoácidos 39-56 (alça *ab*<sub>3</sub> e parte **N**-terminal da  $\alpha$ -hélice **B**). Estes anticorpos foram responsáveis pela neutralização da atividade antiviral e antiproliferativa do HuIFN- $\beta$ S. Segundo REDLICH *et al.*, (1991), esta região é importante na manutenção das atividades biológicas do HuIFN- $\beta$ .

Uma localização mais precisa dos epitopos da molécula deveria ser feita através do uso de moléculas híbridas entre os rHuIFN- $\beta$  e rHuIFN- $\alpha$ , em que as estruturas  $\alpha$ -hélices **B** e **C** ou as alças *bc* e *cd* fossem substituídas entre os dois interferons. Dentre estas estruturas, já foi demonstrado que a alça *cd* é imunodominante (LYDON *et al.*, 1985)

## **7. RESUMO**

Os interferons (IFN) são proteínas envolvidas em processos de defesa do organismo derivadas da resposta celular a microorganismos, tumores e antígenos e são classificados em tipo I, compreendendo os IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\tau$ , IFN- $\omega$ , e IFN do tipo II em que o IFN- $\gamma$  é o único membro. Estas proteínas uma vez produzidas interagem com receptores específicos das células, ativando sinais citoplasmáticos que, por sua vez, são dirigidos ao núcleo para estimularem genes que codificam proteínas responsáveis pelos mecanismos de defesa celular. Os receptores da superfície celular descritos são de dois tipos: um receptor que interage com os IFN tipo I e um segundo que reage com IFN- $\gamma$ . Apesar do avanço alcançado na elucidação ou compreensão dessas interações, entre os interferons tipo I com seu ou seus receptores, estes mecanismos não foram ainda satisfatoriamente esclarecidos.

Estudos com HuIFN- $\alpha$  mostram significativas mudanças na sua atividade quando seus aminoácidos são modificados ou retirados, o que pode causar uma diminuição substancial na atividade e ligação ao seu receptor, como demonstrado em células bovinas. Neste trabalho foi utilizada como estratégia a introdução de sítios de restrição entre 5  $\alpha$ -hélices dos IFN, de modo a substituir a  $\alpha$ -hélice E, cuja participação tem sido sugerida em funções biológicas da molécula entre os interferons tipo I. Desta forma, a estrutura básica funcional do rHuIFN- $\beta$  e do rHuIFN- $\alpha$  seriam mantidas permitindo o estudo do papel da  $\alpha$ -hélice E nas diferentes atividades biológicas destes IFN, particularmente na sua espécie especificidade.

As construções mostraram diferenças na purificação da proteína, sendo os níveis obtidos dos rHuIFN- $\alpha_{2b}$  e rHuIFN- $\alpha_K$ , em média da ordem de 3mg/L de cultura, não havendo portanto diferença entre o natural e o modificado, sendo o mesmo observado para os HuIFN- $\beta$  e o rHuIFN- $\beta_K$ . Entretanto, no HuIFN- $\beta_k$  foi menor a quantidade obtida após purificação (1mg/L) do que a do rHuIFN- $\beta_K\alpha$  (6 mg/L). Isto provavelmente foi devido a substituição dos aminoácidos da  $\alpha$ -hélice E do rHuIFN- $\beta_K\alpha$  pelos do rHuIFN- $\alpha_{2b}$ , cuja molécula é menos hidrofóbica.

As modificações feitas na estrutura do rHuIFN- $\alpha_K$  não mostraram alterações na atividade antiviral ou espécie especificidade em células Vero, MDBK e L929, quando comparadas àquela dos rHuIFN- $\alpha_{2b}$ . Da mesma forma a introdução do sítio de Kpn I, no rHuIFN- $\beta$ , que acarretou a substituição do aminoácido H131 pelo R131, não alterou a AE do rHuIFN- $\beta_K$  não sendo muito diferente daquela observada para o rHuIFN- $\beta$  em células Vero. O rHuIFN- $\beta_K\alpha$ , apresentou AE menor em células Vero, quando

comparado aos controles do rHuIFN- $\beta$ k (15 vezes) e do rHuIFN- $\alpha$ k (716 vezes), o que também foi observado entre os controles (rHuIFN- $\beta$  e o rHuIFN- $\alpha_{2b}$ ).

Em células bovinas ou murinas, não houve atividade antiviral detectável, da mesma forma que o observado para o rHuIFN- $\beta$ . Estes dados sugerem que a  $\alpha$ -hélice **E** não tem influência na determinação da espécie especificidade em células MDBK ou L929, mas é importante na atividade antiviral do rHuIFN- $\beta$ . Estes dados sugerem que a região da  $\alpha$ -hélice necessária é determinada pela seqüência dos últimos 18 aminoácidos de um total de 26 da  $\alpha$ -hélice natural. Isto é sugerido devido a quebra da estrutura da  $\alpha$ -hélice pela prolina, presente na seqüência de aminoácidos da do rHuIFN- $\alpha_2$  adicionados. Neste caso o tamanho da  $\alpha$ -hélice **E** do rHuIFN- $\beta$  estaria diminuída, se comparada com a natural, ou dividida em duas  $\alpha$ -hélices (uma anterior e outra posterior a prolina). Estas modificações por certo alteram a interação entre os aminoácidos das  $\alpha$ -hélices entre si como também destas com o receptor celular. Assim, quando comparamos o título do rHuIFN- $\beta$ k com o do rHuIFN- $\beta$ , há um aumento de 1,6 vezes, o que pode indicar que a alteração feita melhora a interação com o receptor. Estes dados não são conclusivos, mas devem ser mais investigados. Ainda assim, nos sugerem que a interação dos interferons com um único receptor, ou mesmo o uso de sub-unidades ou cadeias iguais para os dois IFN é insustentável. É possível que a interação destes interferons ocorra com uma ou duas cadeias, como já descrito, mas seguramente ou a interação com o receptor ocorre diferentemente para cada um deles ou deve existir uma 3 cadeias que possa distingüi-los e por conseguinte os IFN exercem as suas diferentes atividades biológicas

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMOVITCH, C., SHULMAN, L., RATOVISK, E., HARROCH, S., TOVEY, M., EID, P., REVEL Differential tyrosine phosphorylation of the IFNAR chain of the type I interferon receptor and of an associated surface protein in response to IFN-alpha and IFN-beta . *EMBO J*, v13, p 5871-5877, 1995.
- ABOAGYE-MATHIESEN, G., TÓTH, E. D., JUHL, C. B., NORSKOV-LAURITSEN, N. N., PETERSEN, P. M., EBBESEN, P. Purification and initial characterization of human placental interferon induced by poly riboinosinic poly ribocytidylic acid. *J.Gen. Virol.*, v. 71, p. 3061-3066, 1990.
- ADOLF, G. R. Antigenic structure of human interferon w1 (interferon  $\alpha$ II): comparison with other human interferons. *J. Gen. Virol.*, v. 68, p. 1669-1676, 1987.
- ADOLF, G. R., FRÜHBEIS, B., HAUPTMANN, R., KALSNER, I., MAURER-FOGY, I., OSTERMANN, E., PATZELT, E., SCHWENDENWEIN, R., SOMMERGRUBER, W., SÖPHEL, A. Human interferon w1: isolation of the gene, expression in chinese hamster ovary cells and characterization of the recombinant protein. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 1089, p. 167-174, 1991.
- AGUET, M. High-affinity binding of  $^{125}$ I-labelled mouse interferon to a specific cell surface receptor. *Nature.*, v 284, p 459-461, 1980.
- BAZAN, J. F. Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today*, v. 11, p. 350-354, 1990a.
- BAZAN, J. F. Shared architecture of hormone binding domains in type I and II interferon receptors. *Cell*, v. 61, p. 753-754, 1990b.
- BEWLEY, T. A., LEVINE, H. L., WETZEL, R. Structural features of human leukocyte interferon  $\alpha$  as determined by circular dichroism spectroscopy. *Int. J. Peptide Protein Res.*, v. 20, p. 93-96, 1982.
- BIRNBOIM, P., DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, v. 7, p. 1513, 1979.
- BOUBLIK, M., MOSCHERA, J. A., WEI, C., KUNG, H. Conformation and activity of recombinant human fibroblast interferon- $\beta$ . *J. Interferon Res.*, v. 10, p. 213-219, 1990.
- BRANCA, A. A., BAGLIONI, C. Evidence that types I and II interferons have different receptors. *Nature*, v. 294, p. 459-461, 1981.
- CAPON, D. J., SHEPARD, H. M., GOEDDEL, D. V. Two distinct forms of human and bovine interferon  $\alpha$  genes coordinately expressed and encode functional polypeptides. *Mol. Cell. Biol.*, v. 5, p. 768-779, 1985.

- CARVALHO, A. F. Interferons humanos recombinantes e híbridos  $\beta$  e  $\alpha_{2b}$ : relação entre estrutura e função. (Tese de Doutorado), 1998.
- CLEARY, C.M., DONNELLY, R.J., SOH, J., MARIANO, T.M., PESTKA, S.- Knockout and reconstitution of a functional human type I interferon receptor complex. *J. Biol. Chem.* v. 269; p. 18747-18749, 1994.
- COHEN, B., NOVICK, D., BARAK, S., RUBINSTEIN, M. Ligand-induced association of the type I interferon receptor components. *Moll. Cell. Biol.*, v 15, p 4208-4214, 1995.
- COOK, J., JUNG, V., SCHWARTZ, B. Structural analysis of the human interferon gamma receptor: A small segment of the intracellular domain is specifically required for class I major histocompatibility complex antigen induction and antiviral activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 89, p. 11317-11321, 1992.
- COOK, J. R., CLEARY, C. M., MARIANO, T. M., IZOTOVA, L., PESTKA, S. Differential Responsiveness of a Splice Variant of the Human Type I Interferon Receptor to Interferons. *J. Biol. Chem.* V 271, p 13448-13453, 1996.
- CROSS, J.C., ROBERTS, R.M. - Constitutive and trophoblastic-specific expression of a class of bovine interferon genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88; p. 3817, 1991.
- CUTRONE, E. C., LANGER, J. A. Contributions of cloned type I interferon receptor subunits to differential ligand binding. *FEBS Lett.* V 404 (2-3), p 197-202, 1997.
- DIANZANI, F. Biological basis for therapy and for side effects. in: S. BARON (ed.). *Interferon, principles and medical applications.*, Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston., p. 409-425, 1992.
- DOMANSKY, P., NADEAU, O. W., PLATANIAS, L. C., FISH, E., KELLUM, M., PITHA, P., COLAMONICI, O. R. Differential use of the  $b_L$  subunit of the type I interferon (IFN) receptor determines signaling specificity for IFN $\alpha_2$  and IFN $\beta$ . *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 3144-3147, 1998.
- DOMANSKY, P., COLAMONICI, O. R. The type-I interferon receptor. The long and short of it. *Cytokine e Growth factors reviews.*, v. 7, p. 143-151, 1996.
- DOMANSKY, P., WITTE, M., KELLUM, M. Cloning and expression of a long form of the b subunit of the interferon  $\alpha$  receptor that is required for the interferon signaling. *J. Biol. Chem.*, v. 270, p. 21606-21611, 1995.
- DRON, M., TOVEY, M.G. - Interferon alpha/beta gene structure and regulation, In: BARON, S. (Ed.) 1ª Ed. Galveston, The interferon, principles and medical applications. University of Texas Medical Branch at Galveston, 1992.
- DUBE, S., FLYNN, E. Estimating protein molecular weight using SDS-PAGE. *Focus*, v. 20, p. 24-25, 1998.

- FERREIRA, P.C.P., PEIXOTO, M.L.P., SILVA, M.<sup>a</sup>N., GOLGHER, R.R. - Assay of human interferons in Vero Cells by several methods. *J. Clinn. Microbiol.*, v. 9; p. 471-475,1979.
- FLORES, I., MARIANO, T. M., PESTKA, S. Hufman interferon omega binds to the a/b receptor. *J. Biol. Chem.*, v. 266, p. 19875-19877, 1991.
- FRESENIUS, C. S., MEYER, T., WASCHUTZA, G., OTTO, B. Hydrofobic engineering of human interferon-b. *J. IFN and Cytokine Res.*, v. 17, p. S110, 1997.
- HENCO, K., BROSIUS, F.J., FUJISAWA, A ., FUJISAWA, J.I., HAYNES, J.R., HOSCHSTADT, J., KOVACIC, T., PASEK, M. - Structural relantioship of human interferon alpha genes and pseudogenes. *J. Mol. Biol.*, v. 185; p. 227,1985.
- HOCHULI, E., DÖBELI, H., SCHACHER, A. New metal chelate adsorbents selective for proteins and peptide containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatography*, v. 411, p. 177-184, 1987.
- HORISBERGER, M. A., DIMARCO, S. Interferon-alpha hybrids. *Pharmac. Ther.*, v. 66, p. 507-534, 1995.
- IMAKAWA, K., ANTHONY, R. V., KAZEMI, M., MAROTTI, H., POLITES, H. G., ROBERTS, R. M. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophoctoderm. *Nature*, v. 330, p. 377-379, 1987.
- INNIS, M. A., GELFANO, D. H. Optimization of PCRs. in: M. A. INNIS, D. H. GELFANO, J. J. SNISNSKY, T. J. WHITE (ed.). *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. New York: Academic Press,. p. 3-12, 1990
- JAKNECHT, R., DE MARTYNOFF, G., LOU, J., HIPSKIND, R. A., NORDHEIM, A., STUNNENBERG, H. G. Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Acad. Sci. USA*, v. 88, p. 8972-8976, 1991.
- JOKLIK, W.K. - Interferons. In: FIELDS, B.N., KNIPE, D.M. (Ed.). *Virology*, 2<sup>a</sup> Ed. - New York, Raven Press Ltd. Cap. 16, p. 383-410, 1990.
- KAGAWA, Y., TAKASAKIS, S., UTSUMI, J., HOSOI, K., SHIMIZU, H., KOCHIB, N., KOBATA, A - Comparative study of the asparagin linked sugar chains of natural human interferon beta1 and recombinant human interferon beta, produced by three different mammalian cells. *J. Biol. Chem*, v. 263; p. 17508-17513,1988.
- KARPUSAS, M., NOLTE, M., BENTON, C. B., MEIER, W., LIPSCOMB, W. N., GOELZ, S. The crystal structure of human interferon  $\beta$  at 2.2 Å resolution. *Proc. Acad. Sci. USA*, v. 94, p. 11813-11818, 1997.
- KLAUS, W., GSELL, B., LABHARDT, A. M., WIPF, B., SENN, H. The three-

- dimensional high resolution structure of human interferon  $\alpha$ -2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution. *J. Mol. Biol.*, v. 274, p. 661-675, 1997.
- KONTSEK, P. Human type I Interferons: Structure and function. *Acta Virologica*, v. 38, p. 345-360, 1994.
- KOTENKO, S. V., IZOTOVA, L. S., POLLACK, B. P. Interactions between the interferon gamma receptors. *J. Biol. Chem.*, v. 270, p. 20915-20921, 1995.
- KURLAND, C., GALLANT, J. Errors of heterologous protein expression. *Current Opinion in Biotechnology.*, v. 7, p. 489-493, 1996.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEWERENZ, M., MOGENSEN, K. E., UZÉ, G. Shared receptor components but distinct complexes for alpha and beta interferons. *J. Mol. Biol.*, v. 282, p. 585-599, 1998.
- LI, J., ROBERTS, R. M. Interferon- $\tau$  and interferon- $\alpha$  interact with the same receptors in bovine endometrium. Use of a readily iodinated form of recombinant interferon- $\tau$  for binding studies. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 13544-13550, 1994.
- LIM, J. K., XIONG, J., CARRASCO, N., LANGER, J. A. Intrinsic ligand binding properties of the human and bovine alpha Interferon receptors. *FEBS Lett.*, v. 350, p. 281-286, 1994.
- LUTFALLA, G., HOLLAND, S. J., CINATO, E. Mutant U5A cells are complemented by an interferon  $\alpha\beta$  receptor subunit generated by alternative processing a new member of a cytokine gene cluster. *EMBO J.*, v. 14, p. 51000-51008, 1995.
- LYDON, N. B., FAVRE, C., BOVE, S., NEGRET, O., BENUREAU, S., LEVINE, A. M., SEELIG, G. F., NAGABHUSHAN, L., TROTTA, P. P. Immunochemical mapping of  $\alpha$ -2 interferon. *Biochemistry*, v. 24, p. 4134-4141, 1985.
- MALEY, F., GUARINO, D. U. Differential binding of sodium dodecyl sulfate to amino acids as evidenced by elution from sephadex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 77, p. 1425-1430, 1977.
- MANAVALAN, P., JOHNSON Jr., W. C., JOHNSTON, P. D. Prediction structure type for human leukocyte interferon subtype A from circular dichroism. *FEBS LETTERS*, v. 175, p. 227-230, 1984.
- MARIANO, T. M., DONNELLY, R. J., SOH, J., PESTKA, S. Structure and function of the type I interferon receptor. in: S. BARON (ed.). *Interferon, principles and medical applications.*, Galveston: The University of Texas Medical branch at Galveston., p. 130-138, 1992.

- MATAGNE, A., B., J., M., F. J. Anomalous behaviour of a protein during SDS/PAGE corrected by chemical modification of carboxylic groups. *Biochem. J.*, v. 280, p. 553-556, 1991
- MEISTER, A., UZÉ, G., MOGENSEN, K., GRESSER, I., TOVEY, M., GRÜTTER, M., MEYER, F. Biological activities and receptor binding of two human recombinant interferons and their hybrids. *J.Gen. Virol.*, v. 67, p. 1633-1643, 1986.
- MIERTUS, S., TOMASI, J., MAZZANTI, E. F., CHIELLINI, E. E., SOLARO, R., CHIELLINI, E. Modelling of the 3-D structure of IFN alpha K and characterization of its surface molecular properties. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 20, p. 85-95, 1997.
- MITSUI, Y., SENDA, T., SHIMAZU, T., MATSUDA, S., UTSUMI, J. Structural, functional and evolutionary implications of the three-dimensional crystal structure of murine interferon- $\beta$ . *Pharmac. Ther.*, v. 58, p. 93-132, 1993.
- MOGENSEN, K.E., LEWERENZ, M., REBOUL, J., LUTFALLA, G., UZÉ, G. The Type I Interferon Receptor: Structure, Function, and Evolution of a Family Business. *J. Interferon Cytokine Res.*, v 19, p 1069-1098, 1999.
- MOUCHEL-VIELH, E., LUTFALLA, G., MOGENSEN, K. E., UZE, G. Specific antiviral activities of the human alpha interferons are determined at level of receptor (IFNAR) structure. *FEBS Lett.*, v. 313, p. 255-259, 1992.
- MURGOLO, N. J., WINDSOR, W. T., HRUZA, A., REICHERT, P., TSARBOPOULOS, A., BALDWIN, S., HUANG, E., PRAMANIK, B., EALICK, S., TROTТА, P. P. A homology model of human interferon alpha-2. *Proteins*, v. 17, p. 62-74, 1993.
- NOVICK, D., COHEN, B., RUBINSTEIN, M. Soluble interferon- $\alpha$  receptor molecules are present in body fluids. *FEBS*, v. 314, p. 445-448, 1992.
- NOVICK, D., COHEN, B., RUBINSTEIN, M. The human interferon  $\alpha/\beta$  receptor: characterization and molecular cloning. *Cell*, v. 77, p. 391-400, 1994.
- OCA, H. M. The trypsin Beta. High yield method for kidney tissue. in: *Tissue culture, methods and applications*. New York: Academic Press, p. 8-12, 1973.
- PESTKA, S. The human interferon alpha species and hybrid proteins. *Seminars in Oncology*, v. 24, (suppl. 9), p. s9-4 29-17, 1997a.
- PESTKA, S. The interferon receptors. *Seminars in Oncology*, v. 24, (19), p. S9-18 S19-40, 1997b.
- PESTKA, S., LANGER, J. A., ZOON, K. C., SAMUEL, C. E. Interferons and their actions. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 56, p. 727-777, 1987.
- PIEHLER, J., SCHREIBER, G. Biophysical analysis of the interaction of human ifnr2 expressed in *E. Coli* whit IFN- $\alpha$ 2. *J. Mol. Biol.*, v 289, p 57-67, 1999.
- PITT-RIVERS, R., IMPIOMBATO, F. S. A. The binding of sodium dodecyl sulphate to

- various proteins. *Biochem. J.*, v. 109, p. 825-830, 1968.
- RADHAKRISHNAN, R., WALTER, L. J., HRUZA, A., REICHERT, P., TROTTA, P. P., NAGABHUSHAN, T. L., WALTER, M. R. Zinc mediated dimer of human interferon  $\alpha_{2b}$  revealed by X-ray crystallography. *Structure*, v. 4, p. 1453-1463, 1996.
- REDLICH, P.N., HOEPRICH, P.D., Jr., COLBY, C.B., GROSSBERG, S.E. - Antibodies that neutralize human beta interferon biologic activity recognize a linear epitope: Analysis by synthetic peptide mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88; p. 4040-4044, 1991.
- REHBERG, E., KELDER, B., HOAL, E. G., PESTKA, S. Specific molecular activities of recombinant and hybrid leukocyte interferons. *J. Biol. Chem.*, v. 257, p. 11497-11502, 1982.
- ROBERTS, R. M., FARIN, C. E., CROSS, J. C. Trophoblast proteins and maternal recognition of pregnancy. in: S. R. MILLIGAN (ed.). *Oxford reviews of reproductive biology*. Oxford: Oxford Univ. Press, v. 12, p. 147-180, 1990.
- ROZWARSKI, D. A., GRONENBORN, A. M., CLORE, G. M., BAZAN, J. F., BOHM, A., WLODAWER, A., HATADA, M., KARPLUS, P. A. Structural comparisons among the short-chain helical cytokines. *Structure*, v. 2, p. 159-173, 1994.
- RUNKEL, L., DEDIOS, C., KARPUSAS, M., BETZENHAUSER, M., MULDOWNNEY, C., AFARI, M., BENJAMIN, C. D., MILLER, S., HOCHMAN, P. S., WHITTY, A. Systematic mutational mapping of sites on human interferon- $\beta$ -1a that are important for receptor binding and functional activity. *Biochemistry*, v 39, p 2538-2551, 2000.
- RUNKEL, L., PFEFFER, L., LEWERENZ, M., MONNERON, D., YANG, C., MURTI, A., PELLEGRINI, S., GOELZ, S., UZÉ, G., MOGENSEN, K. Differences in Activity between  $\alpha$  and  $\beta$  Type I Interferons Explored by Mutational Analysis *J. Biol. Chem.* V 273(14), p 8003-8008, 1998.
- RUSSEL-HARDE., WAGNER, D., PEREZ, T. C., CROZE, H. D. Formation of a uniquely stable type I interferon receptor complex by interferon- $\beta$  dependent upon particular interactions between IFN- $\beta$  and independent of tyrosine phosphorylation. *Biochem. Res. Commun.* V 255, p 539-544, 1999.
- RYAN, A. M., GALLAGHER, D. M., WOMACK, J. E. Systemic mapping and chromosomal localization of bovine alpha and beta interferon genes. *Mammalian Genome.*, v. 3, p. 575-578, 1992.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. - Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 74, p. 5463, 1977.

- SCHMID, X. F. Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. in: T. E. CREIGHTON (ed.). *Protein structure, a practical approach*. Oxford.: IRL Press., p. 251-285, 1990.
- SEN, G. S., HERTZ, R., DAVATELIS, V., PESTKA, S. J. Antiviral and protein-inducing activities of recombinant human leukocyte interferons and their hybrids. *Viol.*, v. 50, p. 445-450, 1984.
- SENDA, T., SHIMAZU, T., MATSUDA, S., KAWANO, G., SHIMIZU, H., NAKAMURA, K.T., MITSUI, Y. - Tree-dimensional crystal structure of recombinant murine interferon beta. *Embo J.*, v. 11; p. 3193-3201, n.9, 1992.
- SENDA, T., SAITOH, S., MITSUI, Y. Refined crystal structure of recombinant murine interferon- $\beta$  at 2.15Å resolution. *Journal. of Molecular Biology*, v. 253, p. 187-207, 1995a.
- SENDA, T., SAITOH, S., MITSUI, Y., LI, J., ROBERTS, R. M. A three-dimensional model of interferon-tau. *J Interferon Cytokine Res.*, v. 15, p. 1053-1060, 1995b.
- SOH, J., DONNELLY, R. J., KOTENKO, S. Identification and sequence of an accessory factor required for activation of the human interferon- $\gamma$  receptor. *Cell*, v. 76, p. 793-802, 1994.
- SPRANG, S., BAZAN, J. F. Cytoquine structural taxonomy and mechanisms of receptor engagement. *Curr. Opin. In Struc. Biol.*, v. 3, p. 815-817, 1993.
- STREULI, M., HALL, A., BOLL, W., STEWART, W. E., NAGATA, S., WEISSMANN, C. Target-cell specificity of two species of human interferon- $\alpha$  produced in *E. coli* and of hybrid molecules derived from them. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 78, p. 2848-2852, 1981.
- STÜBER, D., MATILE, H., GAROTTA, G. System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure function analysis. *Immunological Methods*, v. IV, p. 121-152, 1990.
- TANIGUCHI, T., FUJI-KURIYAMA, Y., MURAMATSU, M. Molecular cloning of human interferon cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 77, p. 4003-4006, 1980a.
- TÓTH, F. D., LAURITSEN, N. N., JUHL, C. B., ABOAGYE-MATHIESEN, G., EBBESEN, P. Interferon production by cultured human trophoblasts and choriocarcinoma cell lines induced by Sendai virus. *J. Gen. Virol.*, v. 71, p. 3067-3069, 1990.
- TUNG, J.-S., KNIGHT, C. A. Relative importance of some factors affecting the electrophoretic migration of protein in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v. 48, p. 153-163, 1972.

- UTSUMI, J., YAMAZAKI, S., HOSOI, K., KIMURA, S., HANADA, K., SHIMAZU, T., SHIMIZU, H. Characterization of *E. coli* derived recombinant human interferon- $\beta$  as compared with fibroblast human interferon- $\beta$ . *J. Biochem.*, v. 101, p. 1199-1208, 1987.
- UTSUMI, J., SHIMIZU, H. Human interferon  $\beta$ , protein structure and function. in: S. BARON (ed.). *Interferon, principles and medical applications*. Galveston.: The University of Texas branch of Galveston. p. 107-116 , 1992
- UZÉ, G., LUTFALLA, G., GRESSER, I. - Genetic transfer of a functional human Interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA. *Cell*; v. 60; p. 252-234,1990.
- UZÉ, G., DIMARCO, S., MOUCHEL-VIELH, E., MONNERON, D., BANDU, M.T., HORISBERGER, M.A., DORQUES,A., LUTFALLA, G. & MOGENSEN, K.E. - Domains of interaction between alpha and its receptor components. *J. Mol. Biol.* v. 243; p. 245-257,1994.
- UZÉ, G., LUTFALLA, G., MOGENSEN, K. E. a and b interferons and their receptors and their friends and relations. *J. IFN and Cytokine Res.*, v. 15, p. 3-26, 1995.
- VALENZUELA, D., WEBER, H., WEISSMANN, C. Is sequence conservation in interferons due to selection for functional proteins? *Nature*, v. 313, p. 698-700, 1985.
- VILCEK, J., SEN, GC. - Interferons and Others Citokines. In: Fields Virology. B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley *et al* eds (Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia),1996.
- WALTER, M. R., NAGABHUSHAN, T. L. Cristal structure of interleukin 10 reveals an interferon like gamma-like fold. *Biochemistry*, v. 34, p. 12118-12125, 1995.
- WALTER, M. R. Three-dimensional models of interferon- $\alpha$  subtypes IFN-con1, IFN- $\alpha_8$ , and  $\alpha_1$  derived from the crystal structure of IFN- $\alpha_{2b}$ . *Seminars in Oncology*, v. 24, (9), p. S9-52-S9-62, 1997.
- WEBER, H., VALENZUELA, D., LUJBER, G., GUBLER, M., WEISSMANN, C. Single amino acid changes that render human IFN- $\alpha_2$  biologically active on mouse cells. *EMBO J.*, v. 6, p. 591-598, 1987.
- WEISSMAN, C & WEBER, H. The interferons genes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* V.33, p. 521-530, 1986.
- WETZEL, C.S., PERRY, L.J., ESTELL, D.A., LIN, N., LEVINE, H.L., SLINKER, B., FIELDS, F., ROSS, M.J., SHIVELY, J. - Properties of a himan interferon alpha purified from *E. coli* extracts. *J. Interferon Res*, v.1; p. 381, 1981.

ZOON, K.C., BEKISZ, J., MILLER, D. - Human interferon alpha family: protein structure and function. In: BARON, S. (Ed.) Interferon, Principles and Medical Applications 1<sup>a</sup> Ed. Galveston, The University of Texas Medical Branch at Galveston. p.130-138,1992.