
PATRÍCIA NOGUEIRA DA GAMA E SILVA

TESE DE DOUTORADO

**SIGNIFICADO FUNCIONAL DO GENE DE
RESPOSTA PRECOCE AO CRESCIMENTO
- EGR-1 - PARA A BIOLOGIA DO
ORTHOPOXVÍRUS VACCINIA**

**LABORATÓRIO DE VÍRUS
GRUPO DE TRANSDUÇÃO DE SINAL
BELO HORIZONTE, FEVEREIRO DE 2005**

PATRÍCIA NOGUEIRA DA GAMA E SILVA

TESE DE DOUTORADO

**SIGNIFICADO FUNCIONAL DO GENE DE
RESPOSTA PRECOCE AO CRESCIMENTO
- EGR-1 - PARA A BIOLOGIA DO
ORTHOPOXVÍRUS VACCINIA**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Microbiologia

ORIENTADOR: Prof. CLÁUDIO ANTÔNIO BONJARDIM

DEPTO DE MICROBIOLOGIA – ICB/UFMG
LABORATÓRIO DE VÍRUS - GRUPO DE TRANSDUÇÃO DE SINAL
BELO HORIZONTE, MG - BRASIL
FEVEREIRO, 2005

*É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se e fazer 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 Luther King

Vocês...
Sempre presentes...
ensinando o certo e o errado;
estendendo a mão que dá apoio;
acolhendo no abraço a fraqueza de um momento
aliviando com um só beijo toda aflição.
Sempre presentes...
sonhando meu sonho
vertendo lágrimas ao imaginar meu choro;
sorrindo com alma a cada momento de minha alegria;
observando tão de perto cada passo dessa caminhada.
Hoje, presentes...
E é com o coração repleto de orgulho
que procuro seu olhar entre todos.
Procuro o olhar mais doce,
pleno e especial para dizer que essa vitória é nossa
e que sou muito feliz por ter vocês tão perto.
Mas quando nossos olhos se cruzarem,
nada será dito, porque palavra se tornará
inexpressiva perto de tanto amor e gratidão.
Amo vocês, meu pai e minha mãe.

Agradecimentos

Ao professor Cláudio Antônio Bonjardim, que me acolheu no Laboratório de Vírus, pelos ensinamentos e exemplos científicos e pessoais, pela amizade, pelo carinho, pelo apoio e incentivo, pela confiança, por toda contribuição na minha formação acadêmica e pessoal. A você minha gratidão e respeito.

Aos professores Paulo César Peregrino Ferreira e Erna Geessien Kroon pelos ensinamentos, apoio, incentivo, em fim, por tudo que sempre fizeram por mim nestes nove anos no laboratório de Vírus.

Ao professor Oscar Bruna Romero, pela imensa ajuda, pela boa vontade sempre, pelo carinho e amizade.

À professora Edel Figueiredo Barbosa pela eterna disponibilidade em ajudar.

À Maria Cristina Almeida Prado pela prestatibilidade sempre.

À minha louca escrava, Jamas, pela dedicação com que abraçou meu projeto.

Ao José Carlos e ao Anderson, pela presença, apoio, companheirismo, ensinamentos e amizade.

Aos meus preciosos amigos, Chris, Katinha, Jaque, Lina, Landa, Rick, Cíntia, Juju, Waleska, Leozinha, Gi e Filipis, vocês são muito especiais para mim, muito obrigada por tudo, sem vocês este fardo seria muito mais pesado.

À todos os colegas/ companheiros do Laboratório de vírus, os atuais e os das “ antigas” Betânia, Joãozinho, Bel, Sarinha, Marcinha, Ju BH, Gabriel, Leandra, Renata, Renatinha, Daniel, Marco, Marcelo, Dani Lemos, Toninho, Flávia, Gustavo, Breno, Ana Paula, Jaqueline, Flavinho, Maurício, Bruninho, Brunão, Fabiano, Amanda, Danilo, Graciela, Greice, Luciana, Camila, Anamaria, Isabela, Marina, Miró, Alex, Monique, Alzira, Paula, Rodrigos, Thaís (Lamba!), Alexandre, Ana Paula (2), Thiago pelo convívio, pelos bate-papos, científicos ou não, pelas risadas no meio do Labs, pelos choros, pelos congressos, festas, enfim pelo nosso dia- a-dia no Labs, de alguma forma, todos vocês contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao John John que mesmo velhinho e gagá, faz a diferença no laboratório.

À “Dona” Angela, por toda ajuda e auxílio, pelo carinho a mim dispensado.

À Ilda e a Cida, sem dúvida este trabalho seria mais árduo sem vocês.

À Bernadete, foram poucos os dias que não lembrei de você!

Às PERVAS, Aléxia, Lud, Pacu’s e Tati, faço minhas as palavras de Vinícius de Moraes “Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os MEUS AMIGOS. A alguns deles não procuro, basta me saber que eles existem. Esta mera condição me encoraja a seguir em frente pela vida... mas é delicioso que eu saiba e sinta que os adoro, embora não declare e não os procure sempre...” Amo vocês!

Aos meus sempre AMIGOS, Leozinho, Dani, Janaína, Marina, Rico, Elaine e Kátia Cruz, pela amizade, apoio, incentivo, alegrias, pelos gestos carinhosos e por acreditarem em mim e torcerem sempre pelo meu sucesso.

Ao EJC-SA, por ter colocado luz nova na minha vida. Por todas as novas e velhas amizades dentro desta família.

À Cris, minha irmã, que mesmo tumultuadamente, sempre está ao meu lado e torcendo por mim.

Ao Guto, meu irmão e amigo, que sempre me apoiou e incentivou, está sendo maravilhoso viver esta nossa “nova” amizade.

À minha vovó Delci, que sem sombra de dúvida é o maior exemplo que trago na minha vida de amor, força, honestidade, amizade, garra, perseverança, sucesso, etc, etc, etc. E por ser a melhor Vó do mundo! Te amo muito!

À Família Nogueira da Gama e a Família Rocha e Silva, a todos vocês tios, primos, adendos e “sobrinhos” pelas alegrias, amizade, festas, orações e mais orações, carinho, amor, companhia, cuidados, dedicação, cumplicidade, torcida, e tudo mais, agradeço a Deus todos os dias por pertencer a estas famílias.

E finalmente, agradeço a Deus, que quando pedi força e vigor, me mandou dificuldades para me fazer forte. Quando pedi sabedoria, me deu problemas para eu resolver. Quando pedi prosperidade, me deu energia e cérebro para eu trabalhar. Quando pedi coragem, me mandou situações perigosas para eu superar. Quando pedi amor, me mandou pessoas com problemas para eu ajudar. Quando pedi favores, meu deu oportunidades. Não recebi nada que eu queria, recebi tudo que precisava. Minhas preces foram atendidas.

SUMÁRIO:

Agradecimentos	v
Sumário	viii
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xii
Abreviaturas	xiii
Resumo	xv
Abstract	xvii
1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Poxvírus	2
1.1.1 – Histórico	2
1.1.2 – Família <i>Poxviridae</i>	3
1.2 – Vírus Vaccínia	3
1.2.1 – Morfologia do Vírus	4
1.2.2 – Genoma Viral	6
1.2.3 – Ciclo de multiplicação - uma visão geral	7
1.2.3.1 – Adsorção à célula	7
1.2. 3.1 – Penetração	8
1.2.3.2 – Desnudamento	9
1.2.3.3 – Expressão de genes virais	9
1.2.3.4 – Replicação do DNA	11
1.2.3.5 – Morfogênese e liberação das partículas virais	12
1.3 – Vírus e mitogênese	15
1.4 – Proteínas quinases ativadas por mitógenos – MAPKs	16
1.4.1 – A quinase regulada por sinal extracelular – ERK ½	21
1.4.2 – Vírus e as MAPKs	23
1.5 – Egr-1	24
1.6 – Silenciamento gênico por siRNA	27
2 - RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	32
3 – OBJETIVOS	36
3.1 – Objetivo geral	37
3.2 – Objetivos específicos	37
4- ESTRATÉGIA DE TRABALHO	38

4.1 – Análise da acumulação do mRNA do gene egr-1 em resposta infecção pelo VV	39
4.2 – Análise da expressão da proteína Egr-1 e da interação DNA/Proteína em resposta à infecção viral	40
4.3 – Análise da localização celular de Egr-1 em resposta à infecção viral	41
4.4 – Análise da participação de MEK/ERK e da proteína Egr-1 na multiplicação e fenótipo de placa de lise viral	42
5- MATERIAL E MÉTODOS	43
5.1 – Células	44
5.1.1 – Vero	44
5.1.2 – A31	44
5.2 – Vírus Vaccínia	45
5.2.1 – Multiplicação viral	45
5.2.2 – Titulação viral	46
5.3 – Drogas e Anticorpos	46
5.4 – Sondas Moleculares	47
5.4.1 – Egr-1	47
5.4.2 – Oligonucleotídeo 18S	47
5.4.3 – Oligonucleotídeos Egr-1, AP-1 e NF- κ B	47
5.4.4 - Marcação isotópica da sonda molecular	48
5.5 – Análise do gene egr-1	49
5.5.1 – Extração do RNA celular total	49
5.5.2 – Fracionamento eletroforético dos RNAs	50
5.5.3 – Transferência de “Northern”	50
5.5.4 – Hibridizações	51
5.6 – Análise da proteína Egr-1	51
5.6.1 – Extratos protéicos celulares	52
5.6.2 – Fracionamento eletroforético e transferência das proteínas	52
5.6.3 – Reação com anticorpos e revelação	52
5.7 – Análise das interações DNA/Proteína	53
5.7.1 – Extratos protéicos celulares	53
5.7.2 – Ensaio do retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA)	53
5.7.3 – Ensaio do super retardamento da mobilidade eletroforética	54
5.8 – Silenciamento gênico por siRNA	55
5.8.1 – egr-1 siRNA	55
5.8.2 – Clonagem do inserto do grampo siRNA no vetor p <i>Silencer</i>	55

5.8.3 – Transfecção de células A31 com fosfato de cálcio e seleção dos clones celulares obtidos	57
5.9 – Dominante negativo de MEK-1	58
5.10 – Curva de multiplicação do VV	59
5.11 – Fenótipo da placa de lise do VV	59
5.12 – Microscopia Confocal	59
6- RESULTADOS	61
6.1 – Análise do acúmulo do mRNA de egr-1 induzido pelo VV	62
6.1.1 – O VV promove o acúmulo da mensagem do gene egr-1 em células A31	62
6.1.2 – A expressão de egr-1 é dependente da m.o.i. viral	62
6.1.3 – A expressão de egr-1 induzida pelo VV é dependente de síntese protéica “de novo” e da integridade do seu genoma	62
6.1.4 – A expressão de egr-1 induzida pelo VV requer a co-participação de serina-treonina quinase e MEK	63
6.2 – Análise da acumulação da proteína Egr-1 induzida pelo VV	69
6.3 – A proteína Egr-1 induzida pelo VV transloca-se para o núcleo, e interage com seu sítio de reconhecimento no DNA	72
6.4 – O VV também estimula a ligação de proteínas à seqüência regulatória AP-1 de maneira dependente de MEK/ERK	78
6.5 – O papel da via sinalizadora MEK/ERK 1/2 na expressão de Egr-1 e na multiplicação viral	81
6.5.1 – MEK/ERK 1/2 é requerida para a expressão de Egr-1 induzida pelo VV	81
6.5.2 – MEK/ERK 1/2 é necessária à multiplicação viral	82
6.7 – Análise da relevância de Egr-1 na multiplicação do VV	85
6.7.1 – Caracterização dos clones celulares expressando siRNA para Egr-1	85
6.7.2 – Análise da multiplicação do VV nos clones expressando siRNA para Egr-1	85
7 – DISCUSSÃO	90
8 – CONCLUSÃO	101
9 – PERSPECTIVAS	104
10 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da partícula do vírus vaccínia	5
Figura 2: Ciclo de multiplicação do VV	14
Figura 3: Vias de sinalizações das MAPKs	19
Figura 4: MAPK regulam múltiplos aspectos da transcrição	20
Figura 5: A transmissão de sinal desencadeada pela via Ras/Raf/MEK/ERK	23
Figura 6: Silenciamento gênico por RNA interferente	31
Figura 7: Representação esquemática do grampo que foi utilizado para clonagem no vetor de expressão <i>pSilencer</i>	56
Figura 8: Representação esquemática do plasmídeo <i>pSilencer 3.1-HI neo</i>	57
Figura 9: Acúmulo do mRNA do gene <i>egr-1</i> em células infectadas pelo VV	64
Figura 10: Influência da multiplicidade de infecção viral no acúmulo do mRNA do gene <i>egr-1</i> após infecção pelo VV	65
Figura 11: Influência da inibição da tradução e da inativação da partícula viral por luz UV no acúmulo do mRNA de gene <i>egr-1</i> após infecção pelo VV	66
Figura 12: A acumulação do mRNA do gene <i>egr-1</i> em células infectadas pelo VV requer transcrição contínua	67
Figura 13: A acumulação de <i>egr-1</i> após a infecção pelo VV requer serina treonina quinase	68
Figura 14: Cinética de expressão da proteína Egr-1 após a infecção pelo VV	70
Figura 15: A Expressão da proteína Egr-1 em resposta à infecção pelo VV é dependente de MEK	71
Figura 16: Localização celular da proteína Egr-1 em resposta à infecção pelo VV	75
Figura 17: Análise das interações do elemento regulatório EBS com proteínas de células A31 infectadas pelo VV	77
Figura 18: Análise das interações do elemento regulatório AP-1 com proteínas de células A31 infectadas pelo VV	80
Figura 19: O papel de MEK/ERK 1/2 na expressão de Egr-1 em resposta à infecção celular pelo VV	83

Figura 20: Relevância biológica da via sinalizadora MEK/ERK para a multiplicação do VV	84
Figura 21: Caracterização dos clones celulares expressando siRNA para Egr-1	87
Figura 22: Relevância da proteína Egr-1 para a multiplicação do VV	89
Figura 23: Vias de sinalização disparadas pela infecção com o VV	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito do silenciamento do gene egr-1 por siRNA na multiplicação do VV	88
--	----

Abreviaturas

AP-1	Proteína ativadora transcricional 1
³² P dCTP	Dideoxicitosina trifosfato marcado com fosfato 32
Ac	Anticorpo
ActD	Actinomicina D
ATF	Fator ativador transcricional
BSA	Albumina sérica bovina
cAMP	AMP cíclico
CDK	Quinases dependentes de ciclinas
cDNA	fitas complementares ao DNA
CEV	Vírus envelopado associado à célula
<i>c-fos</i> e <i>c-jun</i>	proto-oncogenes celulares fos e jun
Chx	Cicloheximida
CRE	Elemento de resposta ao cAMP
CVB3	Vírus Coxsackie B3
dATP/ dCTP/ dGTP	Dideoxiadenina / citosina / guanossina trifosfato
ddH ₂ O	água deionizada
DMEM	meio mínimo de Eagle, modificado por Dulbecco
DNA	ácido desoxinucleico.
DO	Densidade óptica
dsRNA	RNA dupla fita
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Dideoxitimina trifosfato
EBS	Sítio de ligação ao Egr-1
EBV	Vírus Epstein-Barr
ECP	Efeito citopático
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EEV	Vírus extracelular envelopado
EGF/ EGFR	fator de crescimento epidérmico e seu receptor.
EGR	gene de resposta precoce ao crescimento
EMSA	Ensaio do retardamento de mobilidade eletroforética
ERK	Quinase ativada por sinal extracelular
ERK 1/2	Quinase regulada por sinais extracelulares
FC	fator de crescimento
FT	Fator de transcrição
GAPDH	Gliceraldeído fosfato desidrogenase.
GDP	Guanossina difosfato
GFP	Proteína verde fluorescente
Grb-2	Proteína 2 de ligação ao receptor de fator de crescimento
GTP	Guanossina trifosfato
HCMV	Citomegalovírus humano
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humano
HSV	Vírus Herpes simples
HTLV	Vírus linfotrópico humano
IFN $\alpha/\beta/\gamma$:	Interferons α β ou γ .
IgG	Imunoglobulina G
IMV	Vírus maduro intracelular

ITR	Repetições terminais invertidas
IV	Vírus imaturo
JNK	Quinase c-jun N-terminal
Log	Escala logarítmica
m.o.i.	Multiplcidade de infecção.
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos.
MEK	MAP quinase ativada por mitógeno
MEM	meio mínimo de Eagle
MOPS	Ácido morfolino-propano-sulfônico
mRNA, rRNA:e tRNA	ácido ribonucléico mensageiro, ribossomal e transportador.
NAB	Proteína de ligação ao NGFI-A
NGF	Fator de crescimento neural
OFR	fase aberta de leitura
OMS	Organização mundial de saúde
PBS	solução salina tamponada contendo fosfato
PCI	Fenol-clorofórmio-álcool isoamílico
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto
PNK	Polionucleotídeo quinase
RISC	Complexo de silenciamento por RNA
RNA	ácido desoxirribonucléico.
RNAi	RNA interferente
RSK-2	Quinase S6 ribossomal
SAPK	Quinase ativada por estresse
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino.
siRNA	Pequeno RNA interferente
SRE	Elemento de resposta ao soro
SRF	Fator de resposta ao soro
SSC	Solução de citrato de sódio
STK	Serina/treonina quinase
TE	Tris-EDTA
TGF	Fator de crescimento tumoral
TK	Timidita quinase
TNF	Fator de necrose tumoral
ts	termossensível
TYR	Tirosina quinase
UFP	Unidade formadora de placas
UFP	Unidade viral formadora de placa.
UV	Ultra violeta
VGF	Fator de crescimento do vírus Vaccínia.
VV	Vírus Vaccínia.

RESUMO

Os poxvírus são vírus que apresentam genoma DNA, dupla fita, linear e que se multiplicam exclusivamente no citoplasma de células, tanto de vertebrados, quanto de invertebrados. O orthopoxvirus Vaccinia (VV) é o protótipo da família *Poxviridae*, tendo a capacidade de codificar mais de 200 polipetídeos.

As MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos) são importantes mediadoras de transdução de sinais e têm papel crucial na regulação de várias funções celulares como crescimento, proliferação, diferenciação e apoptose. Graças a isto, diversos vírus, como parte de suas estratégias multiplicativas, manipulam a ativação de diferentes MAPKs, como por exemplo: o vírus da hepatite B, o coxsackievirus B3, o vírus Influenza, o vírus Epstein Barr e o HIV, dentre outros.

Uma das conseqüências da ativação da via sinalizadora MAPK, em particular Ras/Raf/MEK/ERK/Elk, por estímulos mitogênicos, é a expressão de genes imediatamente precoces, incluindo c-fos, c-jun e o gene de resposta precoce ao crescimento (egr-1). Andrade e colaboradores, 2004, demonstraram que esta via sinalizadora também é estimulada pelo VV, levando a expressão de Egr-1 e sendo necessária à sua multiplicação. Como a análise de Egr-1, realizada acima, não contemplava todo o ciclo de multiplicação viral, decidimos fazer um estudo mais detalhado da mesma.

Caracterizamos a expressão de Egr-1 (mensagem e proteína) em resposta à infecção viral e verificamos que a mesma se inicia 1 hora pós-infecção e se prolonga até tempos tardios da infecção, isto é, aproximadamente, 36 horas pós-infecção. Verificamos também que a mesma é dependente da multiplicidade de infecção (m.o.i.), da síntese proteica “de novo” e da expressão de genes precoces virais e resulta da estimulação simultânea das vias sinalizadoras envolvendo MEK/ERK e serina-treonina quinases (STK). Também geramos, selecionamos e caracterizamos clones celulares expressando, de forma estável, dominância negativa para MEK-1 e pudemos demonstrar que MEK/ERK é funcionalmente relevante, tanto para a expressão de Egr-1 induzida pelo VV, quanto para a multiplicação e o fenótipo de placa de lise viral.

Para verificar o significado funcional de Egr-1 para a biologia deste orthopoxvírus, geramos, selecionamos e caracterizamos, clones celulares expressando, de forma estável, siRNA para Egr-1. Pudemos demonstrar que esta proteína celular, cuja expressão é regulada pelo vírus desde os tempos precoces até tardios da infecção, e se localiza preferencialmente no núcleo, desempenha papel crucial na economia multiplicativa do VV.

A descrição de uma via sinalizadora, levando a expressão de proteína celular que tenha reflexos, tanto na multiplicação, quanto no fenótipo da placa de lise viral, explicita a necessidade da interação deste microrganismo com seu hospedeiro. O conjunto de resultados apresentados nesta tese não tem precedentes na literatura dos poxvírus.

ABSTRACT

Poxviruses are viruses that present a linear, double-stranded DNA genome and multiply exclusively in the cell cytoplasm, in both, vertebrates and invertebrates. The orthopoxvirus Vaccinia virus (VV), is the prototype of the *Poxviridae* family, having capacity to encode more than 200 gene products.

MAPKs (mitogen activated protein kinases) are important mediators of signal transduction and have a crucial role in the regulation of several cellular functions such as growth, proliferation, differentiation and apoptosis. Due to this, several viruses, as part of their multiplication strategy, regulate the activation of different MAPKs, e.g., the hepatitis B virus, the coxsackievirus B3, the Influenza virus, the Epstein Barr virus and the VV, among others.

One of the consequences of the MAPK signaling pathway activation, in particularly Ras/Raf/MEK/ERK/Elk, by mitogenic stimuli, is the expression of immediate early genes, including c-fos, c-jun and the early growth response gene (*egr-1*). Andrade *et al.* (2004) demonstrated that this signaling pathway is also stimulated by VV, leading to Egr-1 expression and being necessary for its multiplication. Since the analysis of Egr-1 performed above did not contemplate all the viral multiplication cycle, we decided to do a more detailed study of it.

We characterized Egr-1 expression (message and protein) in response to viral infection and verified that it initiates 1 hour after infection and goes on until late times of infection, approximately 36 hours after infection. We also verified that it is dependent of the multiplicity of infection (m.o.i.), “de novo” protein synthesis and of early expression of viral genes, and results of simultaneous stimulation of the signaling pathways involving MEK/ERK and serine-threonine kinases (STK). We also generated, selected and characterized cellular clones stably expressing, MEK-1 negative dominance and we were able to demonstrate that MEK/ERK is functionally relevant, not only for the *egr-1* expression induced by VV, but also for viral multiplication and viral plaque phenotype.

To verify the functional significance of Egr-1 for the biology of this orthopoxvirus, we generated, selected and characterized cellular clones stably expressing, siRNA for Egr-1. We could demonstrate that this cellular protein, whose expression is regulated by the

virus since early times of infection until late ones, is localized preferentially in the nucleus and has a crucial role in the multiplication economy of VV.

The description of one signaling pathway, leading to the expression of cellular protein that affects multiplication and viral plaque phenotype, explicits the necessity of interaction of this microorganism with its host. Altogether, the results presented here, has no precedent in the literature of poxviruses.

1 - INTRODUÇÃO

1.1- Poxvírus

1.1.1 - Histórico

Os poxvírus representaram um importante marco no desenvolvimento da virologia, imunologia e vacinologia. No século dezoito, a varíola (doença causada pelo poxvírus de mesmo nome), foi prevalente em todo o mundo e estima-se que 400.000 pessoas morreram da doença na Europa até o fim daquele século. Em 1796, a inoculação deliberada de vírus cowpox em humanos, foi promovida pelo Dr Edward Jenner para protegê-los contra o vírus da varíola, antígenicamente relacionado ao cowpox. No século XIX o uso da vacina de Jenner contra a varíola se espalhou pelo mundo. As amostras de vírus vacinais eram obtidas de crostas de lesões em vacas e cavalos e eram mantidas por vacinação braço a braço ou inoculação em bezerras. Em 1939, Downie demonstrou que o vírus utilizado para a vacinação era diferente do vírus cowpox original, sendo então o vírus vaccínia reconhecido como uma espécie diferente de poxvírus. Entre 1967 e 1980 a Organização Mundial da Saúde (OMS) promoveu uma grande campanha de vacinação contra a varíola e em 1979 a varíola foi considerada erradicada no mundo, o último caso natural da doença ocorreu em um indivíduo na Somália. Em 1980, a OMS recomendou a interrupção da vacinação em todo o mundo sendo o vírus da varíola declarado erradicado. (Alcami e Smith, 1996; Inglesby *et al.*, 1999; Henderson *et al.*, 1999).

O vírus vaccínia (VV) usado para prevenir a varíola, tornou-se modelo para os primeiros estudos biológicos e bioquímicos dos vírus. Ele foi o primeiro vírus animal purificado suficientemente para mostrar que continha DNA e não RNA e ser visualizado por microscopia eletrônica. O VV também foi o primeiro modelo usado em métodos comparáveis com a contagem de colônias para bactérias, isto é, ensaios de infectividade por contagem de lesões em membranas corioalantóides de ovos embrionados de galinha. Recentemente, o VV foi o primeiro vírus utilizado como vetor para inserir genes exógenos em animais, de forma que a proteína codificada pelo gene fosse expressa (Fenner, 2002).

1.1.2- Família *Poxviridae*

A família *Poxviridae* compreende uma ampla família de vírus DNA complexos que se multiplicam no citoplasma celular de vertebrados e invertebrados. As propriedades gerais desta família incluem: vírus complexos que contêm enzimas que sintetizam mRNA; genoma composto de DNA dupla fita linear com uma alça tipo grampo de cabelo em cada extremidade e sítio de multiplicação citoplasmático. Os poxvírus são divididos em duas sub-famílias, *Chordopoxvirinae* e *Entomopoxvirinae*, baseando-se, respectivamente, no hospedeiro vertebrado ou invertebrado (Moss, 1996).

A sub-família *Chordopoxvirinae* consiste de oito gêneros: *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxvirus* e *Yatapoxvirus*. Os membros de um gênero são genética e antigênicamente relacionados, são morfologicamente indistinguíveis e possuem hospedeiros comuns. Como conseqüência, a reação sorológica cruzada entre diferentes membros do gênero é comumente observada (Moss, 1996).

1.2- Vírus Vaccínia

O VV além de ser o protótipo do gênero *Orthopoxvirus*, é também o protótipo da família *Poxviridae*. Portanto, a maioria das informações sobre esta família é baseada em estudos realizados com o VV.

O VV é um dos maiores e mais complexos dentre os vírus animais, apresentando-se sob a forma ovóide ou semelhante a um tijolo (Joklik, 1966; Dales e Pogo, 1981; Fenner *et al.*, 1989; Moss, 1991). O tamanho da partícula dos poxvírus, que varia de 200 a 320 nm, possibilitou que se realizassem os primeiros estudos com esse vírus utilizando-se instrumentos relativamente simples, como por exemplo o microscópio ótico (Fenner *et al.*, 1989).

Uma das notáveis características dos poxvírus é possuírem duas partículas infecciosas diferentes. O vírus maduro intracelular (IMV), que contêm uma ou duas membranas e o vírus envelopado extracelular (EEV), que contêm uma membrana adicional chamada de envelope (Sodeik e Locker, 2002). IMV representa a maioria da progênie viral infectiva

e somente é liberada no ambiente com a lise celular. Algumas proteínas são encontradas, exclusivamente, em apenas uma das formas. Na membrana externa do IMV podemos encontrar as proteínas A12L, A13L, A14L, A17L, D8L, G7L, H3L, 15L, L1R e A27L (p14) (Jensen 1996). Já no envelope do EEV são, exclusivamente, encontradas as proteínas A56R, B5R, A34R, A36R e A33R (Wolffe *et al.*, 1997).

Outras duas formas de partículas virais, podem ser observadas, o vírus envelopado intracelular (IEV) e o vírus envelopado associado à célula (CEV) (Sodeik *et al.*, 1993; Schmelz *et al.*, 1994).

1.2.1 – Morfologia do Vírus

A partícula viral infecciosa completa, apresenta basicamente quatro elementos estruturais principais sendo: envelope, membrana externa, corpúsculos laterais e cerne (Fenner *et al.*, 1989) (Figura 1).

O cerne, estrutura mais interna do vírus, é um disco ovalado, bicôncavo e envolto por uma camada composta de pequenas subunidades protéicas cilíndricas denominada paliçada. No interior do cerne encontra-se o material genético, ao qual estão associados quatro grandes polipeptídeos em uma estrutura denominada nucleossoma, dada sua semelhança àquelas encontradas nas células de eucariotos, além de enzimas virais (Jensen *et al.*, 1996; Sodeik e Locker, 2002)

Os corpúsculos laterais, estruturas de forma ovóide, estão dispostos nas duas concavidades do cerne nas partículas virais intactas. Não são conhecidas a composição química e função desses elementos. (Fenner *et al.*, 1989; Vanslyke e Hruby, 1994). Através de estudos utilizando técnicas de microscopia crio-eletrônica, Dubochet e colaboradores (1994), sugeriram que os corpúsculos laterais, os túbulos de superfície e também a superfície bicôncava do cerne podem ser meros artefatos resultantes da operação química e das condições de extrema dessecação a que é submetido o material para microscopia eletrônica, entretanto, dados recentes obtidos por análise estrutural, contestam que estas estruturas sejam apenas artefatos de técnica (Griffith *et al.*, 2001; Malkin *et al.*, 2003).

A membrana externa é uma bicamada lipoprotéica de origem celular que circunda o cerne e os corpúsculos laterais. Dispostos sobre a membrana externa, encontram-se elementos tubulares de 7 nanômetros de diâmetro e até 100 nanômetros de comprimento, os quais dão à partícula viral sua estrutura típica. (Buller e Palumbo, 1991).

O envelope, estrutura mais externa do EEV, é também de origem celular, sendo obtido a partir de modificações ocorridas entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi. O envelope contém pelo menos sete glicoproteínas distintas e um polipeptídeo acetilado. Três destas glicoproteínas representam diferentes formas da mesma proteína. As demais são os polipeptídeos 37kDa, 42kDa e a hemaglutinina viral 89kDa. Esta última presente apenas nos ortopoxvírus, (Fenner *et al.*, 1989; Buller e Palumbo, 1991; Cavallaro e Esposito, 1992; Ortiz e Paez, 1994).

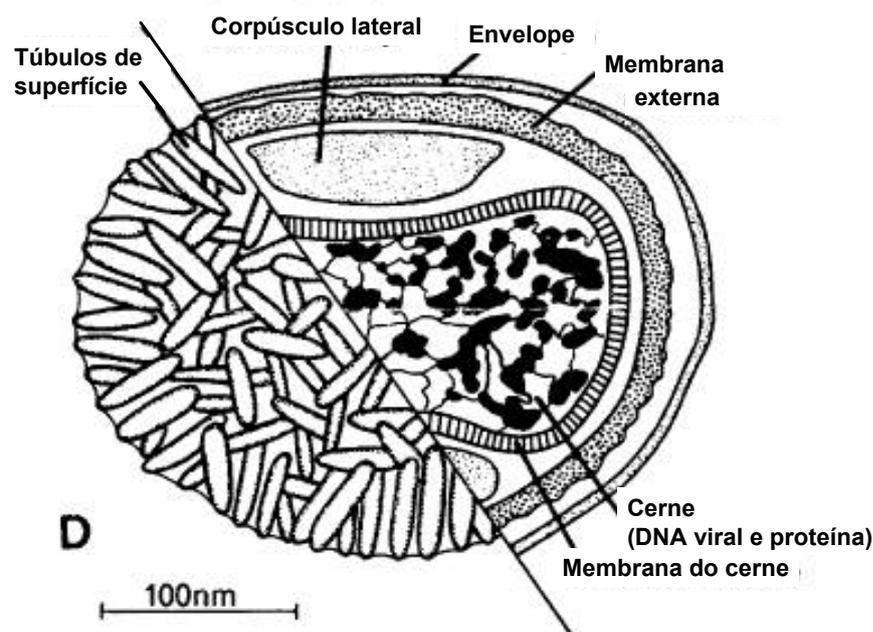


Figura 1: Representação esquemática da partícula do vírus vaccínia

A figura mostra a partícula viral infecciosa completa evidenciando seus elementos estruturais principais: membrana externa, corpúsculos laterais, cerne e envelope. (fonte: modificado de Moss, 2001).

1.2.2 – Genoma Viral

O genoma dos poxvírus é formado por uma única molécula de DNA linear de fita dupla, com extremidades covalentemente ligadas, e com peso molecular de aproximadamente 120 milhões de Daltons, compreendendo entre 130 e 230 kpb. O genoma completo do VV (amostra Copenhagem) consiste de 191,636 pb, com 66% de A+T, codificando um total de 263 genes potenciais, que foram obtidos através da comparação de diferentes fases de leituras abertas (ORFs) e seqüências de aminoácidos dos polipeptídeos descritos (Goebel *et al.*, 1990). O número de genes é menor que o total de proteínas vírus-dependentes descritas por Carrasco e Bravo (1986), o que pode indicar que algumas proteínas são processadas pós-traducionalmente em mais de um polipeptídeo (Fenner *et al.*, 2002; Moss, 2001).

Os genomas dos VV amostras: Copenhagem (Número de acesso M35027); vírus modificado Ankara (MVA) (número de acesso U94848); Tian Tan (número de acesso AF095689) e Western Reserve (WR) (número de acesso AY243312), foram completamente seqüenciados. Todos possuem a região central, de aproximadamente 100 kpb, altamente conservada e as extremidades mais variáveis, onde são encontradas deleções, transposições e mutações que tornam alguns genes inativos (Müller *et al.*, 1978; DeFilippes, 1982; Esposito e Knight, 1985; Douglas *et al.*, 1994; Venkatesan *et al.*, 1982, Goebel *et al.*, 1990, revisado por Smith e Law, 2004). Na região central do genoma estão localizados genes essenciais para a multiplicação viral (principalmente polipeptídeos estruturais e enzimas envolvidas no metabolismo do ácido nucléico) e aproximadamente 90 genes são conservados em todos os poxvírus de cordados já seqüenciados (mais de 25 vírus). O conteúdo e o arranjo dos genes nesta região também são altamente conservados. Por outro lado, os genes encontrados nas regiões terminais variáveis, em geral, não são essenciais para multiplicação viral em cultura celular, porém eles codificam fatores de virulência e proteínas de interação com o hospedeiro (Garon, *et al.*, 1978; Esposito e Knight, 1985; Brown *et al.*, 1985; Reisner, 1985; Fenner *et al.*, 1989; Massung *et al.*, 1993, revisado por Smith e Law, 2004). As regiões terminais variáveis estão arranjadas em estruturas típicas, contendo seqüências repetidas e invertidas (ITRs) de até 12 kpb (Garon, *et al.*, 1978).

1.2.3 – Ciclo de multiplicação _ uma visão geral

Diferentemente dos demais vírus DNA, a multiplicação e montagem dos poxvírus ocorrem inteiramente no citoplasma das células hospedeiras, podendo apresentar algumas diferenças quanto à duração, de acordo com o tipo de vírus e a célula infectada. Para o VV a duração do ciclo de multiplicação varia de 12 a 24 horas em células de linhagem contínua derivadas de rim de macaco verde (Vero). As informações relativas ao ciclo de multiplicação do vírus Vaccínia que se seguem, refletem também as informações para a grande maioria dos poxvírus (Buller e Palumbo, 1991).

1.2.3.1 - Adsorção à célula

A infecção dos poxvírus inicia-se com a adsorção da partícula viral à superfície celular [Figura 2(1)]. Diferentemente do que acontece com a maioria dos outros vírus, os poxvírus não possuem um único ligante específico de interação com receptores celulares. A discussão da ligação do VV à célula e sua entrada deve levar em consideração qual forma infectiva do VV é considerada, porque IMV e EEV são antigênicamente distintas e são envolvidas por quantidades diferentes de membranas. Os estudos mais atuais foram realizados principalmente com IMV, por serem mais abundantes e fisicamente mais estáveis. Entretanto, EEV é a forma mais importante de disseminação no hospedeiro e recentemente, também foi usado para estudos de ligação e penetração. IMV e EEV ligam-se à diferentes receptores, devido a presença de diferentes proteínas em suas superfícies. No entanto, a natureza destes receptores continua pouco conhecida (Smith *et al.*, 2003).

A hipótese que o VV usaria o receptor de fator de crescimento (Buller e Pallumbo., 1991) foi refutada (Hugin e Hauser, 1994). Atualmente, sabe-se que o IMV interagem com a célula através da ligação à glicosaminoglicanos da superfície celular. As proteínas H3L e A27L se ligam a sulfato de heparina , enquanto a proteína D8L se liga a sulfato de condroitina (revisado por Chung *et al.*, 2005). Para o EEV, quatro proteínas distintas codificadas pelo vírus (A33R, A34R, A56R e B5R) estão presentes na superfície do vírus, no entanto, existem apenas evidências indiretas da interação destas proteínas com receptores celulares. Primeiro, a hemaglutinina viral (A56R) causa hemaglutinação de eritrócitos de várias espécies. Segundo, a ausência do gene A34R reduz a infectividade específica do EEV em cinco vezes, sugerindo um papel desta proteína ou na adsorção ou

na entrada. Terceiro, EEV pode ser neutralizado com anticorpos diretamente contra a proteína B5R. Finalmente, mutações nos genes codificadores para as proteínas A33R, A34R, e B5R, influenciam se o vírus permanece ligado à superfície celular como CEV (vírus envelopado associado à célula) ou se é liberado no ambiente como EEV. Evidências da interação física entre proteínas específicas do EEV e antígenos de superfície celular ainda são necessárias (revisado por Smith *et al.*, 2003).

As ligações das partículas de IMV e EEV afetam diferentemente a célula. A ligação de IMV induz cascata de sinalização envolvendo Rac, MEK, ERK, PKA e PKC e também produção de projeções celulares dependente de filamentos de actina, o que não pode ser observado na ligação de EEV (revisado por Smith *et al.*, 2003 e por Chung *et al.*, 2005).

1.2.3.1 - Penetração

O mecanismo pelo qual as diferentes formas do VV penetram na célula hospedeira ainda não está completamente elucidado, no entanto, ambas as formas, após a adsorção e entrada, liberam o cerne viral no citoplasma [Figura 2(2)].

Vanderplasschen e Smith em 1997, demonstraram que o EEV e IMV ligam-se a diferentes receptores e que o EEV, mas não IMV, é resistente a neutralização por anticorpos. O envelope do EEV é uma estrutura frágil (Roos *et al.*, 1996) sendo danificada nos processos de purificação viral (Ichihashi, 1996; Vanderplasschen, *et al.*, 1997; Vanderplasschen e Smith, 1997), uma vez rompido o envelope a partícula passa atuar como um IMV (McIntosh e Smith, 1996; Wolffe *et al.*, 1997). Conseqüentemente, o mecanismo de penetração do EEV intacto pode ser diferente do EEV danificado que contém proteínas do IMV expostas em sua superfície (Ichihashi, 1996; Vanderplasschen, *et al.*, 1997; Vanderplasschen e Smith, 1997), sendo assim, estudos de adsorção e penetração do EEV não devem ser realizados com vírus purificados.

Estudos recentes, realizados pelo grupo do Dr Geoffrey Smith, demonstraram que a entrada de ambos, IMV e EEV, ocorre por fusão com a membrana plasmática. No caso do IMV, a fusão da membrana externa com a membrana plasmática, libera o cerne no citoplasma. Para o EEV, o envelope é rompido no contato com a membrana plasmática e então passa a atuar da mesma forma que o IMV. (Carter *et al.*, 2004)

1.2.3.2 - Desnudamento

Durante o desnudamento primário (penetração da partícula viral) [Figura 2(2)], o processo não é afetado por inibidores de transcrição ou de síntese protéica, e o processo culmina com a liberação do cerne viral no citoplasma, o qual contém o genoma do vírus. Após entrar no citoplasma o cerne viral é transportado até o local onde ocorre a síntese de mRNAs. Na etapa seguinte, acontece o desnudamento secundário [Figura 2(4)], quando as nucleoproteínas que constituem o cerne são degradadas e o DNA viral é liberado no citoplasma da célula hospedeira. Este processo pode ser bloqueado por inibidores de transcrição e tradução, o que significa que o mesmo é dependente da síntese de RNA e de proteínas virais (Fenner *et al.*, 2002; Moss, 1996).

1.2.3.3 - Expressão de genes virais

Os genes virais podem ser caracterizados de acordo com o momento em que são expressos, sendo genes precoces [Figura 2(3)], aqueles cujos produtos são sintetizados antes da replicação do DNA viral e genes intermediários [Figura 2(6)] ou tardios [Figura 2(7)], aqueles cujos produtos são sintetizados durante ou após a replicação do DNA viral [Figura 2(5)] (Moss, 1990; Condit e Niles, 2002; Broyles, 2003).

A regulação gênica dos poxvírus ocorre principalmente em nível transcricional, através da ligação das proteínas regulatórias aos promotores de cada gene ou de cada fase de leitura aberta. Cada classe de genes (precoce, intermediário e tardio) é caracterizada funcionalmente por distintos promotores e fatores trans-ativadores “cognatos”, freqüentemente codificados pelo vírus. Acredita-se que a regulação gênica dos poxvírus acontece em forma de cascata, onde os fatores transcricionais de uma fase seriam sintetizados na fase imediatamente anterior, de tal forma que, os produtos dos genes imediatamente precoces regulariam a transcrição dos genes precoces, os produtos destes, por sua vez, regulariam a transcrição dos genes intermediários e assim sucessivamente (Moss, 1990; Condit e Niles, 2002; Broyles, 2003).

RNA mensageiros precoces do VV são detectados minutos após a entrada do vírus na célula e a sua expressão máxima acontece entre 1 a 2 horas. O cerne viral aparentemente mantém sua integridade estrutural após entrar na célula. mRNAs virais são sintetizados dentro do cerne e são exportados através de poros na sua superfície. Isto é possível,

porque um completo sistema de transcrição é sintetizado nos momentos tardios da infecção e empacotado no cerne das partículas infecciosas juntamente com o DNA. Este sistema inclui a RNA-polimerase-DNA-dependente, enzimas responsáveis pela metilação e poliadenilação dos RNAs mensageiros recém-sintetizados e fatores de transcrição precoces responsáveis pela ativação dos genes precoces (Moss, 1990; Zhang *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1997; Moss, 2001; revisado por Broyles, 2003).

Aproximadamente metade do genoma viral é transcrita antes da replicação do DNA, incluindo genes relacionados com a replicação do DNA viral (enzimas e fatores de ligação ao DNA), a expressão de genes intermediários, além de fatores de crescimento ou proteínas de interação com o hospedeiro (Moss, 2001; revisado por Broyles, 2003). O rápido declínio nos níveis de mRNAs precoces não pode ser explicado apenas pelo fim da transcrição e é consistente com a indução da degradação de todas as classes de mRNA após a infecção celular. A rápida degradação dos mRNAs pode ser um mecanismo para eliminar mRNAs celulares e virais ao final de cada estágio temporal (Moss, 2001).

A replicação do DNA viral precede a mudança na expressão gênica viral. Estudos de incorporação de aminoácidos e transcrição indicam a existência de uma classe de genes intermediária que são expressos após a replicação do DNA, porém antes da expressão de genes tardios. Os mRNA intermediários começam a ser detectados após 100 minutos de infecção, (máxima expressão dos mRNAs precoces), alcançando o pico de expressão logo em seguida e depois declina em quantidade. Somente sete genes do VV, pertencentes a classe dos genes intermediários, foram identificados, embora outros existam (Moss, 2001).

A transcrição dos genes tardios sucede à transcrição dos genes intermediários. Em células HeLa, mRNAs tardios são detectados após 140 minutos de infecção com o VV e continua por aproximadamente 48 horas. A contínua síntese de proteínas tardias reflete diretamente uma transcrição ativa, uma vez que a meia vida dos mRNAs tardios é estimada em 30 minutos ou menos (Moss, 2001). A maioria dos genes tardios codifica a maioria dos polipeptídeos estruturais, enzimas e fatores de transcrição precoces que farão parte da partícula viral (Fenner *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1997, Moss, 2001).

Entretanto, para muitos polipeptídeos, a função e a expressão temporal são relativamente pouco definidas, sendo muitos possíveis genes precoces ou tardios descritos apenas como fases de leitura abertas (ORFs). (Joklik, 1966; Fenner *et al.*, 1989; Goebel, 1990).

1.2.3.4 - Replicação do DNA

O início da síntese de DNA varia entre os diferentes membros da família *poxviridae* e depende da multiplicidade da infecção e do tipo celular. Em células infectadas pelo VV a replicação do DNA começa após 1 a 2 horas de infecção e resulta na geração de aproximadamente 10000 cópias do genoma viral por célula, das quais metade será empacotada nas partículas virais durante a morfogênese. (Fenner *et al.*, 1989; Goebel *et al.*, 1990; Beaud, 1995; Moss, 2001).

Como já comentado, anteriormente, o VV possui uma única molécula de DNA dupla fita e se multiplica no citoplasma da célula hospedeira. Sendo assim, a replicação do DNA viral parece ser independente do núcleo celular e a maioria (se não todas) as proteínas necessárias à replicação do DNA viral são codificadas pelo vírus. Ao contrário do completo sistema de transcrição dos mRNAs precoces que faz parte da partícula viral, as proteínas envolvidas na replicação do DNA são sintetizadas nos estágios precoces da infecção, no entanto, algumas destas proteínas podem fazer parte da partícula viral, como por exemplo, a Topoisomerase I. A princípio, proteínas celulares necessárias à síntese de DNA viral podem ser recrutadas do núcleo, embora nenhuma tenha ainda sido encontrada (revisado por Beud, 1995).

A replicação do DNA viral inicia-se com um corte em um sítio específico no DNA parental em uma ou ambas regiões das ITR do genoma. As extremidades 3'OH originadas dentro das alças terminais são expostas e servem como iniciadores para a síntese da nova cadeia complementar. O DNA recém sintetizado volta a se dobrar através do pareamento das ITRs, formando novas alças, dando continuidade à replicação da fita-nascente, formando então, moléculas concatêmeras que serão posteriormente clivadas em moléculas maduras de DNA [Figura 2(5)], as quais serão, posteriormente, empacotadas nas novas partículas virais (Beaud, 1995; Moss, 2001). Durante a replicação do DNA podem ocorrer recombinações dos genomas virais (Buller e Palumbo, 1991).

A construção de mutantes termosensíveis (ts), que em temperatura não permissiva expressam normalmente as proteínas virais precoces, mas não replicam seu DNA, demonstrou que as proteínas virais, DNA polimerase, D5R, B1R, H5R, D4R, e A20R são essenciais na síntese de DNA viral (Moss, 2001). A infecção com um mutante ts para a Topoisomerase I do VV, mostrou que esta enzima, embora seja importante para a síntese do DNA do VV, ela não é essencial, ao contrário do que se acreditava (Fonseca e Moss, 2003).

1.2.3.5 - Morfogênese e liberação das partículas virais

Devido ao grande tamanho da partícula viral, o ciclo de multiplicação do VV foi o primeiro a ser analisado por microscopia eletrônica. A morfogênese ou montagem dos poxvírus ocorre inteiramente dentro de regiões granulares, eletrodensas denominadas “fábricas virais”. Estas contêm o viroplasma (áreas ricas em material denso e granuloso). Acreditava-se que estas regiões não possuíam polirribossomos, sugerindo que as proteínas eram produzidas e transportadas para as mesmas (Fenner *et al.*, 1989). No entanto, Fonseca e colaboradores (2000), demonstraram a presença de polirribossomos livres próximos ou dentro das fábricas virais, sendo provável que algumas proteínas virais sejam traduzidas nestes ribossomos.

Durante a morfogênese do VV várias estruturas são formadas: vírus crescentes [Figura 2(8)], vírus imaturo (IVs) [Figura 2(4)], vírus maduro intracelular (IMV) [Figura 2(10)], vírus envelopado intracelular (IEV) [Figura 2(11)], vírus extracelular associado à célula (CEV) e finalmente o vírus envelopado extracelular (EEV) (Sodeik e Locker, 2002).

A primeira estrutura visível são formas crescentes [Figura 2(8)], que são constituídas de proteínas virais e lipídios do hospedeiro. Estas estruturas crescem para formar os IVs [Figura 2(9)], partículas não infectivas que ganham infectividade durante um processo que envolve condensação do cerne viral e clivagem proteolítica de várias proteínas do capsídeo como, por exemplo, 4a (A10L), 4b (A3L) e a p25 (L4R) (Katz e Moss, 1970; VanSlyke *et al.*, 1991 a e b). Estas clivagens, provavelmente, promovem a transição da forma esférica do IV para a forma de tijolo do IMV [Fig 2(10)], e a geração das estruturas morfológicas e bioquímicas distintas do cerne do IMV (Sodeik e Locker, 2002; revisado por Smith e Law, 2004).

Os IMVs produzidos, representam a maioria da progênie infectiva de cada célula. O número de membranas que circundam uma partícula IMV é discutido. Alguns estudos apresentaram, tanto evidências para a existência de uma membrana (Hollinshead *et al.*, 1999), quanto de múltiplas membranas (Griffiths *et al.*, 2001; Risco *et al.*, 2002), embora esta questão permanece sem solução (revisado por Smith e Law, 2004). Independente do número de membranas presentes nos IMV, estas partículas não são suficientes para a eficiente disseminação da infecção e um envelope adicional é necessário.

Alguns IMVs deixam as fábricas virais, transportados por microtúbulos e são envolvidos por bi camada de membrana intracelular derivada de endossomos ou do complexo *trans*-Golgi (Schmelz *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 2002; revisado por Smith e Law, 2004). A eficiência deste processo, que culmina gerando o IEV [Fig 2(11)], depende da combinação de amostra viral e tipo celular usado. IEVs são ativamente transportados pelo citoesqueleto, novamente envolvendo microtúbulos, através do citoplasma (Hollinshead, *et al.*, 2001; Ward e Moss, 2001) e após alcançarem a membrana plasmática, a última membrana dos IEVs se funde com a membrana plasmática celular expondo no meio extracelular os vírus envelopados. Partículas que permanecem na superfície celular são chamadas CEVs e quando liberados no meio extracelular são denominados EEVs [Fig 2(12)]. CEV e EEV são fisicamente idênticos e possuem uma membrana a menos que o IEV e uma a mais que o IMV. (Sodeik e Locker, 2002; Smith *et al.*, 2002; Szajner *et al.*, 2003; revisado por Smith e Law, 2004). CEV induz a formação de filamentos de actina que direcionam o vírus para longe da célula e são importantes para a propagação célula-célula, enquanto que EEV promove a disseminação do vírus para células distantes (Smith *et al.*, 2002; Szajner *et al.*, 2003; Smith e Law, 2004).

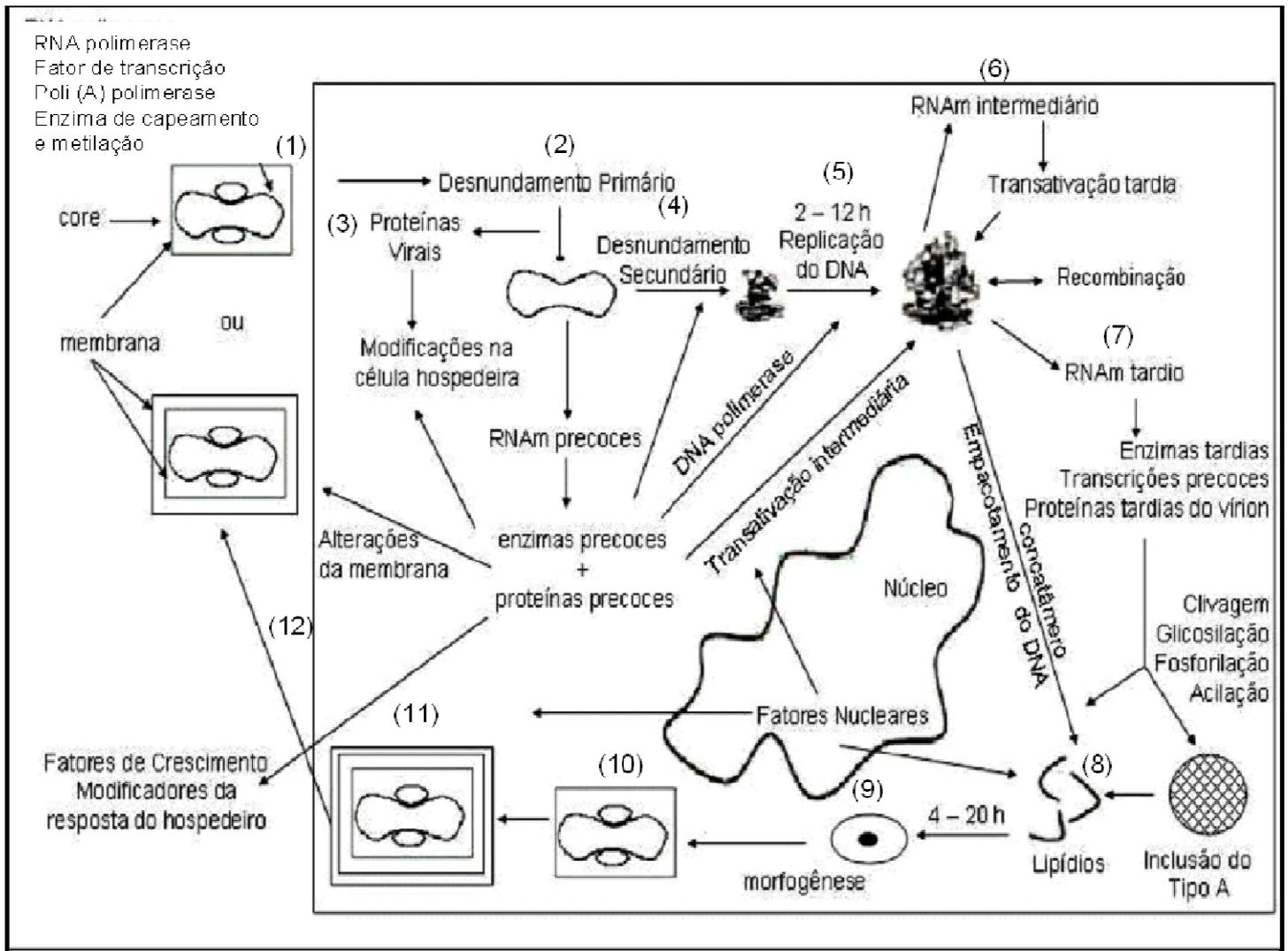


Figura 2: Ciclo de multiplicação do VV

O vírus inicia o seu ciclo ao ligar e penetrar (1) na célula, ocorrendo o desnudamento primário (2). Ainda no cerne, ocorre a transcrição de genes imediatamente precoces (3) e após a síntese de proteínas precoces, ocorre o desnudamento secundário (4) e conseqüente liberação do DNA no citoplasma. Enzimas sintetizadas na etapa inicial da infecção atuam, então, na replicação do DNA viral (5). Durante e após a replicação desse DNA, ocorre a transcrição dos genes intermediários (6) e tardios (7). Finalmente, tem-se a montagem do vírus (8-11) e este é liberado no meio extracelular (12) (fonte: modificado de Fenner, 2002).

1.3 – Vírus e mitogênese

Durante a co-evolução com seus hospedeiros os vírus desenvolveram múltiplas estratégias para manipular diferentes processos biológicos das células, Sendo assim, com a finalidade de maximizar os recursos celulares disponíveis para à sua replicação, muitos vírus, durante os momentos iniciais da infecção, podem redirecionar o metabolismo celular, através da interação de proteínas virais com proteínas celulares, induzindo células quiescentes a entrarem em proliferação. Desta forma, processos como estimulação mitogênica celular, inibição de apoptose e indução de diferenciação celular, são estratégias comumente utilizadas por diversos vírus (Boya *et al.*, 2004).

A maioria dos poxvírus, se não todos, codifica um gene cujo produto tem significativa homologia, em relação à seqüência de aminoácidos, aos fatores de crescimento epidérmico (EGF) e transformante (TGF α). Para o vírus Vaccinia essa proteína, designada como fator de crescimento do vírus Vaccinia (VGF), mostrou-se ser uma proteína glicosilada e secretável de 22 a 26 kDa, sendo liberada no sobrenadante das células infectadas (Blomquist *et al.*, 1984; Brown *et al.*, 1985; Reisner, 1985).

A atividade mitogênica de VGF tem sido considerada benéfica para a replicação do vírus, *in vitro*, desde que o mutante do VV deficiente em VGF se replica com maior eficiência em células que não estão em repouso (G0), comparando-se com a infecção em células quiescentes (Buller *et al.*, 1988_a). Magalhães e colaboradores (2001), demonstraram que o VV VGF⁻ é capaz de induzir a expressão de c-fos, o que sugere que o VV é capaz de estimular mitogênicamente às células independente de VGF. Andrade e colaboradores (2004), confirmaram que VGF é necessário para a maximizar a atividade mitogênica.

Além dos poxvírus, mecanismos semelhantes, envolvendo estratégias de replicação têm sido descritos para outros vírus, e tais fenômenos refletem um aumento na eficiência replicativa viral. Está demonstrado, por exemplo, que durante a infecção, alguns vírus como o citomegalovírus (HCMV) (Boldogh, *et al.*, 1990), vírus Epstein-Barr (Flemington e Speck, 1990), adenovírus (Su *et al.*, 1995), vírus da hepatite B (Natoli, *et al.*, 1995), e HTLV (Fujita e Shiku, 1995; Fujii, *et al.*, 1995), são capazes, de promover a

ativação do proto-oncogene *c-fos*, o qual está associado com proliferação e diferenciação celulares.

Outros vírus também são capazes de induzir um estado mitogênico nas células hospedeiras como por exemplo: Citomegalovírus (Boldogh *et al.*, 1990; Zhou *et al.*, 1999); a Papilomavirus humano (Cheng, *et al.*, 1995; Lochmuller, *et al.*, 1999; Queimado *et al.*, 1999; Kastner *et al.*, 1998; Achim, 1997), dentre outros.

1.4 – Proteínas quinases ativadas por mitógenos - MAPKs

Como já mencionamos, o estado fisiológico celular é crucial para uma multiplicação viral bem sucedida. A fisiologia celular é controlada pelas freqüentes mudanças no ambiente extracelular. As células precisaram adaptar-se para monitorar e reagir rápida e eficientemente aos estímulos extracelulares detectados pelos receptores e proteínas de membrana. Fosforilações reversíveis de proteínas reguladoras intracelulares são mecanismos efetores importantes na transmissão e modulação destes estímulos e são determinadas pela atividade relativa de proteínas quinases e fosfatases dentro da célula. Estas são freqüentemente arrançadas em sistemas complexos de sinalização que podem atuar independentemente ou interligados (Wilkinson e Millar, 2000). Desta forma, as vias de transdução de sinais retransmitem uma variedade de informações de diferentes estímulos, podendo levar a múltiplas respostas celulares.

A via de transdução de sinal das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) é a mais difundida entre os mecanismos de regulação da proliferação da célula eucariótica. Todas as células eucarióticas possuem múltiplas vias das MAPKs, cada uma sendo recrutada por diferentes estímulos (Figura 3), sendo possível à célula responder coordenadamente aos mesmos. Numerosos fatores de transcrição de eucariotos e suas proteínas co-reguladoras têm sido identificados como alvo de diferentes cascatas das MAPKs (Kyriakis e Avruch, 2001; Yang *et al.*, 2003). Sendo assim, não é surpreendente que vários vírus como por exemplo: vírus HIV tipo I (Popik *et al.*, 1998), Influenza (Pleschka *et al.*, 2001), Epstein-Barr (Chen *et al.*, 2002), Reovírus (Clarke *et al.*, 2001), Coxsackievirus B3 (Luo *et al.*, 2002), HSV-2 (Smith *et al.*, 2000),

VV (Magalhães et al, 2001), dentre outros, utilizem a via das MAPKs durante o seu ciclo de multiplicação.

As MAPKS podem ser ativadas por uma ampla variedade de estímulos através da ação em diferentes famílias de receptores, incluindo hormônios e fatores de crescimento que atuam sobre receptores tirosina quinases (insulina, EGF, PDGF) ou receptores de citocinas (hormônio do crescimento). Peptídeos vasoativos, no entanto, atuam sobre a proteína G acoplada a receptores transmembrana e polipeptídeos relacionados ao fator de crescimento transformante (TGF- β), agem sobre receptores serina-treonina quinases. Estresses ambientais como choque osmótico, radiação ionizante, choque térmico, injúria isquêmica e estresse mecânico também ativam as MAPKs (Kyriakis e Avruch, 2001).

As MAPKs modulam ativação da transcrição gênica, síntese protéica, maquinaria do ciclo celular, apoptose, diferenciação e sobrevivência celular pela sua ação catalizadora, pela fosforilação e pela ativação de um grande número de fatores de transcrição (Kyriakis e Avruch, 2001). Entretanto, está cada vez mais claro, que a regulação transcricional modulada pelas MAPKs é mais complexa. As MAPKs podem também atuar em co-ativadores e co-repressores, além de afetar a estrutura nucleossomal por induzir modificações nas histonas (Yang *et al*, 2003).

A via de ativação das MAPKs consiste de um módulo de três quinases citoplasmáticas: uma proteína ativada por mitógeno (MAP) quinase quinase quinase (MAPKKK), uma MAP quinase quinase (MAPKK) e então uma MAP quinase (MAPK) (Figura 3). As MAPKKK são serina-treonina que recebem o sinal de um receptor localizado na membrana e transmitem este sinal ativando seu substrato, uma MAPKK. Esta última, é uma quinase de dupla especificidade com potencial para fosforilar resíduos críticos de treonina e tirosina em seu substrato, as MAPK. Estas, por sua vez, representam uma família de quinases serina-treonina com potencial para fosforilar outras proteínas citoplasmáticas e translocarem-se do citoplasma para o núcleo (Hagemann e Blank, 2001).

A fosforilação de fatores transcricionais pelas MAPKs regula suas atividades por algumas vias, incluindo: sua localização celular, seus níveis de proteína, sua capacidade de ligação ao DNA, e sua interação com proteínas regulatórias (Figura 4) (Yang, *et al.*, 2003).

Eucariotos expressam pelo menos quatro grupos distintos de MAPKs; quinases reguladas por sinal extracelular (ERK) 1/ 2; quinase c-Jun N terminal/quinase ativada por estresse (JNK/SAPK) 1/2/3; proteínas p38 α / β / γ / δ e a grande MAPK regulada por sinal extracelular ERK-5. Estas quinases são ativadas por MAPKKs específicas: MEK 1/2 para ERK-1/2, MKK-3/6 para p38, MKK-4/7 para JNKs e MEK-5 para ERK-5. Cada MAPKK, entretanto, pode ser ativada por mais de uma MAPKKK, aumentando a complexidade e diversidade das vias de transdução de sinal das MAPKs. Normalmente, cada MAPKKK confere resposta a distintos estímulos, por exemplo, ativação de ERK1/2 por fatores de crescimento, depende da MAPKKK c-Raf, mas outras MAPKKK podem ativar ERK 1/2 em resposta a estímulos pró-inflamatórios (Chang e Karin, 2001; Hazzalin e Mahadevan, 2002; Tanoue e Nishida, 2003; Yang *et al.*, 2003).

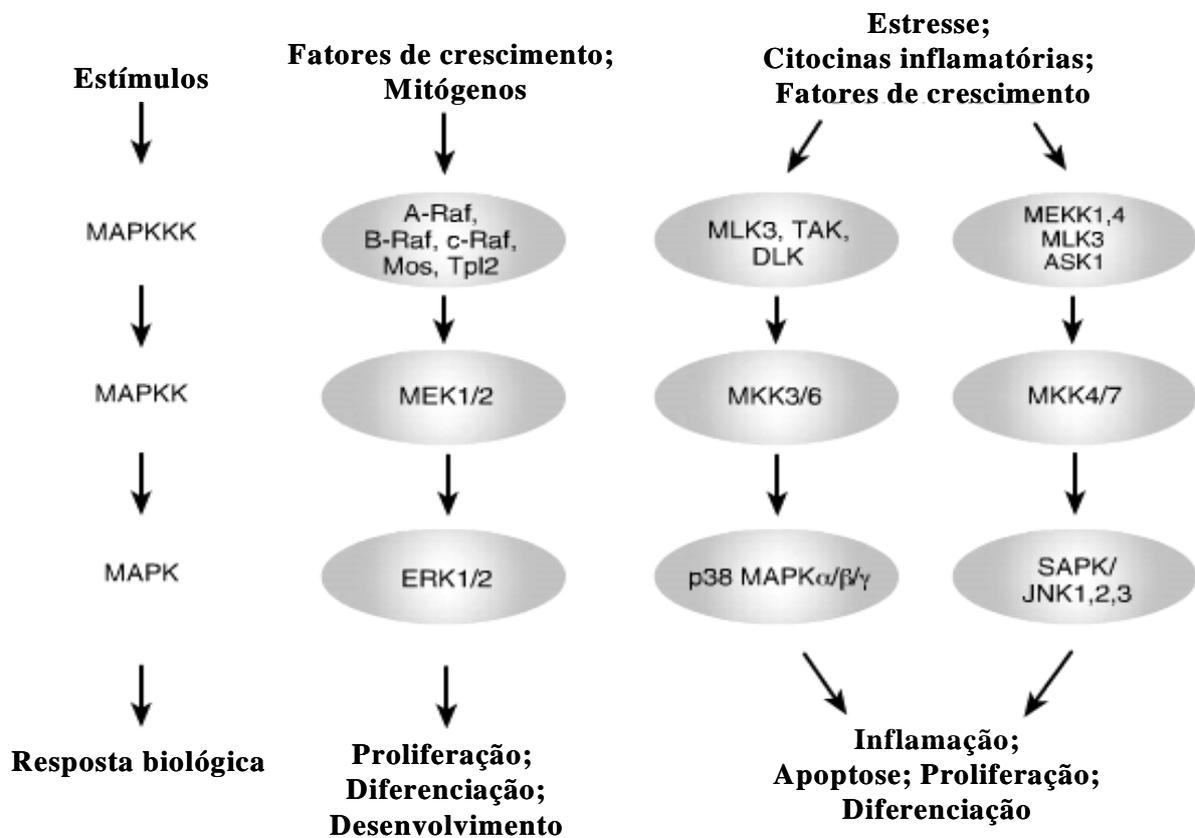


Figura 3: Vias de sinalizações das MAPKs

As cascatas das MAPKs são organizadas hierarquicamente em três módulos. MAPKs são fosforiladas e ativadas pelas MAPK-kinases (MAPKKs), as quais precisam ser previamente fosforiladas e ativadas pelas MAPKK-kinases (MAPKKKs). As MAPKKK por sua vez precisam sofrer ativação pela interação com a família de pequenas GTPases e/ou por outras proteínas quinases que conectam o receptor de superfície celular com o estímulo externo (Fonte: modificado de www.cellsignal.com).

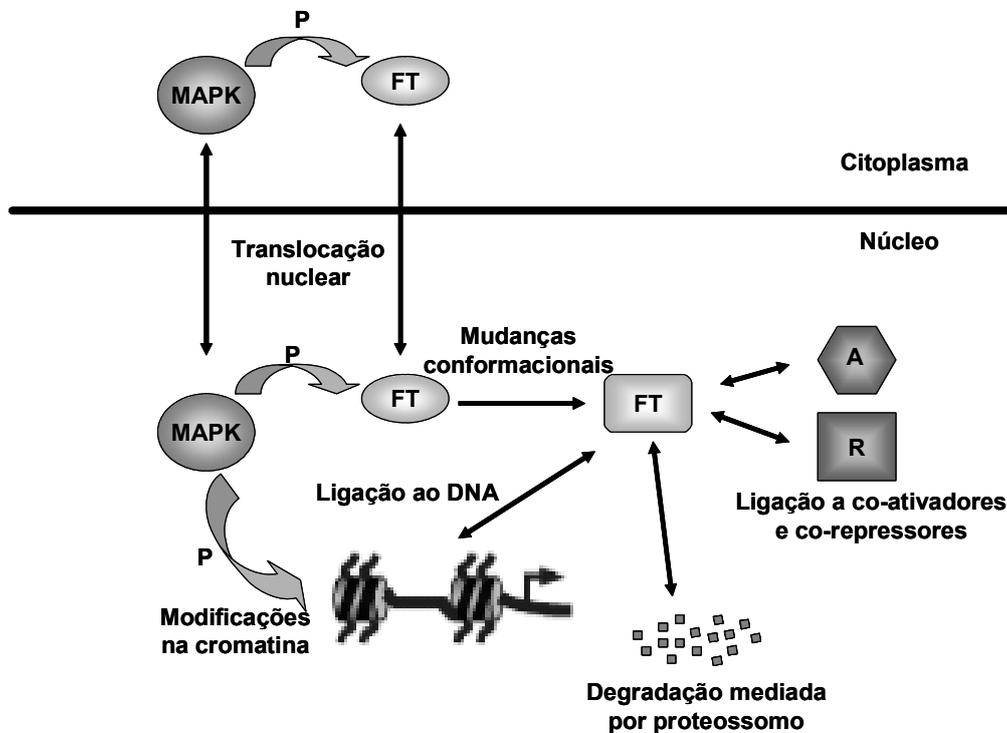


Figura 4: MAPK regulam múltiplos aspectos da transcrição.

MAPKs podem fosforilar (P) fatores de transcrição (FT) e regular sua importação e exportação para o núcleo. Uma vez fosforilados, os fatores de transcrição, freqüentemente, sofrem mudanças conformacionais levando a regulação de suas funções incluindo, ligação ao DNA e interação com co-ativadores e co-repressores. Os co-ativadores e co-repressores, assim como os componentes da remodelagem da cromatina, podem ser regulados pelas MAPKs. Em alguns casos, a fosforilação de FT modula sua estabilidade. Por isso, a sinalização por MAPK pode regular múltiplos eventos no mesmo promotor gênico (Fonte: modificado de Yang *et al.*, 2003).

1.4.1 – A quinase regulada por sinal extracelular – ERK 1/2

Dentre os módulos das MAPKs, a via MEK/ERK 1/2 será descrita mais detalhadamente, uma vez que ela é um ponto chave deste estudo.

As MAPKs mais estudadas em células mamíferas são as ERK 1/2 (p42^{MAPK} e p44^{MAPK}), elas constituem o principal módulo de sinalização conservada através da evolução que é ativada nas células de mamíferos a partir de receptores tirosina quinases, receptores acoplados à proteína G e integrinas (revisado por Pousségur *et al.*, 2002).

Sinais proliferativos, como fatores de crescimento, causam a ativação e consequente dimerização e autofosforilação do seu receptor tirosina quinase. Os resíduos de tirosina fosforilados servem como sítios de ligação para o domínio SH2 da proteína adaptadora Grb2. Grb2 através do seu domínio SH3 se liga à outro peptídeo SOS (son of sevenless), o qual é um trocador de GTP, que se liga a Ras, após a ativação do receptor. Ras (p21 KDa) é uma GTPase associada à membrana plasmática e sua regulação é conceitualmente simples, uma vez que Ras atua como um interruptor que está “ligado” quando associado à guanosina trifosfatada (GTP) e desligado quando associado à guanosina bifosfatada (GDP). Ras, uma vez ativa, recruta a serina/treonina quinase Raf (MAPKKK) para a membrana onde esta é ativada. Os detalhes da ativação de Raf ainda são desconhecidos (revisado por Hagemann e Blank, 2002; revisado por Lee e McCubrey, 2002; Ory e Morrison, 2004) (Figura 5).

O sinal transmitido é amplificado por duas quinases subseqüentes, MEK e ERK. Ambas são ativadas de maneira incomum, através de dupla fosforilação. MEK é ativada através fosforilação por Raf em dois resíduos de serina (S218 e S222). ERK é ativada pela fosforilação nos resíduos de tirosina (T202/T183) e treonina (Y204/Y185) por MEK. A amplificação desta cascata de sinalização é tão eficiente que, estima-se que a ativação de apenas 5% das moléculas de Ras seja suficiente para a ativação máxima de ERK. (revisado por Pousségur *et al.*, 2002; revisado por Chang *et al.*, 2003) (Figura 5).

Uma vez ativada, ERK possui vários substratos, tanto no citoplasma, quanto no núcleo. ERK pode regular diretamente a expressão gênica por fosforilação no núcleo de fatores transcricionais como Ets, Ap-1, Elk, Sap-1 e Myc, assim como indiretamente por fosforilação no citoplasma das proteínas da família de quinases S6 ribossomal (p90^{RSK}),

as quais podem regular fatores de transcrição (por exemplo: c-fos, c-jun e CREB), além de modificar histonas (Hindley e Kolch, 2002; Widmann *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2002; Horgan e Stork, 2003) (Figura 5).

A ativação de ERK é essencial para o crescimento celular promovendo uma resposta integrada pelo: (i) aumento da síntese de nucleotídeos, (ii) regulação da transcrição gênica pela fosforilação de fatores transcricionais e da cromatina, (iii) aumento da síntese protéica via MNK-1 (quinase mitogênica e de estresse 1) e finalmente, (iv) facilitação da formação do complexo ativo ciclina D-CDK4, que é um ponto limitante para o crescimento celular (revisado por Pousségur *et al.*, 2002).

Em uma única célula a ativação de ERK pode levar a destinos antagonistas, por exemplo, em células PC12, tanto a diferenciação, quanto a proliferação celular, requerem ativação de ERK (após estimulação por NGF ou EGF), respectivamente. Nestas células, EGF causa ativação transiente de ERK, ao contrário de NGF que ativa prolongadamente ERK. Desta forma, a duração da ativação de ERK especifica a identidade do sinal. De maneira semelhante, foi observada a correlação entre a intensidade da sinalização mitogênica em células CCL39 e a duração da estimulação de ERK. Foi demonstrado que fatores não mitogênicos induzem a ativação de ERK transientemente (menos de 15 minutos), não levando a célula à entrar em mitose. Entretanto, mitógenos induzem a proliferação celular e a ativação prolongada de ERK (superior a 6 horas). Semelhantemente, um forte ativador de ERK protege a célula da apoptose induzida por ancoragem ou ausência de soro, entretanto moderada ativação de ERK é necessária para permitir a apoptose induzida por ancoragem ou ausência de soro. Portanto, a via sinalizadora MEK/ERK pode ser finamente controlada pela duração e amplitude da ativação, além da sua localização sub-celular, para assegurar a adequada resposta biológica aos diferentes estímulos extracelulares (revisado por Pousségur *et al.*, 2002).

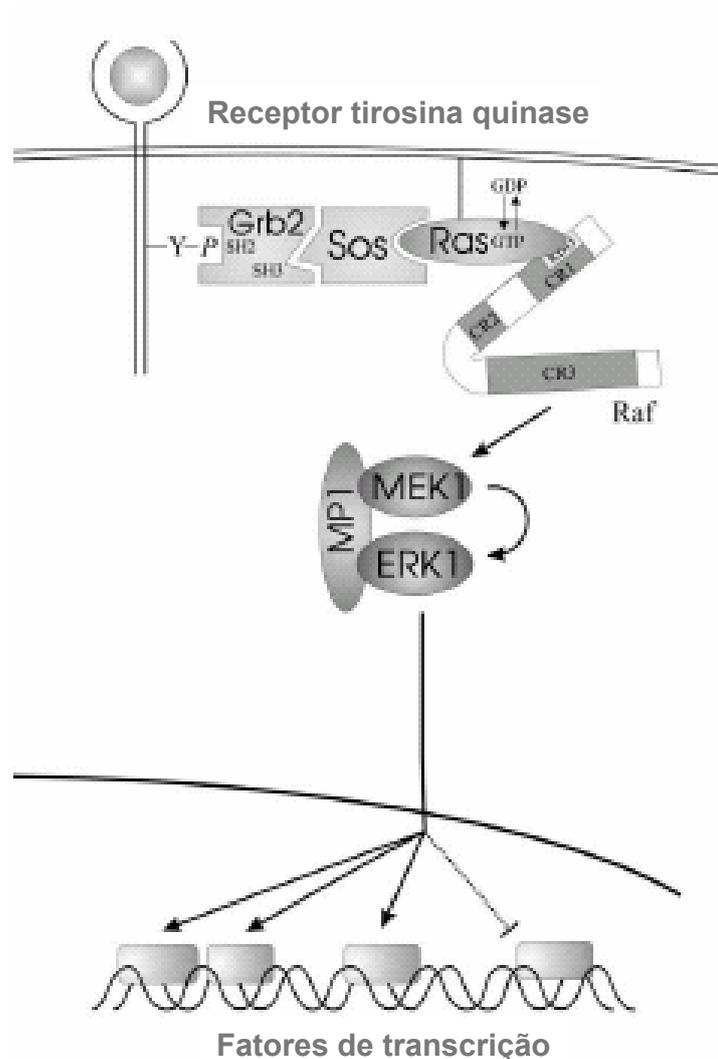


Figura 5: A transmissão de sinal desencadeada pela via Ras/Raf/MEK/ERK

A figura ilustra a via Ras/MEK/ERK. A ativação do receptor tirosina quinase culmina na sua autofosforilação e ligação de Grb2 associado a SOS. Este fator de troca de GTP ativa Ras que recruta e ativa Raf. Esta por sua vez, por dupla fosforilação, ativa MEK que através da fosforilação dos resíduos de tirosina/treonina ativa ERK. Finalmente, ERK regula a expressão gênica ativando fatores transcripcionais no citoplasma ou no núcleo (Modificado de Hagemann e Blank, 2001).

1.4.2 –Vírus e as MAPKs

A seguir estão descritos alguns exemplos de utilização de MAPKs por diferentes vírus.

O coxsackievirus B3 (CVB3) é um dos principais patógenos que causa miocardite viral. A infecção com CVB3 nos momentos tardios da infecção ativa ERK 1/2 a partir de Ras-

Raf- MEK. A inibição da ativação de ERK 1/2 provocou uma significativa redução na multiplicação viral (Luo *et al.*, 2002), sendo que a ativação de ERK 1/2 pelo CVB3 pode ser diretamente relacionado com a miocardite observada após a infecção por este vírus (Opavsky *et al.*, 2002). Recentemente, foi demonstrado que o CVB3 induz a ativação de *cyr61* (proteína 61 rica em cisteína) em células HeLa, via sinalização de JNK. Nestas células, a infecção pelo CVB3 promoveu a ativação de JNK 1/2 6 horas após a infecção celular mantendo-a até 8 horas pos-infecção (Kim *et al.*, 2004).

A infecção pelo vírus Influenza também resulta na ativação de ERK, p38 e JNK e estas parecem desempenhar papel na indução de vários mediadores inflamatórios e químicos relacionados com a patologia desta infecção (Kujime *et al.*, 2000).

Algumas proteínas virais também são capazes de ativar MAPKs. A proteína HBx do vírus da hepatite B, atua como um transativador transcricional indispensável na infecção, ativando Ras e conseqüentemente Raf e ERK (Benn e Schneider, 1994). A proteína do core do vírus da hepatite C (HCV) ativa ERK, JNK e p38, induzindo a expressão da MAP quinase fosfatase MKP-1, aumentando a proliferação celular. Estes eventos culminam na ativação de c-jun e ATF-2, mas não de Elk-1 e c-fos (Erhardt *et al.*, 2002). Também a proteína de membrana 2A do vírus Epstein-Barr promove a fosforilação de c-jun, através da ativação de JNK e ERK (Chen *et al.*, 2002).

Embora as ERKs 1/2 estejam classicamente associadas a eventos facilitadores da multiplicação viral, Wang e colaboradores (2004), demonstraram que ERK pode atuar como limitador do espectro de hospedeiro viral, levando, em células não permissivas, a produção de interferon e bloqueio da multiplicação do vírus mixoma.

1.5 – Egr-1

Uma das respostas desencadeadas pela estimulação mitogênica com fatores de crescimento é a ativação dos genes imediatamente precoces, os quais são genes de resposta primária, não requerendo a síntese de proteínas para sua transcrição. A exemplo, o proto-oncogene *c-myc* foi um dos primeiros a ser caracterizado, sendo a sua transcrição detectada uma hora após a estimulação com PDGF (fator de crescimento

derivado de plaqueta) (Kelly *et al.*, 1983), sendo c-fos ainda mais precoce (Müller *et al.*, 1984).

Os genes imediatamente precoces incluem membros da família FOS e JUN, além de outros genes que codificam proteínas reguladoras transcricionais. Como muitos dos genes de resposta imediata codificam fatores de transcrição, o produto desses genes pode ainda atuar na regulação da transcrição de outros genes celulares durante a saída do estado de quiescência (G0) para o estado proliferativo (Cooper, 1995; Wilkinson e Millar, 2000).

O gene da resposta precoce ao crescimento (*egr-1*), também conhecido como Krox-24, Zif/268, NGFI-A e TIS8, codifica o fator de transcrição, Egr-1, com massa molecular de aproximadamente 82kDa (533 aminoácidos), a partir de um mRNA de 3,3kb (Beckmann e Wilce, 1997). O fator de transcrição Egr-1 foi descoberto, simultaneamente, por diferentes laboratórios que procuravam genes essenciais ao crescimento, proliferação ou diferenciação celular. O gene *egr-1* pertence ao grupo dos genes imediatamente precoces, sendo estimulado por vários fatores ambientais, incluindo, fatores de crescimento (soro, PDGF, EGF, NGF), hormônios, neurotransmissores, citocinas, hipóxia, injúrias, mudança na pressão osmótica, choque térmico e diferentes agentes que causam danos no DNA, como luz U.V e radiação ionizante, os quais induzem drástica e rapidamente a expressão do gene *egr-1* (Hill e Treisman, 1995; Sukhatme *et al.*, 1988; Sukhatme, 1990; Nguyen *et al.*, 1998; Fu *et al.*, 2003). O gene *egr-1* atua como um ponto de convergência de várias cascatas de sinalização e a regulação do mesmo é usada como modelo para o estudo de estímulos transcricionais associados a sinalização. Egr-1 associa sinais extracelulares com respostas tardias por alterar a expressão de genes alvos da proteína Egr-1. Os produtos destes genes alvos serão responsáveis pelas alterações fisiológicas resultantes do estímulo celular e da síntese de Egr-1 (Thiel e Cibelli, 2002).

Fatores de transcrição apresentam uma estrutura modular, isto é, diferentes funções como ligação ao DNA, ativação ou repressão da transcrição, podem ser atribuídas a distintas regiões da molécula. O domínio de ativação de Egr-1 possui 3 C₂H₂ dedos de zinco, característica de uma classe de fatores de transcrição de eucariotos. Outros membros da família EGR são Egr-2, Egr-3 e Egr-4 e o produto do gene WT-1, estes contêm os domínios dedos de zinco altamente conservados, mas se diferem nas regiões

fora destes domínios (Thiel e Cibelli, 2002; Silverman e Collins, 1999; McMahon e Monroe, 1995; Cao *et al.*, 1990; Christy *et al.*, 1988; Sukhatme *et al.*, 1988).

A proteína Egr-1 através do domínio de dedos de zinco, localizado entre os aminoácidos 332 e 416, próximo a região carboxi terminal da proteína, se liga a uma seqüência consenso 5'-GCG(T/G)GGGCG-3' denominada EBS (Egr Binding Site) presente no promotor de vários genes incluindo, fatores de crescimento (por exemplo: PDGF-A e B, fator de crescimento ácido de fibroblasto - FGF e fator estimulador de colônia de macrófagos - M-CSF) e citocinas, por exemplo: TGF- β , TNF- α , IL-1, IL-2, sendo esta ligação dependente de zinco. A transcrição gênica desencadeada por Egr-1 pode ser dependente de co-ativadores como a proteína de ligação a CREB (CBP) e p300, que interagem com Egr-1 aumentando assim sua transativação (Cao *et al.*, 1990; Silverman e Collins, 1999; Meyer *et al.*, 2002). Ao contrário do domínio de ligação ao DNA o domínio de ativação de Egr-1 não está bem caracterizado, um extenso domínio de ativação foi mapeado entre os aminoácidos 3-281 (Gashler *et al.*, 1993; Thiel *et al.*, 2000).

Surpreendentemente, um domínio inibitório entre o sítio de ativação e o domínio de ligação ao DNA foi identificado, funcionando como um sítio para dois co-fatores transcricionais, denominados proteínas de ligação ao NGFI-A 1 e 2 (NAB1 e NAB2). Ambos NAB1 e 2 bloqueiam a atividade biológica de Egr-1 (Russo *et al.*, 1995; Svaren *et al.*, 1996; Thiel *et al.*, 2000).

A capacidade de Egr-1 em ativar ou reprimir um gene alvo depende não somente dos co-fatores transcricionais já citados, como também do tipo celular, da ação conjunta de outros fatores de transcrição e do nível de fosforilação da própria proteína Egr-1, que altera sua capacidade de interação ao DNA e proteínas. O conjunto de todos estes fatores e condições, é que determinarão a resposta desencadeada por Egr-1 em um promotor específico (Silverman e Collins, 1999).

Os elementos genéticos presentes na região 5'flanqueadora, isto é, região promotora, do gene *egr-1* conectam as diferentes cascatas de sinalização com a indução da transcrição deste gene. Seu promotor possui múltiplos sítios regulatórios, dentre eles dois sítios AP1, 4 sítios SP1, 2 elementos de resposta ao cAMP (CRE), 2 elementos de ligação ao *egr* (EBS) e 5 CarG boxes ou SRE (elemento de resposta ao soro) (Tsai-Morris *et al.*,

1988; Christy e Nathans, 1989; Rupprecht *et al.*, 1994, Meyer *et al.*, 2002; Thiel e Cibele, 2002). Dois tipos de fatores de transcrição são requeridos para a atividade transcricional mediada por SRE, a saber, o fator de resposta ao soro (SRF) e o fator do complexo ternário. Este último é constituído pelas proteínas Elk-1, Sap1 ou Sap2, as quais precisam interagir com o DNA e ligar ao SRF para exercer a atividade biológica. Elk-1 é fosforilada pelas MAP quinases JNK e ERK, levando ao aumento da atividade de ligação ao DNA, formação do complexo ternário e à transcrição mediada por SRE. A expressão constitutiva da MAPKK-1 ativada, quinase esta responsável pela ativação de ERK, fortemente estimula a atividade do promotor de *egr-1*. Da mesma maneira, o acúmulo do mRNA de *egr-1* em resposta ao soro, PDGF, e PMA (phorbol 12 myristate 13 acetate) é quase completamente dependente da ativação da via de sinalização Ras-Raf-MEK-ERK (revisado por Thiel e Cibelli, 2002). No entanto, a indução de *egr-1* por sinais de estresses como choque térmico, luz U.V., anisomicina e arsenito de sódio, ocorre via JNK e p38, que após serem fosforiladas induzem a atividade transcricional de *egr-1*, através de Elk-1 (Lim *et al.*, 1998). Estes dados sugerem que a indução da expressão do gene *egr-1* por fatores de crescimento ou sinais de estresses podem ser mediados por diferentes subgrupos de MAP quinases, os quais podem também levar a diferentes atividades biológicas de Egr-1 e de seus genes alvos (Lim *et al.*,1998).

A participação do gene *egr-1* também está descrita em algumas infecções virais, como por exemplo pelo vírus: T-lymfoftrópico humano (HTLV-I) (Black *et al.*,1997); Herpes simples (HSV) (Tatarowicz *et al.*, 1997); Epstein-Barr (EBV) (Calogero *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 2004); Citomegalovirus (Yoo *et al.*, 1996a); Hepatite B (Yoo *et al.*, 1996b) e pelos retrovírus HIV (Dron *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2002) e espumavírus (Wagner *et al.*, 2000).

1.6 – Silenciamento gênico por siRNA

Após o seqüenciamento gênico completo do genoma de muitos organismos, o próximo desafio, uma vez encontrado os genes putativos é descobrir suas funções. Até agora uma grande lacuna existe entre o conhecimento das seqüências gênicas e a função das suas proteínas. As avaliações das funções gênicas podem ser realizadas usando ferramentas de genética reversa, como por exemplo camundongos “knock-out”, oligos antisense e

ribozimas. Estas abordagens são superadas pelo RNA interferente (RNAi), cujo potencial para a investigação de função proteica é superior as técnicas citadas anteriormente. Já conhecido há alguns anos, RNAi é baseado num mecanismo de defesa antiviral ancestral em eucariotos inferiores. O silenciamento gênico é induzido por dupla fita de RNA e seu processamento em pequenos RNAs interferentes (siRNA) de aproximadamente 21-23 nucleotídeos (nt), que causam a degradação de mRNAs endógenos homólogos. A via pela qual o RNAi atua ainda precisa ser mais detalhada, mas atualmente é a primeira escolha de abordagem para gerar fenótipos com perda de função numa grande variedade de espécies eucariotas, como nematóides, moscas, plantas, fungos e mamíferos. RNAi também representa uma ferramenta potencial, extremamente poderosa, para abordagens terapêuticas no tratamento de doenças infecciosas por vírus ou parasitas invasores (Arenz e Schepers, 2003, Wadhwa *et al.*, 2004).

A interferência de RNA é mediada por pequenos RNAs interferentes que são gerados a partir de extensos RNAs dupla fita (dsRNAs) de origem exógena ou endógena. Os dsRNAs são clivados por uma proteína tipo ribonuclease III (RNase III) chamada Dicer (Figura 6). Esta possui um domínio helicase N-terminal, um motivo PAZ (PIWI/Argonaute/Zwille), um domínio ligante a dsRNA e dois motivos RNase III na porção C-terminal. Homólogos da Dicer podem ser encontrados em *S.pombe*, *C.elegans*, *Drosophila*, plantas e mamíferos, sugerindo que a regulação mediada por RNA é evolutivamente antiga e pode ser crucial em mecanismos biológicos. O siRNA gerado pela Dicer é um fragmento curto de RNA dupla fita, com aproximadamente 22nt, contendo 2nt livres na extremidade 3'. Cada fita possui um grupo fosfato 5' e um grupo hidroxila 3'. siRNA é incorporado num complexo chamado RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA), que procura e cliva o mRNA complementar ao siRNA (Figura 6). Inicialmente o complexo RISC contendo o siRNA é inativo, precisando ser transformado na forma ativa (RISC*), que envolve perda de uma fita do dsRNA através da sua atividade helicase. (revisado por Kim, 2003; eWadhwa *et al.*, 2004).

Estudos bioquímicos usando extratos de células *Drosophila* S2 e de células humanas HeLa revelaram a presença de proteínas da família argonauta no complexo RISC. A proteína Argonauta-2 (Ago-2) foi encontrada em *Drosophila* e duas isoformas de eIF2C

(eIF2C1 e eIF2C2) em humanos. A família argonauta é formada por proteínas de aproximadamente 100 kDa, altamente básicas, que contêm dois domínios em comum, PAZ e PIWI. O domínio PAZ consiste de aproximadamente 130 aminoácidos e normalmente está localizado no centro da proteína. O domínio C-terminal PIWI é altamente conservado possuindo aproximadamente 300 aminoácidos (revisado por Kim, 2003). O domínio PAZ da Ago-2 foi caracterizado por estudos estruturais como um domínio de ligação ao siRNA.(Lingel *et al.*, 2004).

Várias características típicas da atividade nucleolítica do RISC foram determinadas. RISC cliva a fita do mRNA alvo entre as posições 10 e 11, contadas a partir da 5' - 3' terminal do siRNA guia (Elbashir *et al.*, 2002). O produto clivado apresenta um grupo fosfato 5' e um grupo hidroxila 3' (Martinez e Tuschl, 2004; Schwartz, 2004). Finalmente, a atividade do RISC é dependente de magnésio (Schwartz, 2004). Além das proteínas da família Argonauta, as RNA helicases Germin 3 e Germin 4 e uma proteína de função desconhecida fazem parte do complexo RISC (Wadhwa *et al.*, 2004).

Rand e colaboradores 2004, demonstraram que a atividade do RISC é gerada por uma única proteína Argonauta e, através de estudos de bioinformática, evidenciaram que o domínio PIWI da Ago-2 é similar à endonuclease V em sequência e estrutura secundária, sugerindo que o domínio PIWI confere à atividade nucleolítica ao RISC. Embora os autores apresentaram fortes evidências que apenas a proteína Ago-2 é suficiente para a atividade de RISC, esta possibilidade não foi demonstrada conclusivamente, uma vez que, outras proteínas sempre estão presentes no complexo ativo.

Moléculas extensas de dsRNA possibilitam o efetivo silenciamento da expressão gênica por apresentarem várias seqüências de siRNAs do mRNA alvo. A aplicabilidade desta técnica é limitada em células de mamíferos, uma vez que a introdução de longos dsRNAs (maiores que 30nt) nestas células induzem uma resposta seqüência inespecífica do sistema interferon. O sistema interferon induz a síntese da proteína quinase dependente de dsRNA (PKR) e 2' 5'oligoadenilato sintetase (2' 5'AS), as quais dependem de dsRNA para que sejam ativadas. A ativação de PKR, resulta na fosforilação do fator de iniciação de síntese protéica de eucarioto (eIF-2 α), levando a uma inibição global da tradução de mRNAs e à apoptose. A ativação de 2'5'AS

estimula a RNase L a clivar moléculas de RNA fita simples inespecificamente (revisado por Dyxhoorn *et al.*, 2003; Wadhwa *et al.*, 2004).

Vários grupos de pesquisa demonstraram que a introdução de siRNA exógenos (aproximadamente 21nt) em células de mamíferos eram suficientes para mediar o silenciamento gênico específico, sem incitar os efeitos não específicos do sistema interferon (Elbashir *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002). Estas descobertas foram um importante marco e possibilitaram o uso de siRNA como um protocolo padrão para silenciar a expressão gênica.

A utilização de siRNA para inibir a produção viral tem sido amplamente documentada e podemos citar, por exemplo: Influenza (Ge *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2003); Poliovírus (Gitlin *et al.*, 2002; Saleh *et al.*, 2004); vírus da hepatite C (Kapadia *et al.*, 2003). siRNA também foi capaz de inibir a transcrição de genes virais como, por exemplo, o gene E6 do Papiloma vírus humano 16 em tumores malignos (Yoshinouchi *et al.*, 2003) e os transcritos gag e env do HIV em células CD4-positivas (Capodici *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002). Em resumo, o desenvolvimento do RNAi, e sua aplicação contra infecções virais, pavimentam um novo caminho em direção a testes clínicos.

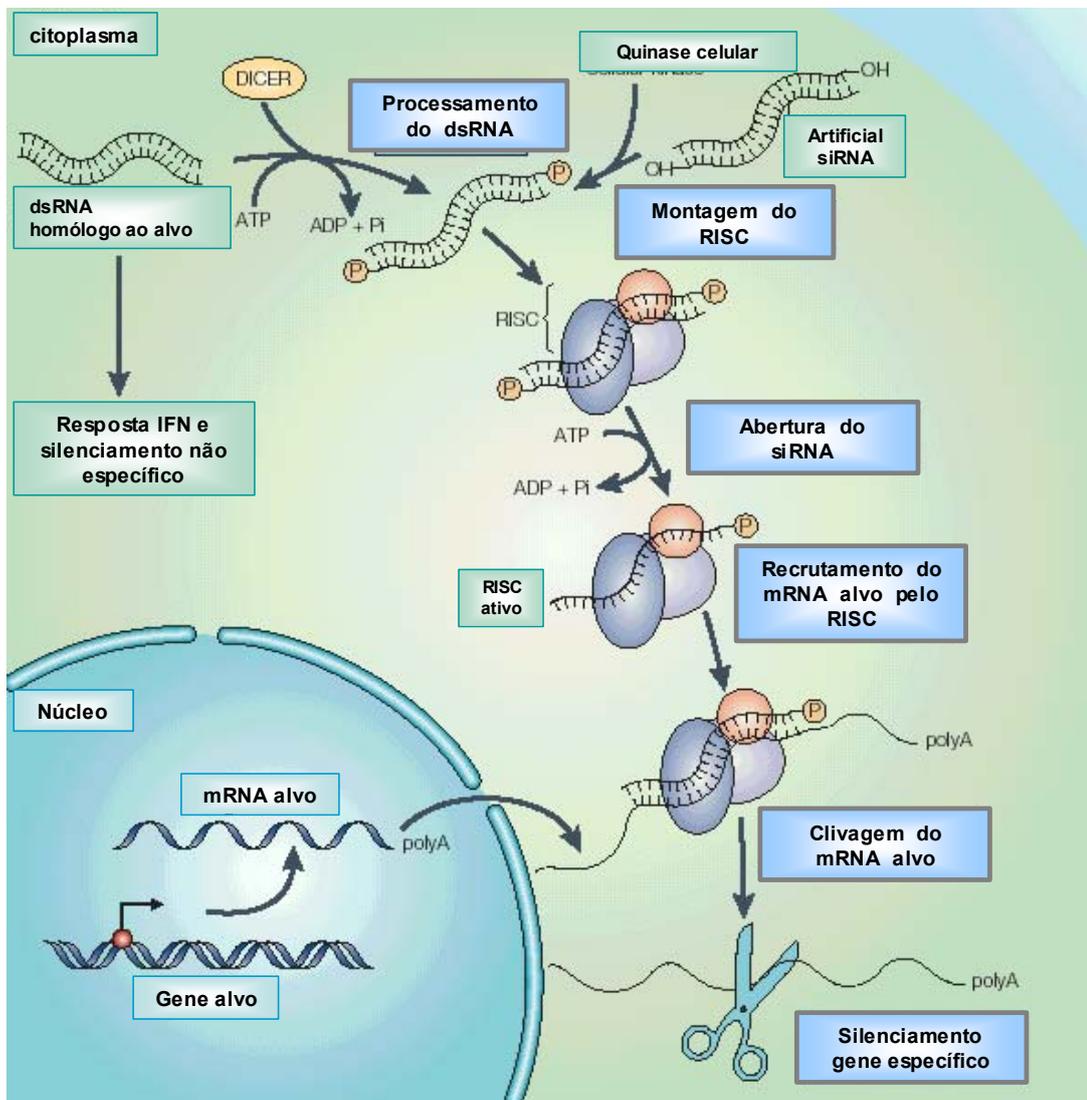


Figura 6: Silenciamento gênico por RNA interferente

Moléculas extensas de RNAs dupla fita (dsRNA) são clivadas pela DICER (uma proteína RNase III) em RNAs duplexes de 21-23 nucleotídeos, os quais contêm duas bases não pareadas na extremidade 3' de cada fita. Esta reação foi documentada em sistemas de eucariotos inferiores. Em eucariotos superiores, dsRNA promovem uma inibição inespecífica da expressão gênica através da ativação do sistema interferon. Pequenas moléculas artificiais de RNAs (siRNAs) são convertidas em siRNAs funcionais, processo que conta com a participação de uma quinase celular, os quais possuem um grupo 5' fosfato. siRNAs reúnem-se com proteínas celulares formando o complexo de silenciamento induzido por RNA, o qual possui uma helicase que desenrola o RNA, o siRNA dupla fita e uma ribonuclease que cliva o mRNA alvo. O complexo RISC é direcionado pela fita antisenso aberta, através da complementariedade de seqüência, este encontra o RNA mensageiro alvo e o cliva. (Fonte: adaptada de Stevenson *et al.*, 2003).

2 - RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Durante o curso da evolução, os vírus adquiriram múltiplos mecanismos para manipular a resposta do hospedeiro, incluindo a habilidade para inibir apoptose, desregular a produção de citocinas, diminuir a resposta imunológica do hospedeiro e promover proliferação e/ou diferenciação celular.

Um componente central em todas estas estratégias é a habilidade de manipular e intervir nas vias de sinalização que regulam a comunicação celular, ou pela expressão de genes e proteínas virais que interferem na sinalização de células infectadas ou pela ativação de receptores celulares que tem função inata no processo de ligação e penetração do vírus na célula. A interação entre o vírus e o hospedeiro, inicia-se com o contato do vírus na membrana celular, primariamente envolvendo processos que controlam vias endógenas como as vias que regulam o ciclo celular e dos mecanismos de respostas imunológicas. O objetivo final desta manipulação é a criação de um ambiente intracelular adequado à produção de novas progênes virais. Portanto, a inter-relação entre o vírus e elementos da malha de sinalização celular pode ter importantes conseqüências, tanto no tropismo viral, quanto na patogenia das infecções virais.

Interferir com as cascatas de sinalização envolvendo MAPKs é uma eficiente via de manipulação da maquinaria celular pelos vírus, uma vez que as MAPKs atuam na grande maioria das funções celulares. Desta forma as vias MAPKs vêm sendo cada vez mais investigadas, tanto nas suas funções celulares, quanto no seu papel em infecções virais e conseqüente multiplicação.

Como exemplos de interações vírus-MAPKs, podemos destacar, dentre outras, a proteína do core do HCV que ativa ERK, JNK e p38, induzindo a proliferação celular; a utilização da via Ras- Raf- MEK e ERK e da via JNK pelo CVB3, durante a sua multiplicação, a inibição da apoptose de células do hipocampo pela ativação de MEK-ERK1/2 após infecção pelo Herpes vírus simples 1 e a proteína latente de membrana 1 codificada pelo EBV (LMP1), que ativa constitutivamente as vias JNK e NF-kB e que contribuem para o efeito oncogênico de LMP1.

Os poxvírus são, particularmente, especialistas na arte de micromanipular as respostas do hospedeiro contra a infecção viral, uma característica facilitada pela sua enorme capacidade codificadora gênica, associada à produção de várias proteínas

imunomodulatórias, e também com potencial para influenciar a transdução de sinal intracelular e promover a multiplicação viral.

Estudos pioneiros realizados em nosso laboratório, demonstraram que VV é capaz de estimular mitogenicamente as células durante as etapas precoces da infecção (até 1 hora pós-infecção), através de MEK/ERK e PKA. Posteriormente, foi verificado que a infecção pelo VV promove a ativação sustentada de ERK 1/2 e RSK-2, sendo esta ativação dependente da progressão do ciclo de multiplicação viral, da síntese “*de novo*” de proteínas e sua manutenção independente da síntese do DNA viral. A ativação pelo VV da via MEK/ ERK1/2 / RSK-2 leva a fosforilação do fator de transcrição Elk-1, que participa do complexo ternário, podendo ativar a transcrição do gene de resposta precoce ao crescimento (*egr-1*). A utilização da via acima citada é biologicamente relevante para o ciclo de multiplicação viral, uma vez que o seu bloqueio causa profundos reflexos na expressão do gene viral da timidina quinase, na replicação do seu DNA e na produção da sua progênie.

Como a expressão de *c-fos* antecede a expressão de outros genes envolvidos com mitogênese, e esta expressão é mediada pelo elemento regulatório SRE presente no promotor de *c-fos* e sabendo da ativação sustentada da via MEK/ ERK1/2 /RSK/ Elk-1 pelo VV, procuramos analisar mais detalhadamente, a participação de Egr-1 durante a infecção por este vírus. Desta forma, poderíamos caracterizar um programa co-estimulatório de genes envolvidos com mitogênese, os quais seriam ativados precocemente em resposta à infecção pelo VV, com possíveis reflexos para a biologia viral. Além disso, a caracterização da indução de Egr-1 pelo VV, realizada inicialmente, além de analisar um período restrito da infecção, baseou-se na utilização apenas de inibidor farmacológico de MEK. Havia, portanto, a necessidade de se estender esta análise durante todo o ciclo de multiplicação viral e apoiando-se em evidência genética do envolvimento de MEK/ERK.

Outro aspecto relevante a se considerar na análise do significado funcional de Egr-1 durante a infecção pelo VV, é que a proteína Egr-1 desempenha papel regulatório importante na infecção celular causada por outros vírus, como aqueles da família herpes, tais como: vírus herpes simples, vírus Epstein Barr e citomegalovírus, além dos vírus HTLV-I/II, HIV e vírus da hepatite B.

Desta forma, acreditamos que a ativação múltipla de proteínas quinases e genes envolvidos com mitogênese e/ou reprogramação celular em resposta à infecção pelo vírus Vaccinia, criariam as condições celulares necessárias e suficientes à geração de novas progênes virais, sendo que a compreensão desta complexa interação dos poxvírus com seus hospedeiros é de fundamental importância.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

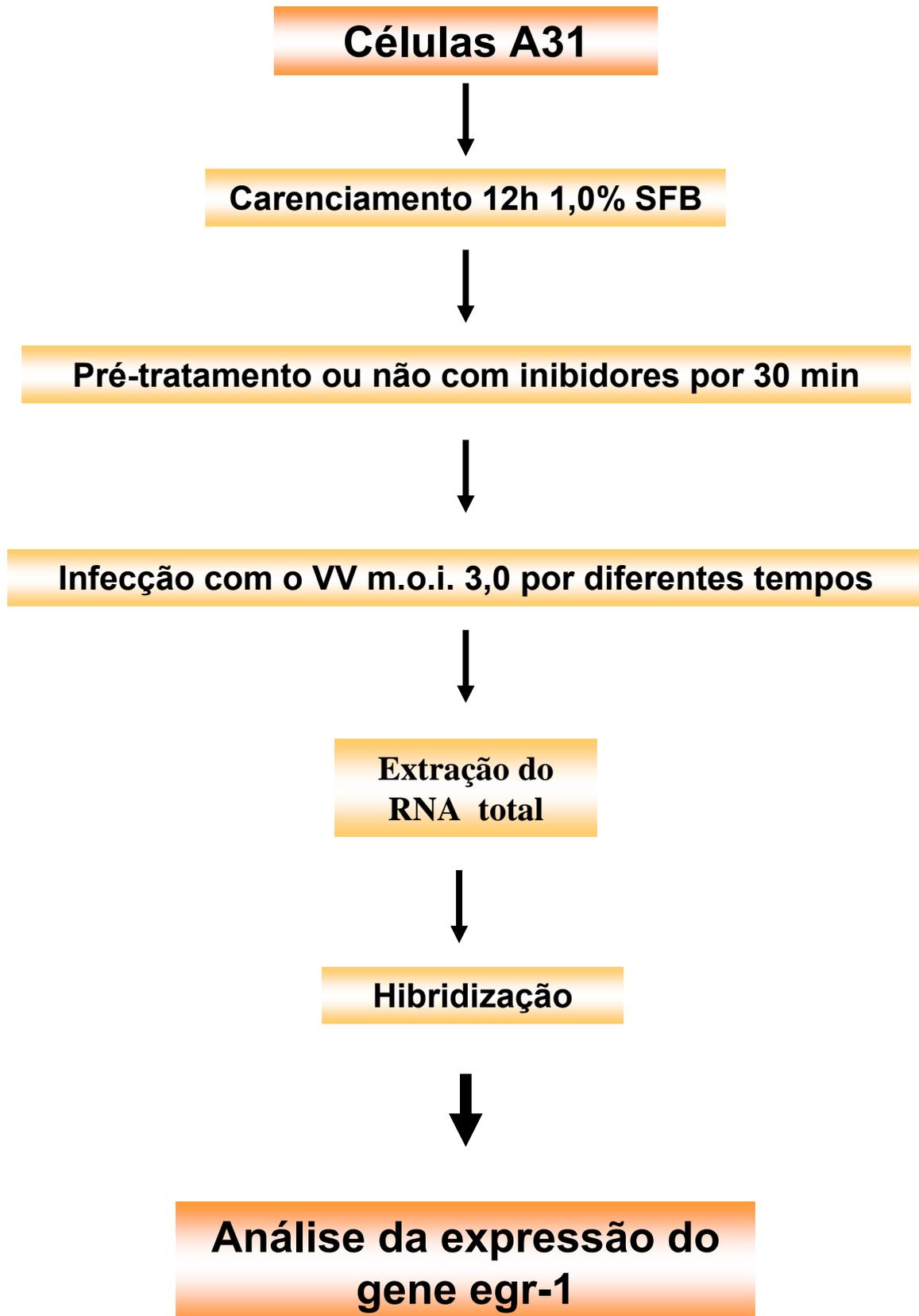
Analisar a expressão do gene de resposta precoce ao crescimento (*egr-1*) após infecção celular com o vírus Vaccinia, bem como avaliar a relevância funcional da proteína Egr-1 na multiplicação deste vírus.

3.2 - Objetivos específicos

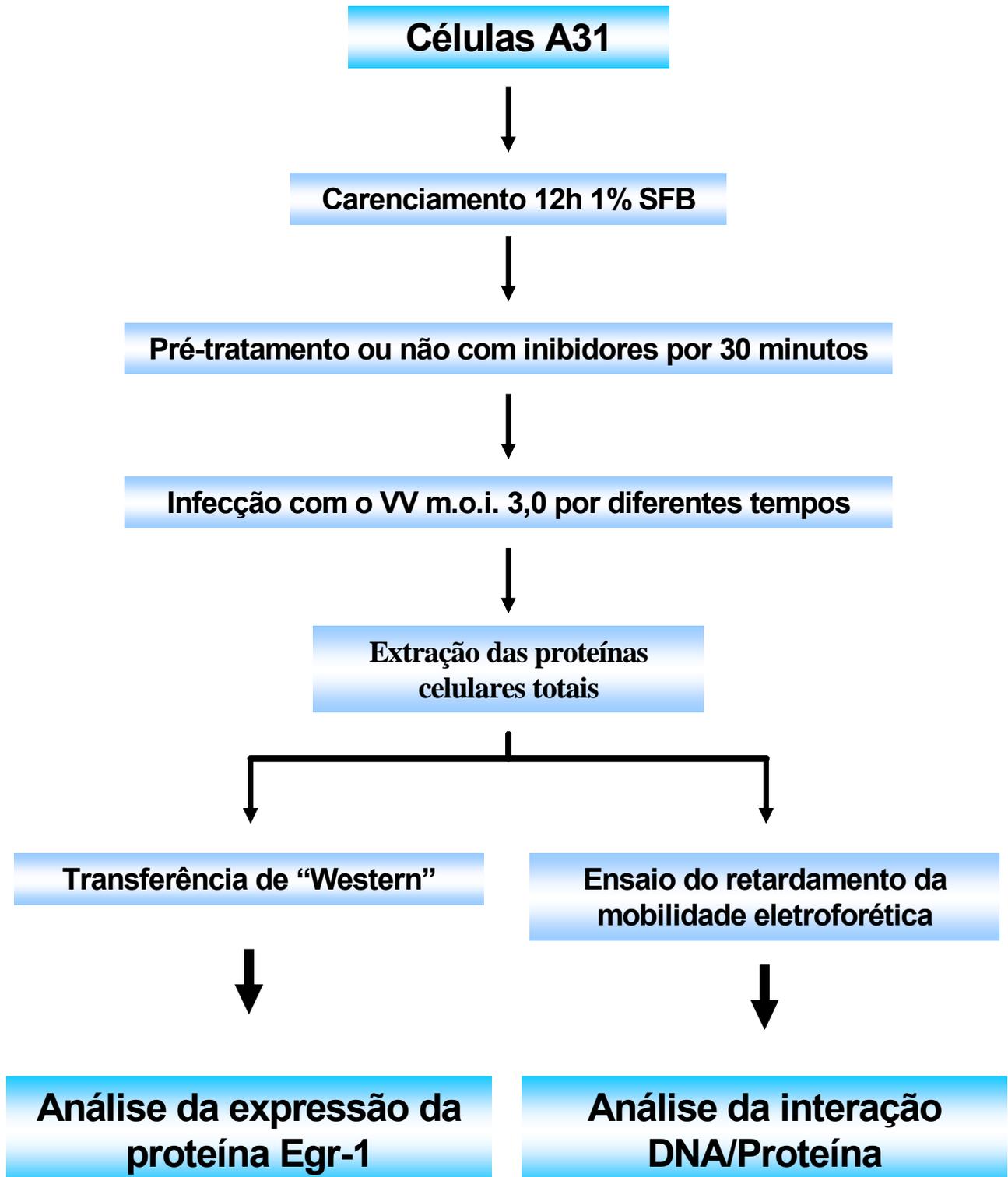
1. Determinar a cinética de acumulação do mRNA e da proteína Egr-1, após infecção celular pelo vírus Vaccinia.
2. Analisar o efeito da multiplicidade de infecção (m.o.i.) na indução de *egr-1*.
3. Verificar o efeito da síntese protéica e da inativação por luz ultra-violeta da partícula vírica na indução da expressão de *egr-1* em células infectadas pelo VV.
4. Analisar a estabilidade do mRNA do gene *egr-1*, após indução pelo VV.
5. Averiguar a participação de serinas treoninas quinases (STK) e da MAPK MEK na indução de Egr-1 em resposta a infecção celular pelo VV.
6. Investigar o aumento da atividade de ligação aos elementos regulatórios EBS e AP-1, em células infectadas pelo VV, assim como a participação das proteínas Egr-1 e JUN nestes complexos.
7. Analisar a importância funcional da via MEK / ERK 1/2 na multiplicação do VV.
8. Gerar e caracterizar clones celulares expressando de forma estável siRNA para Egr-1 e avaliar a relevância funcional de Egr-1.
9. Analisar a localização celular de Egr-1 induzida em resposta á infecção celular pelo VV.

4 – ESTRATÉGIA DE TRABALHO

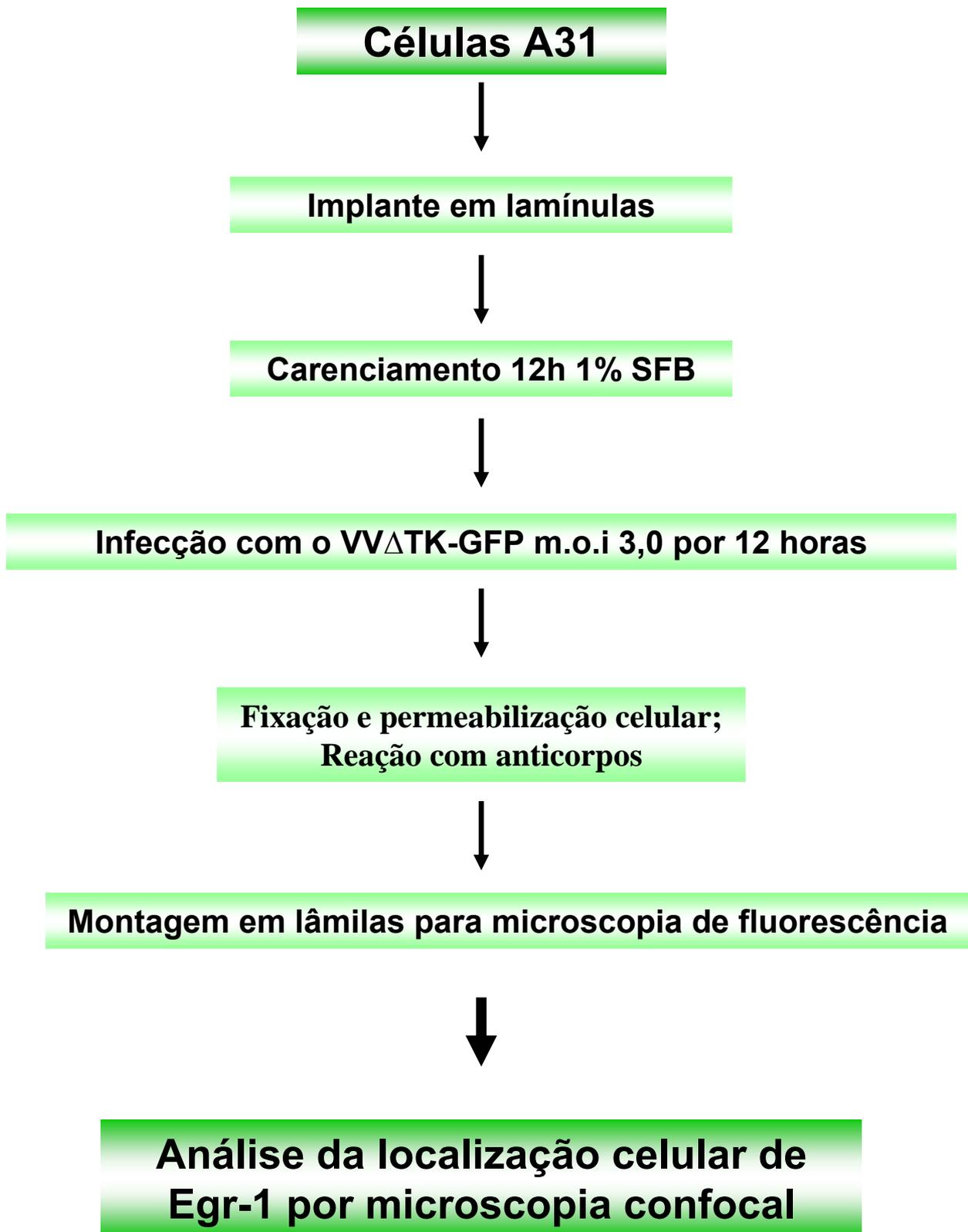
4.1 - Análise da acumulação do mRNA do gene egr-1 em resposta à infecção pelo VV



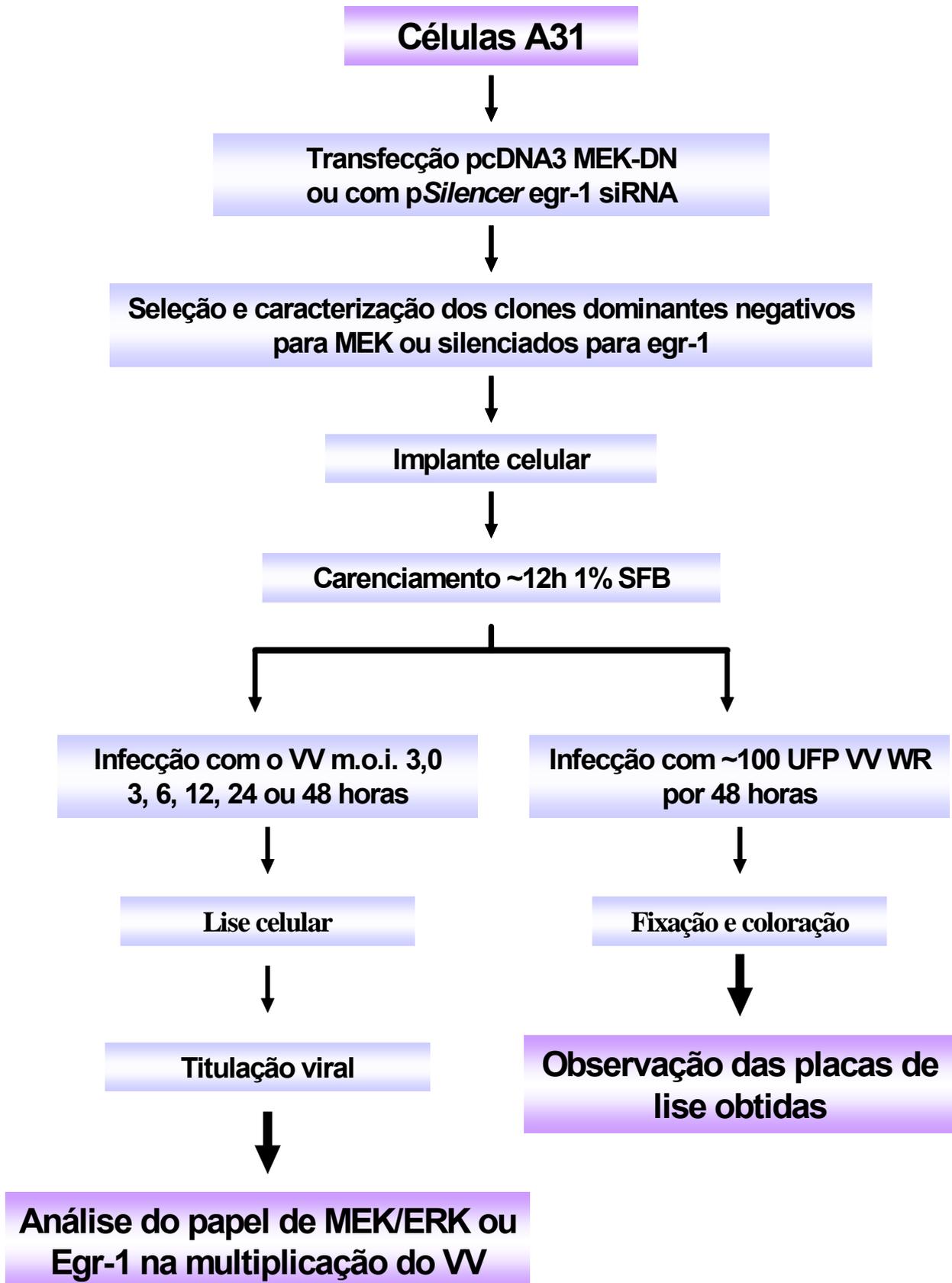
4.2 – Análise da expressão da proteína EGR-1 e da interação DNA/Proteína em resposta à infecção viral



4.3 - Análise da localização celular de Egr-1 em resposta à infecção viral



4.4 – Análise da participação de MEK/ERK e da proteína Egr-1 na multiplicação e fenótipo de placa de lise viral



5 – MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 - Células

5.1.1 - Vero

As células VERO, as quais são fibroblastos de linhagem contínua, derivadas de rim de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*), foram obtidas originalmente da American Type Culture Collection (ATCC) Maryland, USA, na passagem de n^o-126, sendo cultivadas em nosso laboratório em meio mínimo de Eagle autoclavável (Auto pow), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (Gentamicina 40µg/ml, Penicilina 200 U/ml, Fungizona 1,5µg/ml), mantidas a 37°C. Esta linhagem celular foi utilizada para a multiplicação dos vírus VV WR e VV-ΔTK-GFP e para suas titulações.

5.1.2 - A31 (ATCC: CCL-163)

As células A31, clone derivado de fibroblasto de camundongo Balb/c 3T3, gentilmente cedidas pela Dra M.C. Sogayar do Departamento de Bioquímica da USP, foram mantidas em meio DMEM, suplementado com 7% de SFB e antibióticos (Gentamicina 40µg/ml, Penicilina 200 U/ml, Fungizona 1,5µg/ml). Esta linhagem celular foi escolhida por ser apenas imortalizada, não apresentando alterações nas vias de transdução de sinais, normalmente verificadas com células transformadas, o que nos possibilitou análises mais completas do gene e da proteína EGR-1 em resposta a infecção pelo VV, bem como seu papel biológico na multiplicação deste vírus.

Nos diferentes ensaios, as células foram crescidas até 90% de confluência, quando foram carenciadas em meio DMEM suplementado com 1% de SFB por 12 horas, sendo então pré-tratadas ou não com a droga de interesse por 30 minutos e a seguir infectadas com o VV WR ou VVΔTK-GFP nas multiplicidades de infecções (m.o.i.) 3,00 ou 10,00.

Esta linhagem também foi utilizada para a obtenção dos clones silenciados para o gene *egr-1* ou expressando dominância negativa para MEK-1.

5.2 – Vírus Vaccinia

O vírus Vaccinia WR (Western Reserve) foi cedido pelo Dr C. Jungwirth (Universität Würzburg, Germany) e o VV- Δ TK-GFP nos foi gentilmente doado pelo Dr Peter C. Turner (Department of Molecular Genetics and Microbiology, College of Medicine, Gainesville, Florida, 32610, USA). Ambos os vírus foram multiplicados em células Vero e purificados em gradiente de sacarose. A inativação do VV WR por luz ultra-violeta foi realizada por exposição à luz UV por 5 minutos e confirmada pela ausência de efeito citopático após 72 horas de infecção de células Vero.

5.2.1 – Multiplicação viral

Os vírus foram multiplicados em células Vero com aproximadamente 95% de confluência, estas foram infectadas com o VV, utilizando-se a m.o.i. de 0,01, em meio sem soro por 1 hora, para a adsorção do vírus. Após adsorção, foi adicionado meio suplementado com 1% SFB e as células foram mantidas à 37° sendo observadas ao microscópio óptico até que atingisse 90% de efeito citopático (E.C.P), quando foram lavadas com PBS 1X, coletadas e congeladas para posterior purificação.

A purificação foi realizada conforme o método descrito por Joklik (1962). Resumidamente, as células coletadas foram lisadas mecanicamente em “douncer”, em tampão de lise (1mM de MgCl₂; 10mM de Tris-HCl pH 7,0; 10mM de KCl), e centrifugadas a 2500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante (suspensão viral e restos celulares) foi coletado e centrifugado em colchão de sacarose a 36% a 14000 rpm (rotor AH 629 Sorvall) por 2 horas a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 10mM, pH 8,0, e submetido a sonicação por 2 ciclos de 30 segundos (Sonic Desmembrator-50, Fisher Scientific-USA). A seguir, a suspensão viral foi centrifugada em gradiente de sacarose variando de 25 a 40% a 12000 rpm por 45 minutos a 4°C (rotor AH 629 Sorvall). A banda inferior, correspondente aos vírus (partículas virais completas e defectivas sendo mais de 98% IMV), foi coletada e centrifugada em tampão Tris-HCl 10mM, pH 8,0 a 20000 rpm por 1 hora a 4°C (rotor AH 629 Sorvall). O sedimento foi coletado, ressuspenso no mesmo tampão, aliquotado e congelado a -70°C.

5.2.2 – Titulação viral

A titulação do estoque de vírus obtido foi realizada de acordo com o método descrito por Campos e Kroon (1993). Brevemente, as células Vero foram crescidas por 10 a 16 horas, sendo $1,5 \times 10^6$ células/câmara (35 mm). Duzentos microlitros de uma série de diferentes diluições, realizadas na razão de 10, da suspensão contendo o vírus a ser titulado, foram inoculados as culturas recém confluídas, sendo uma, falsamente infectada, mantida como controle celular. Após 1 hora de adsorção, o meio de inóculo foi removido e meio Auto pow contendo 1% de SFB adicionado. A revelação foi realizada 48 horas pós-infecção através da fixação das culturas com formaldeído a 10% em PBS 1X e coloração com solução 1 % (p/v) de cristal violeta em PBS 1X. As diluições contendo entre 30 e 300 placas de lise foram utilizadas para determinação do número de unidades virais formadoras de placas (UFP) por ml de estoque.

5.3 – Drogas e Anticorpos

Os inibidores específicos de MEK, PD98059 e UO126 foram, respectivamente, adquiridos da Calbiochem, La Jolla, USA e Cell Signalling Technology - Beverly, MA, USA. As drogas Actinomicina D (inibidor de transcrição) e Cicloheximida (inibidor de tradução) e H7 (inibidor de serina/treonina quinase) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, USA). Os inibidores foram testados experimentalmente, e a menor concentração onde se observava o efeito desejado foi utilizada, sendo a viabilidade celular para todas as drogas testada utilizando-se o corante vital Azul de Tripan. O fator de crescimento epidérmico (EGF), utilizado na seleção dos clones expressando dominância negativa para MEK-1, foi adquirido da Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, USA) e também foi utilizado na concentração indicada pelo fabricante.

O anticorpo anti-Egr-1 (Sc 110) foi adquirido da Santa Cruz Biotechnology - Califórnia, USA. Os anticorpos anti-fosfo-p44/42 MAPK (Thr 202/Tyr 204), anti-p44/42, anti-fosfo-JUN e anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase foram adquiridos da Cell Signalling Technology - Beverly, MA, USA. Os anticorpos anti-H3L nos foi gentilmente cedido pelo Dr. Tom Curram, St Judes Children's Hospital – Memphis, Tennessee, USA). O anticorpo anti IgG de coelho conjugado a Rhodamina RedTM-X, foi

adquirido da Jackson Immuno Reserch Laboratories, West Grove – USA. Os anticorpos foram utilizados nos ensaios de “Transferência de Western”, “Super-retardamento” e ainda em microscopia confocal, nas diluições recomendadas pelos fabricantes.

5.4 – Sondas moleculares

5.4.1 - Egr-1

O plasmídeo contendo o fragmento correspondente à região de 1,4 Kb do cDNA de egr-1, foi gentilmente cedido pelo Dr. Tom Curran ST. Judes Hospital Memphis, Tenesse, USA e foi utilizado como sonda nos experimentos de hibridização com RNA celular total (Transferência de “Northern”). Este plasmídeo foi amplificado, purificado, parcialmente sequenciado e estocado.

5.4.2 - Oligonucleotídeo 18S.

Para controle da quantidade de RNA aplicada nas canaletas, durante os experimentos envolvendo transferência de “Northern”, além da prévia quantificação em espectrofotômetro a 260nm, foi investigada também a expressão do RNA ribossômico 18S. O Oligonucleotídeo correspondente ao rRNA 18S humano, cuja sequência é complementar à sequência do gene na posição 1471 a 1550, foi sintetizado por Invitrogen, BR e purificado através de eletroforese em gel de poliacrilamida.

5.4.3 - Oligonucleotídeos egr-1, AP-1 e NF-κB

O oligonucleotídeo sintético correspondente às sequências regulatórias consenso de EBS e AP-1, localizados na região 5' de vários genes, foram utilizados em experimentos de retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA) em gel de poliacrilamida, podendo assim verificar eventuais ligações protéicas a estas sequências de DNA após infecção viral. Os oligonucleotídeos correspondentes ao DNA dos elementos regulatórios AP-1 (5' AAGCATGACTCACTCAGG 3'), EBS (5' GGATCCAGCGGGGGCGAGCGGGG GCGA 3') e NF-κB consenso (5'

GTTGAGGGGACTTTCCCAGGC 3') e suas sequências complementares foram sintetizados pela Invitrogen, BR,

5.4.4 - Marcação isotópica da sonda molecular

A sonda de *egr-1* foi marcada radioativamente utilizando-se [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP (Amersham Bioscience, UK) como radioisótopo, com atividade específica de 3000 Ci/mmol, de acordo com o Kit *RediprimeII* (Random Primer Labelling), Amersham Bioscience, UK. Resumidamente, 2,5 a 50 ng de DNA foram diluídos em 45 μl de TE pH 8,0(25mM Tris-HCl pH8,0; 1mM EDTA) e desnaturado por 5 minutos à 96 $^{\circ}\text{C}$, quando foi, então, adicionado à mistura de marcação (solução tampão, dATP, dGTP, dTTP, enzima exonuclease Klenow livre e iniciadores aleatórios), acrescido de 5 μl de [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP e incubado por 15 minutos à 37 $^{\circ}\text{C}$. A reação foi interrompida pela adição de 5 μl de EDTA 0,2M ou 50 μl de T.E. pH 8,0.

A sonda marcada foi purificada através de cromatografia de filtração em coluna Sephadex G-50 (Sigma, USA) e eluída em T.E pH 8,0. Uma alíquota de 1 μl da sonda foi utilizada para leitura da radioatividade incorporada em contador de cintilação líquida (Rack Beta 1214 LKB, USA) e calculada a sua atividade específica (cpm/ μg de DNA).

Os oligonucleotídeos EBS, AP-1 e NF- κB foram primeiramente pareados, e então marcados isotopicamente. Resumidamente, 5 μg do oligonucleotídeo, em cada uma das orientações (5' \Rightarrow 3' e 3' \Rightarrow 5)', foram acrescidos de 10 μl do tampão de pareamento 10X (100mM de Tris-HCl pH 7,5; 1mM de EDTA pH 8,0; 1M de NaCl). O volume foi acertado com água deionizada para 100 μl , de forma que a concentração final de DNA seria de 100ng/ μl . Utilizando-se termociclador (Perkin Elmer Cetus 4800), a reação foi submetida a 88 $^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos, 65 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, 37 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos e, por fim, 5 minutos à temperatura ambiente. Após o pareamento, os oligonucleotídeos foram estocados a 4 $^{\circ}\text{C}$ (Sambrook *et al*, 1989).

A marcação isotópica foi realizada utilizando-se como nucleotídeo radioativo [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP 3000 Ci/mmol (Amersham Bioscience, UK). Resumidamente, em um tubo de microcentrífuga de 1500 μl adicionaram-se 2 μl de oligonucleotídeo pareado (200ng), 1 μl de polionucleotídeo quinase PNK 10u/ μl (Promega, USA); 2 μl de Tampão PNK 10X (Promega, USA) e 5 μl de [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP. O volume da reação foi completado para 20

μl com água deionizada, procedendo-se incubação a 37°C por 60 minutos. Após, o volume foi acrescido de 60 μl de água deionizada e adicionado de 80 μl da mistura fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (PCI) na proporção 25:24:1 para desnaturação enzimática. O material foi agitado em vórtex por 20 segundos, centrifugado a 13500 rpm por 5 minutos e a fase aquosa coletada, sendo a sonda purificada através de cromatografia de filtração em coluna Sephadex G-50 (Sigma, USA), e eluída em água deionizada. Uma alíquota de 1 μl da sonda foi utilizada para leitura da radioatividade incorporada em contador de cintilação líquida (Rack Beta 1214 LKB, USA) e calculada a sua atividade específica (cpm/μg de DNA), (Sambrook *et al*, 1989).

O oligonucleotídeo 18S foi marcado na sua extremidade 3' OH pela transferência do grupo fosfato fornecido pelo ATP, contendo ³²P na posição γ, com atividade específica de 3000 Ci/mmol, semelhantemente ao descrito acima.

5.5 - Análise do gene egr-1

5.5.1 - Extração do RNA celular total.

Para a extração do RNA celular total, as células foram crescidas até 90% de confluência, quando foram carenciadas em meio DMEM suplementado com 1% de SFB por 12 horas, sendo então tratadas ou não com a droga de interesse e infectadas com o VV (WR ou inativado por luz UV). Após diferentes tempos de infecção (1 a 9 horas) as células foram coletadas e processadas de acordo com o método de Chomczynski e Sacchi (1987) com algumas modificações. Resumidamente, as culturas foram lavadas duas vezes em PBS 1X e adicionadas de 1,5 ml/garrafa (75cm² de área) de solução de RNazol (Tiocianato de guanidina 2M; Citrato de sódio 12,5mM pH 7,0; Sarcosil 0,25% p/v; Acetato de sódio 0,1M; 50% v/v fenol). As culturas foram deixadas em repouso no banho de gelo por 30 minutos e fluidificadas em seguida, utilizando-se pipetas de Pasteur, sendo os fluídos transferidos para tubos de microcentrífuga previamente adicionados de 10% v/v de clorofórmio. A mistura foi então homogeneizada em vortex, por 30 segundos, seguida de incubação por 15 minutos em banho de gelo. A seguir, o material foi centrifugado a 13.500 rpm em microcentrífuga (Eppendorf 5417R) por 15

minutos a 4°C. A fase aquosa (superior) foi então coletada e transferida para novo tubo de microcentrífuga. O RNA foi precipitado através da adição de igual volume de isopropanol, incubação a -70°C por 45 minutos ou -20°C por 18 horas e centrifugado a 13.500 rpm por 30 minutos a 4°C. O sedimento (RNA) obtido foi lavado duas vezes com etanol 75%, seco à temperatura ambiente por aproximadamente 20min e ressolubilizado em ddH₂O Depc (água deionizada tratada com 0,005% de dietil pirocarbonato por 12 horas, a 4°C e autoclavado por 45 minutos para evaporar o depc). O RNA foi quantificado por espectrofotometria a 260nm, onde cada DO equivale a 40 µg/ml, e estocado a -70°C.). O RNA celular total de uma amostra induzida com 10% de SFB e outra não induzida foram extraídos e utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

5.5.2 - Fracionamento eletroforético dos RNAs

O fracionamento eletroforético dos RNAs totais foi realizados segundo a técnica descrita por Sambrook et al, 1989. Quinze µg de RNA celular total/amostra foram submetidos ao fracionamento eletroforético em gel desnaturante contendo 1,5% p/v de agarose; 2,2M de formaldeído a 37% em tampão MOPS (40mM de ácido-morfolino-propano-sulfônico, 10mM de acetato de sódio e 1mM de EDTA, pH 7,0), corado com 0,5µg/ml de brometo de etídio. Imediatamente antes da corrida, as amostras foram desnaturadas pela adição de 50% p/v de formamida, 15% v/v de formaldeído e 10% v/v do tampão MOPS 10X, em volume final de 20µl e incubadas a 56°C por 15 minutos. Em seguida, em cada amostra, foram adicionados 2µl de tampão de amostra 10X (50% v/v de glicerol, 1mM de EDTA, 0,4% p/v de azul de bromofenol e 0,4% p/v de xileno cianol). As amostras foram aplicadas no gel e a corrida efetuada em tampão MOPS 1X a 50V durante 90 a 120 minutos. Em seguida, o gel foi fotografado sob iluminação ultravioleta (320nm). Confirmada a integridade do RNA, o excesso de formaldeído e de brometo de etídio foram lavados, e o RNA transferido para membrana de nylon.

5.5.3 - Transferência de “Northern”

Logo após o fracionamento eletroforético dos RNAs foi realizada então a transferência por capilaridade dos RNAs para membrana de nylon (Hybond XP, Amersham Bioscience, UK), conforme Sambrook e colaboradores (1989). A transferência foi feita

em tampão 10X SSC [1,5 M NaCl, 0,15M Citrato de Sódio] por no mínimo 18h. Após a transferência, a fixação dos RNAs à membrana de nylon foi realizada, utilizando-se luz UV (320nm), por 2 minutos, no equipamento Cross linker (CL-100 ultraviolet crosslinker, UVP).

5.5.4 - Hibridizações

A diferentes hibridizações foram realizadas de acordo com método descrito por Church e Gilbert (1984). As membranas foram colocadas em tubo de hibridização e pré-hibridizadas por 15 minutos a 65°C em solução contendo 50% (v/v) de 0,5M Na₂HPO₄, 7% (p/v) de SDS, 1% (p/v) de BSA e 1mM EDTA. Em seguida, as sondas marcadas isotopicamente desnaturadas (5 minutos a 96°C) e resfriadas (gelo 5 min), com exceção do oligonucleotídeo 18S, que não requer desnaturação, foram então adicionadas (~10⁶ cpm/ml de solução) à solução de pré-hibridização. O sistema foi incubado a 65°C, por no mínimo 12 horas sob agitação, utilizando-se incubadora modelo 400 (Robbins Scientific, USA). Após a hibridização as membranas foram lavadas duas vezes em solução de lavagem 1 [50% (v/v) de 0,5M Na₂HPO₄, 1% (p/v) de SDS e 1mM de EDTA], a 65° C durante 30 minutos. Em seguida, as membranas foram expostas contra filme de raio X Kodak GBX 6493050, sendo revelados posteriormente, utilizando-se revelador e fixador indicados pelo fabricante.

5.6 - Análise da proteína Egr-1

5.6.1 - Extratos protéicos celulares

Células A31, ou seus clones derivados expressando dominância negativa para MEK-1 ou silenciamento gênico, foram crescidas e carenciadas como descrito acima, sendo então, pré-tratadas ou não com a droga de interesse e infectadas com o VV (WR) m.o.i 3,00. Após diferentes tempos de infecção (1 a 48 horas) as células foram lisadas diretamente da monocamada celular com 2ml de tampão de lise gelado [1% Triton NP40, 50mM HEPES (pH 7,5), 5mM EDTA, 10% v/v glicerol, 200 mM NaCl, 1mM vanadato de sódio, 1mM PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto), 5µg/ml aprotinina e 2,5µg/ml leupeptina] por 45 minutos no gelo. Os lisados foram clarificados por

centrifugação à 4^oC por 15 minutos, quantificados por espectrofotometria através do “Kit Bio-Rad Assay” (Bio-Rad Laboratories USA) e aliqotados em tubos de microcentrífuga (Magalhães *et al.*, 2001). Eventualmente, uma amostra induzida com 10% de SFB foi utilizada como controle positivo.

5.6.2 - Fracionamento eletroforético e transferência das proteínas

Vinte e cinco microgramas das proteínas totais foram fracionados em gel de poliacrilamida/SDS (PAGE) 10% a 100V por aproximadamente 1,5 h e transferidos para membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech), conforme protocolo do "Kit Bio-Rad Transference" (Bio-Rad Laboratories, USA). Após transferência, as membranas foram coradas com "ponceau 1%" para visualização da eficiência da mesma, além da informação sobre a equivalência das quantidades de proteínas aplicadas nas diferentes canaletas. As membranas foram bloqueadas por 18 a 20 horas a 4°C ou 1 hora a temperatura ambiente, utilizando-se PBS 1X/Tween 0,1% contendo 5% de leite em pó desnatado.

5.6.3 - Reação com anticorpos e revelação

Para a reação com os anticorpos primários, as membranas, após bloqueadas, foram primeiramente lavadas por 3 vezes em PBS 1X/Tween 0,1%. As incubações com os anticorpos primários foram realizadas a 4°C por 18-24 horas em solução de PBS/Tween contendo 5% de BSA (albumina sérica bovina) e anticorpo de interesse na diluição recomendada pelo fabricante. As membranas foram lavadas novamente em PBS 1X/Tween 0,1% por 3 vezes e incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo secundário respectivo ligado à peroxidase, em solução PBS 1X/Tween 0,1% contendo 5% de leite em pó desnatado. Após nova sessão de lavagens por 3 vezes em PBS/Tween as membranas foram incubadas em solução reveladora "ECL-Plus" (Amersham Bioscience, UK) por 5min, expostas contra filme de raio X em intervalos de 30 seg. a 10 min. (Hyperfilm ECL, Amersham Bioscience, UK), e revelados utilizando-se revelador e fixador (Kodak), de acordo com recomendações do fabricante.

5.7 – Análise das interações DNA/ Proteínas

5.7.1 - Extratos protéicos celulares

Células A31, foram crescidas e carenciadas como descrito acima sendo então pré-tratadas ou não com a droga de interesse e infectadas com o VV (WR) m.o.i 3,0. Após diferentes tempos de infecção (1 a 24 horas) as proteínas totais foram extraídas conforme descrito no item 5.6.1. Como controle positivo, foi utilizado o lisado de uma amostra tratada com 10 % SFB por 30 minutos.

5.7.2 - Ensaio do retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA)

A análise dos complexos proteína-DNA formados, após a infecção celular pelo VV, foi efetuada conforme Bonjardim (1997). Resumidamente, os extratos protéicos foram misturados com o oligonucleotídeo marcado radioativamente, que representa as sequências correspondentes aos elementos regulatórios EBS ou AP-1 existentes no promotor de diferentes genes e que respondem à estimulação por SFB. O método se baseia na ligação das proteínas a estas seqüências sofrendo, as mesmas, um retardamento na migração eletroforética (EMSA) em relação à sonda livre (não ligada).

Resumidamente, 20µg de proteínas totais foram ajustados para a concentração protéica final de 2µg/µL, [as alíquotas correspondentes as 20µg foram secas em SpeedVac Concentrator (Savant) até aproximadamente 10µl]. Este volume foi misturado a 1,0µl de poly dI:dC (Amersham Bioscience, UK) (62,5U/ml) e incubado à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, adicionaram-se 10 µl de tampão de ligação {50mg/mL de BSA; 10mg/mL de tRNA de levedura; 0,1µl de poly dIdC (62,5U/mL); 10% de ficol 400; 0,1M NaCl WBB [0,4M de NaCl;10mM de Hepes (pH 8,0); 0,1mM de EDTA (pH 8,0); 5% de glicerol; 0,5mM de DTT e 0,2mM de PMSF]} e aproximadamente 65000 cpm de oligonucleotídeo marcado. A mistura foi então deixada à temperatura ambiente por 20 min para interação DNA/proteína.

Como controle da especificidade das interações, foram feitos ensaios de competição com excesso molar de 50x do oligonucleotídeo específico não marcado (controle homólogo) e também competição com excesso 50x molar de um oligonucleotídeo não

relacionado NF- κ B (controle heterólogo). Nestes ensaios, foram adicionados, juntamente com o tampão de ligação, excesso de oligonucleotídeo homólogo ou heterólogo não marcado radioativamente. Esta reação foi incubada por 5 minutos e posteriormente foram acrescentados 65000 cpm do oligonucleotídeo marcado, prosseguindo-se por mais 15 minutos de incubação à temperatura ambiente.

Os complexos DNA-proteína formados foram resolvidos eletroforéticamente em gel nativo de poliacrilamida a 6 % [acrilamida/bisacrilamida na relação 29:1 em tampão TBE 0,5X (0,089M Tris-borato; 0,089 M ácido bórico; 0,002 M EDTA)] a 165V por aproximadamente 90 minutos. Após o fracionamento eletroforético, o gel foi seco à vácuo a 80°C por 30 minutos, sendo finalmente exposto contra filme de RX KODAK GBX 6493050, sendo este revelado posteriormente, utilizando-se revelador e fixador indicados pelo fabricante.

5.7.3 - Ensaio do super retardamento da mobilidade eletroforética

Uma variante da técnica de EMSA é o super retardamento da mobilidade eletroforética, onde o lisado proteico é incubado com anticorpo anti possíveis proteínas que participariam do complexo proteína/DNA formado para que se possa identificar as proteínas envolvidas na formação deste complexo. Vinte microgramas de extrato proteico é incubado por uma hora a 4⁰C, com o anticorpo de interesse (aproximadamente 600ng) antes das reações com poli dI:dC e com o DNA, como já descritas no item 5.7.2.

5.8 – Silenciamento gênico por siRNA.

5.8.1 – egr-1 siRNA

Em nosso estudo utilizamos a técnica do siRNA, para silenciar o gene egr-1 em células A31 e posteriormente verificar seu papel na multiplicação do VV. Para tanto, após refinado estudo, “in silico”, das seqüências de todos os genes representantes da família EGR-1, escolhemos a seqüência 5' GGTGGTTTCCAGGGTTCCA 3' correspondente

aos nucleotídeos +2404 a + 2422 do mRNA egr-1 (Número de acesso no NCBI _ Gene ID: 13653), exclusivamente presente neste cDNA.

Utilizamos, para transfecção estável em células A31, o vetor de expressão *pSilencer* 3.1-HI neo (Ambion, Worcester, MA, USA), que confere resistência ao antibiótico Geneticin (G418), (Figura 8) e pudemos desta forma selecionar clones celulares estavelmente transfectados. De acordo com recomendações da Ambion RNA Diagnostics, uma seqüência de 64 nucleotídeos senso e antisense foram desenhadas de forma que, quando pareadas, teríamos no sentido 5' - 3': o sítio de restrição BamHI, egr-1 siRNA senso, uma alça de 9 nucleotídeos, egr-1 siRNA antisense, o sinal de terminação da polimerase III e o sítio de Hind III (Figura 7). Estas seqüências foram sintetizadas pela Invitrogen, Br.

5.8.2 – Clonagem do inserto do grampo siRNA no vetor *pSilencer*

Os oligonucleotídeos foram solubilizados em água deionizada e 4 µg (2µg de cada fita) foram pareados em solução 1X de pareamento de DNA (Ambion, Worcester, MA, USA), a mistura DNA e solução de pareamento foi aquecida a 90°C por 3min, resfriada até 37°C e incubada por uma hora.

Após pareado, o DNA foi clonado no vetor *pSilencer* 3.1-HI neo (Figura 8). Resumidamente, em um tubo de microcentrifuga foram adicionados 8ng do dsDNA, 1µl do tampão 10 X da T4 DNA ligase (Promega), 100ng do vetor *pSilencer* neo e o volume foi completado para 10 µl com água deionizada. A reação foi incubada por 16h a 4°C, esta reação foi utilizada para transformação de bactérias DH5α competentes.

Após a transformação bacteriana, 3 colônias foram escolhidas ao acaso, crescidas em 5 ml de LB 1X a 37°C por 16h, quando o DNA plasmidial foi extraído (Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega-USA) e digerido com enzimas de restrição para confirmação da ligação do inserto no plasmídeo e da transformação bacteriana. Uma alíquota da cultura do clone bacteriano escolhido foi congelada em freezer -70°C. Este clone foi crescido em 250ml de LB1X e o DNA plasmidial foi extraído através do kit Wizard® PureFectin Plasmid DNA Purification System (Promega- USA) para obtenção de quantidades maiores de DNA plasmidial. O plasmídeo obtido foi sequenciado e posteriormente utilizado para transfecção celular.

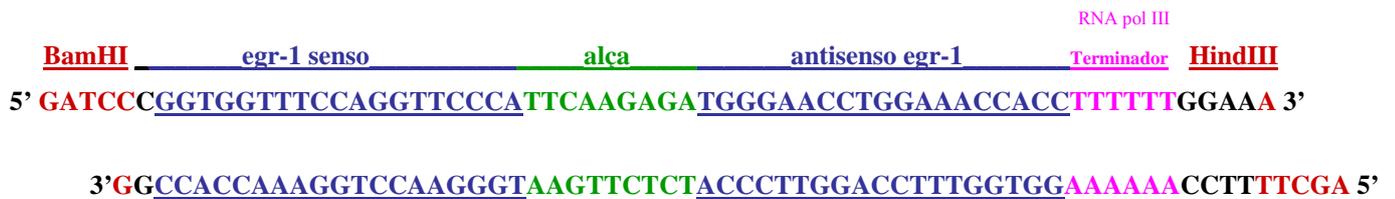


Figura 7: Representação esquemática do grampo que foi utilizado para clonagem no vetor de expressão pSilencer.

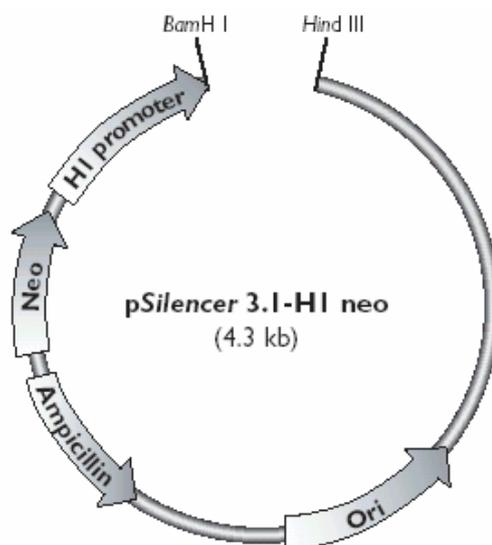


Figura 8 Representação esquemática do plasmídeo *pSilencer 3.1-HI neo* _ Ambion, Worcester, MA, USA. (fonte: www.ambion.com).

5.8.3 – Transfecção de células A31 com fosfato de cálcio e seleção dos clones celulares obtidos

As células A31 foram crescidas em placas plásticas (100 mm de diâmetro) até atingirem a confluência de 40 - 50% quando então o meio de cultura foi removido e substituído por um meio fresco. Cerca de 2-4h após a troca de meio, as células foram transfectadas com 10µg de DNA plasmidial. Para isto, a solução de DNA teve seu volume ajustado para 40µl com solução de Tris-EDTA, em um tubo Falcon de 15ml, e 440µl de HEPES (Hepes 10g/l; NaCl 16g/l; KCl 0,74g/l; NaH₂PO₄ 0,25g/l) foram acrescentados. Em seguida, o DNA foi precipitado pela adição lenta, sob forte agitação, de 400µl CC Mix (15ml de CaCl 2M; 90ml de H₂O miliQ; 10ml de Tris 10mM – EDTA 1mM). Após a adição destes reagentes a solução foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente para a formação do precipitado. Em seguida, o precipitado obtido (880µl) foi gotejado sobre a monocamada de células e estas incubadas aproximadamente 16 horas a 37⁰C. Após este período a monocamada celular foi lavada 3 vezes com PBS 1X para completa remoção dos excessos de precipitados e de fosfato de cálcio, sendo então adicionado

DMEM suplementado com 7% de SFB. Após mais 24 horas incubadas a 37°C, o meio de cultura foi acrescido de 800µg/ml de geneticin.

Após aproximadamente 3 semanas da transfecção, os clones celulares selecionados foram coletados e transferidos para uma placa de 24 câmaras. Os clones foram expandidos, congelados e caracterizados, quanto a transcrição do do gene *egr-1* e a expressão da proteína *egr-1*, em resposta ao tratamento com 10% de SFB ou a infecção pelo VV WR (m.o.i 3,0).

Paralelamente, transfectamos células A31 com o mesmo vetor de expressão, porém clonado com um grampo de siRNA não relacionado a nenhuma seqüência genômica conhecida de humano, camundongos ou ratos. Os clones estavelmente transfectados com esta construção também foram expandidos, congelados e caracterizados como descrito acima, sendo que os clones que apresentaram fenótipo semelhante à célula A31 não transfectada e sob os mesmos estímulos, foram escolhidos como controle.

5.9 – Dominante negativo de MEK-1

Os plasmídeos pcDNA3 contendo, ou a seqüência codificadora para MEK1 humana selvagem (MEK-WT), ou expressando sua forma dominante-negativa (Mek-K97R), foram gentilmente cedidos pelo Dr. Philip J.S. Stork da Oregon Health e Science University, USA.

Células A31 foram transfectadas, como descrito no item 5.8.3 e os clones expressando dominância negativa (DN) ou a proteína selvagem (WT) obtidos, foram caracterizados quanto aos níveis de fosforilação das MAPKs ERK 1/2 em resposta à estimulação pelo fator de crescimento epidérmico (EGF) 50ng/ml (Horgan *et al.*, 2003) e à infecção pelo VV WR (m.o.i 3,0).

As transfecções e o isolamento dos clones DNs e WTs foram realizadas pelo Doutor Anderson Assunção Andrade (Univale, Governador Valadares - MG) e pelo mestrando Bruno S. A. F. Brasil.

5.10 – Curva de multiplicação do VV

Quatrocentas mil células, silenciadas ou não para o gene *egr-1*, foram implantadas em placas de 6 câmaras e após 24 horas foram carenciadas por 12h em meio DMEM suplementado com 1% SFB, quando foram então infectadas com VV a m.o.i. 3,0. Após diferentes tempos de infecção 6, 12, 24 e 48 horas, as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1X e congeladas e descongeladas 3 vezes para promover a lise celular e liberação dos IMVs. O lisado celular foi clarificado por centrifugação a 13.500 rpm em microcentrífuga (Eppendorf 5417R) por 15 minutos a 4°C. Os títulos virais foram determinados em células Vero de acordo com a técnica descrita no item 5.2.2. (O mesmo procedimento foi realizado com os clones expressando dominância negativa e a proteína selvagem para MEK-1).

5.11 – Fenótipo da placa de lise do VV

Quatrocentas mil células, silenciadas ou não para o gene *egr-1*, foram implantadas em placas de 6 câmaras e após 24 horas foram carenciadas por 12h em meio DMEM suplementado com 1% SFB, quando foram então infectadas com 100 a 200 UFP. Após 48 horas de infecção a monocamada celular foi fixada com formaldeído a 10% em PBS 1X e colorada com solução 1 % (p/v) de cristal violeta em PBS 1X. (O mesmo procedimento foi realizado com os clones expressando dominância negativa e a proteína selvagem para MEK-1).

5.12 – Microscopia Confocal

Para analisar a localização celular da proteína *Egr-1* após a infecção pelo VV, 1×10^5 células A31 foram crescidas em lamínulas de 12 mm de diâmetro (Perfecta, Br) e carenciadas por 12 horas em meio DMEM suplementado com 1% SFB. Em seguida, as células foram infectadas com o VV- Δ TK-GFP, o qual tem sob o controle de um promotor artificial precoce/tardio o gene da proteína verde fluorescente (GFP), a m.o.i de 10,0. Após 12 horas, as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1X, fixadas com

paraformaldeído 4 % por 10 minutos, e permeabilizadas com 0,2% de triton X em PBS-3% BSA. Em seguida as células foram lavadas 3 vezes com PBS-3% BSA, e incubadas com o anticorpo primário de interesse. Após 1 hora a temperatura ambiente, nova sessão de 3 lavagens com PBS-3% BSA foi realizada e as células incubadas com o anticorpo secundário marcado com fluorescência (Rodamina) por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, 3 lavagens com PBS-3% BSA foram realizadas e 100 µl de DAPI [Bisbenzimidazole (100 mg/ml) - Sigma-Aldrich Co - St. Louis, MO, USA] foram adicionados às lamínulas. Após 10 minutos a temperatura ambiente estas foram novamente lavadas 3 vezes com PBS 1X. Posteriormente, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro utilizando-se uma gota pequena de mowiol (Sigma-Aldrich Co - St. Louis, MO, USA) e as células foram analisadas no microscópio confocal ZEISS [Laser Scanning Microscope (LSM) 510 META], do ICB (CEMEL) com acessórios para fluorescência, e as imagens obtidas foram processadas com o software ZEISS, LSM 510.

6 – RESULTADOS

6.1 – Análise do acúmulo do mRNA de egr-1 induzido pelo VV

6.1.1 - O VV promove o acúmulo da mensagem do gene egr-1 em células A31

Em nosso laboratório, Magalhães e colaboradores (2001) demonstraram a rápida indução do gene *c-fos* após a infecção com VV. O acúmulo do mRNA de *c-fos* em células infectadas com VV foi independente da m.o.i. utilizada, da proteína VGF e da integridade do DNA viral. Como os sinais mitogênicos desencadeados precocemente durante a infecção pelo VV, se refletem positivamente na multiplicação viral, e a expressão de *c-fos* antecede a expressão de outros genes envolvidos com mitogênese, fomos analisar então, a expressão do gene egr-1 durante a infecção pelo VV.

Observamos, na figura 9, que a acumulação do mRNA do gene egr-1 foi fortemente induzida após a infecção pelo VV, sendo mais evidente após 1 hora de infecção, embora sua indução já seja observada 30 min pós-infecção, permanecendo elevada até o maior tempo analisado (9 horas).

6.1.2 – A expressão de egr-1 é dependente da m.o.i. viral.

Para melhor caracterizar a ativação transcricional do gene egr-1 induzida pelo VV, foi analisado o papel da m.o.i nesta ativação. Verificamos que a indução de egr-1 pelo VV foi dependente da m.o.i., sendo o mRNA de egr-1 observado a partir da m.o.i. 0,1, atingindo o máximo nas multiplicidades de infecção 1,0 e 10,0 (Figura 10).

6.1.3 – A expressão de egr-1 induzida pelo VV é dependente de síntese protéica “de novo” e da integridade do seu genoma.

Para determinar se a habilidade de VV em promover a acumulação de egr-1 de maneira prolongada requer a realização das etapas iniciais do ciclo de multiplicação viral (expressão de genes imediatamente precoces e desnudamento secundário), infectamos as células A31 com o VV na presença de cicloheximida (CHX). Esta droga foi capaz de inibir completamente a expressão do gene egr-1 em células infectadas com o VV (Figura 11, canaleta 5). A irradiação com luz UV atua diretamente no ácido nucléico viral, impedindo assim a transcrição de seus genes imediatamente precoces e,

conseqüentemente, o desnudamento secundário (Bablanian *et al.*, 1981). Foi verificado que a integridade do ácido nucléico viral e a transcrição de seus genes imediatamente precoces, são fundamentais no acúmulo do mRNA de *egr-1* induzido pelo VV, uma vez que, em células infectadas com VV WR inativado por luz Ultravioleta não foi observado o mRNA de *egr-1* (Figura 11, canaletas 6 a 8). Estes resultados demonstram a necessidade das etapas iniciais do ciclo de multiplicação viral para a ativação transcricional de *egr-1*.

Com o intuito de verificar se o VV estaria promovendo a estabilização da mensagem de *egr-1*, adicionamos o inibidor Actinomicina D (5µg/ml) às células A31 três ou cinco horas após a infecção com o VV e conseqüente indução da expressão de *egr-1*. A mensagem de *egr-1* foi drasticamente reduzida uma hora após o tratamento com Actinomicina D (Figura 12, canaletas 4 e 6), sendo completamente eliminada após duas horas (Figura 12, canaletas 5 e 8). Devemos ressaltar que, a infecção com o VV foi mantida durante todo o período analisado. Este resultado indica que o acúmulo do mRNA de *egr-1*, após a infecção pelo VV, não se deve simplesmente à estabilização da mensagem, mas requer transcrição gênica contínua (Figura 12).

6.1.4 – A expressão de *egr-1* induzida pelo VV requer a co-participação de serina-treonina quinase e MEK

Após verificar a indução da expressão do gene *egr-1* pelo VV, investigamos as possíveis vias transdutoras de sinais envolvidas nesta indução. Primeiramente, analisamos a participação de serina/treonina quinases (STK). Para tanto, utilizamos o inibidor H7 e observamos que a expressão de *egr-1* induzida pelo VV foi afetada de maneira dose dependente pelo prévio tratamento das células com esta droga, indicando a forte participação de STKs na indução deste gene pelo VV (Figura 13).

Como STKs são proteínas que podem atuar na mesma cascata sinalizadora, acima de MEK/ERK, e sabendo que o VV é capaz de promover a ativação sustentada das proteínas ERK1/2 e RSK2 de maneira dependente de MEK (Andrade *et al.*, 2004), ponderamos a participação da MAPquinase MEK no acúmulo do mRNA de *egr-1* após a infecção pelo VV. Através da utilização de inibidores de proteínas quinases, foi verificado que a ativação de ERK1/2 foi essencial na indução de *egr-1* pela infecção pelo VV (Figura 11, canaleta 4).

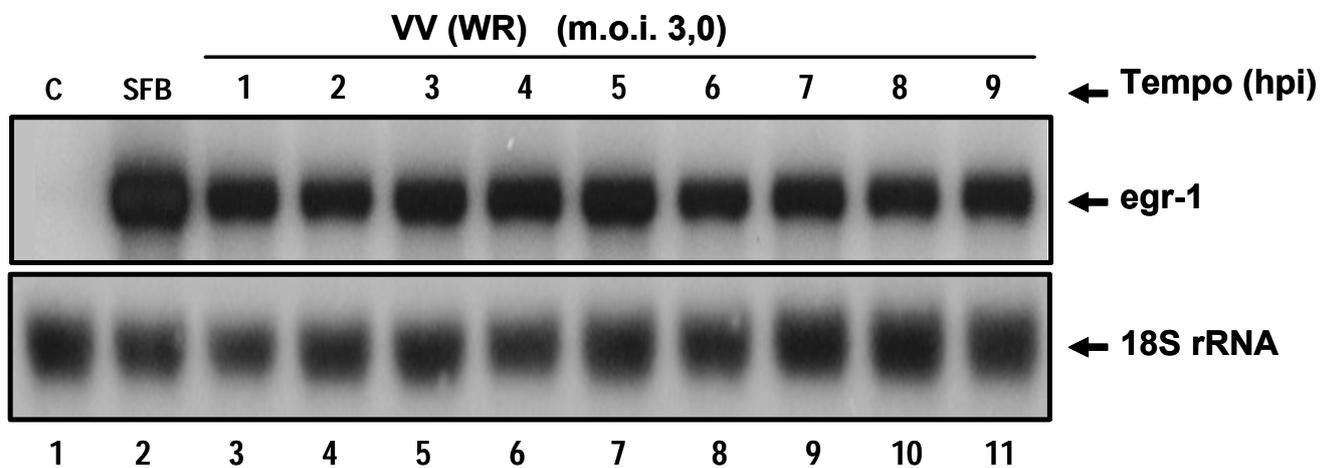


Figura 9: Acúmulo do mRNA do gene *egr-1* em células infectadas pelo VV.

Células A31 foram crescidas em DMEM suplementado com 7 % de SFB até atingirem 90 % de confluência, quando foram carenciadas no mesmo meio contendo 1% de SFB por ~12 horas. As células foram então infectadas com o VV WR com m.o.i.: 3,0 por tempos entre 1 a 9 horas, quando o RNA celular total foi extraído. Quinze microgramas de RNA foram fracionados em gel de agarose/formaldeído a 1,5%, transferidos para membrana de nylon e hibridizados com sonda do gene *egr-1* marcada com dCTP (^{32}P). Células não infectadas, ou tratadas com 10% SFB por 30 minutos, foram utilizadas, respectivamente, como controles negativo (C) e positivo (SFB). O controle da quantidade de RNA nas diferentes canaletas, foi feito utilizando-se o 18S rRNA.

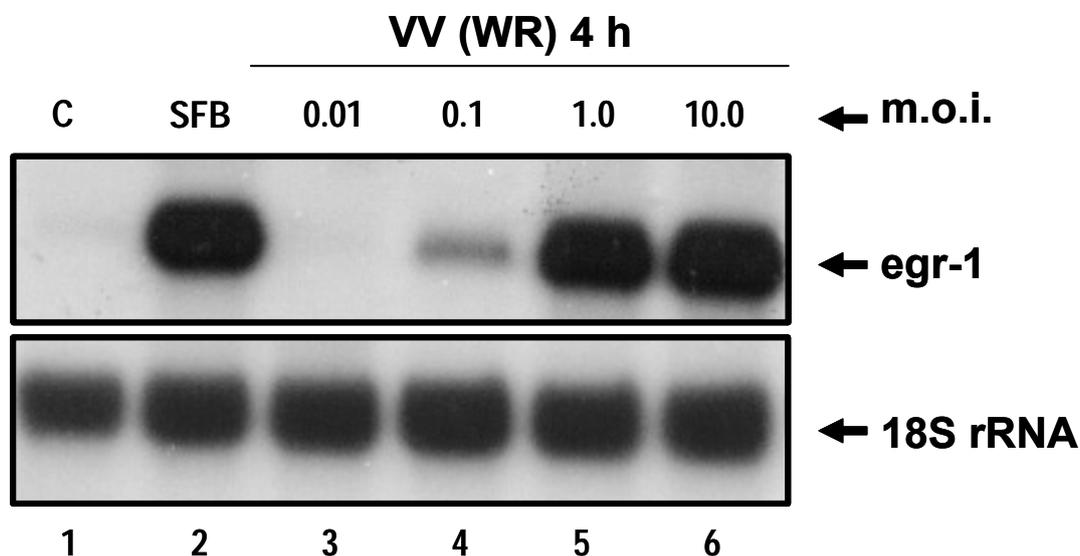


Figura 10: Influência da multiplicidade de infecção viral no acúmulo do mRNA do gene egr-1 após infecção pelo VV

Células A31 crescidas em DMEM suplementado com 7 % de SFB até atingirem 90 % de confluência foram carenciadas no mesmo meio contendo 1% de SFB por ~12 horas. As células foram, então, infectadas com VV WR com diferentes m.o.i. Após 4 horas de infecção o RNA celular total foi extraído e 15µg foram fracionados em gel de agarose/formaldeído a 1,5%, transferidos para membrana de nylon e hibridizados com sonda do gene egr-1 marcada com dCTP (³²P). Células não infectadas, ou tratadas com 10% SFB por 30 minutos, foram utilizadas respectivamente, como controles negativo (C) e positivo (SFB). O controle da quantidade de RNA nas diferentes canaletas, foi feito utilizando-se o 18S rRNA.

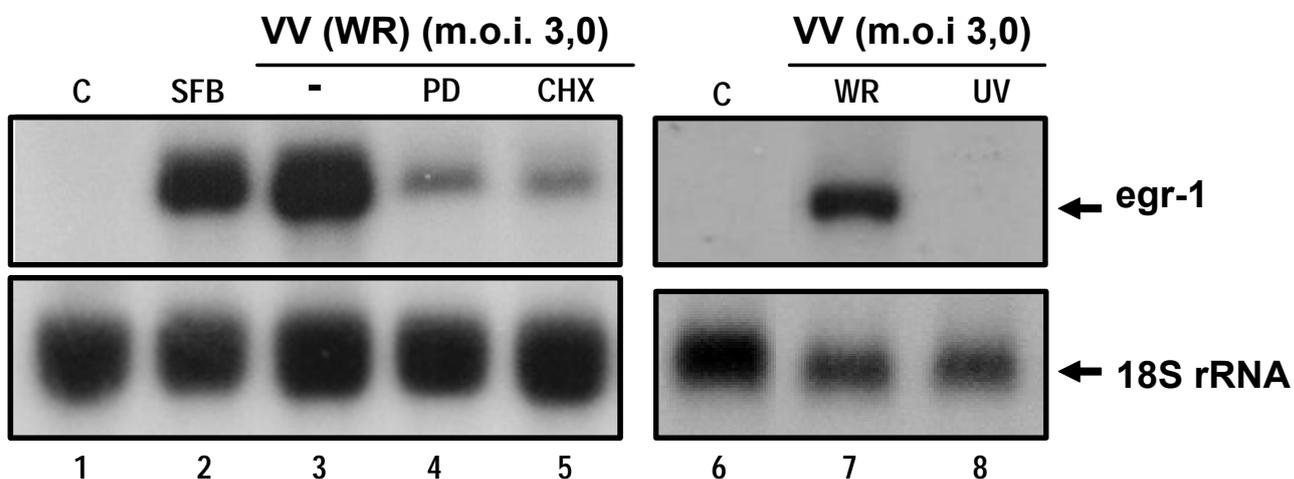


Figura 11:Influência da inibição da tradução e da inativação da partícula viral por luz UV no acúmulo do mRNA de gene egr-1 após infecção pelo VV

Células A31 crescidas em DMEM suplementado com 7 % de SFB até atingirem 90 % de confluência foram carenciadas no mesmo meio contendo 1% de SFB por ~12 horas. As células foram pré-tratadas ou não com ciclohemida (CHX) 100µg/ml, ou PD 98059 (50µM) por 30' e depois infectadas com VV WR ativo ou inativado com luz UV, a m.o.i. 3,0. Após 4 horas de infecção o RNA celular total foi extraído e 15µg foram fracionados em gel de agarose/formaldeído a 1,5%, transferidos para membrana de nylon e hibridizados com sonda do gene egr-1 marcada com dCTP (³²P). Células não infectadas, ou tratadas com 10% SFB por 30 minutos, foram utilizadas, respectivamente, como controles negativo (C) e positivo (SFB). O controle da quantidade de RNA nas diferentes canaletas, foi feito utilizando-se o 18S rRNA.

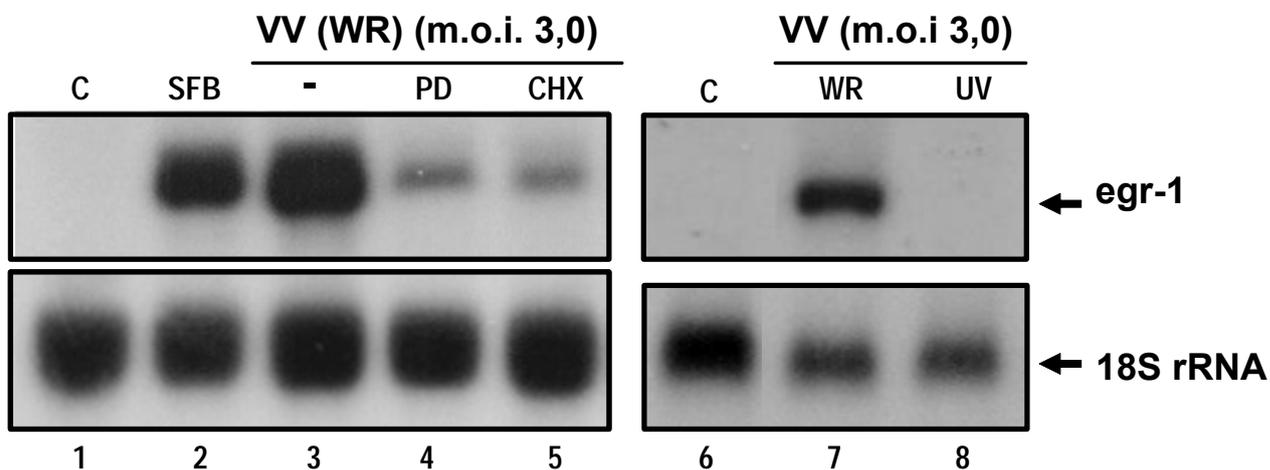


Figura 12: A acumulação do mRNA do gene *egr-1* em células infectadas pelo VV requer transcrição contínua

Células A31 foram crescidas em DMEM suplementado com 7 % de SFB até atingirem 90 % de confluência, quando foram carenciadas no mesmo meio contendo 1% de SFB por ~12 horas. As células foram então infectadas com o VV WR a m.o.i. 3,0 e após 3 ou 5 horas 5µg/ml de actinomicina D (ActD) foram adicionados ao meio de cultivo e a infecção foi mantida por mais 1 ou 2 horas. Após os tempos indicados o RNA celular total foi extraído. Quinze microgramas de RNA foram fracionados em gel de agarose/formaldeído a 1,5%, transferidos para membrana de nylon e hibridizados com sonda do gene *egr-1* marcada com dCTP (³²P). O controle da quantidade de RNA nas diferentes canaletas, foi feito utilizando-se o 18S rRNA.

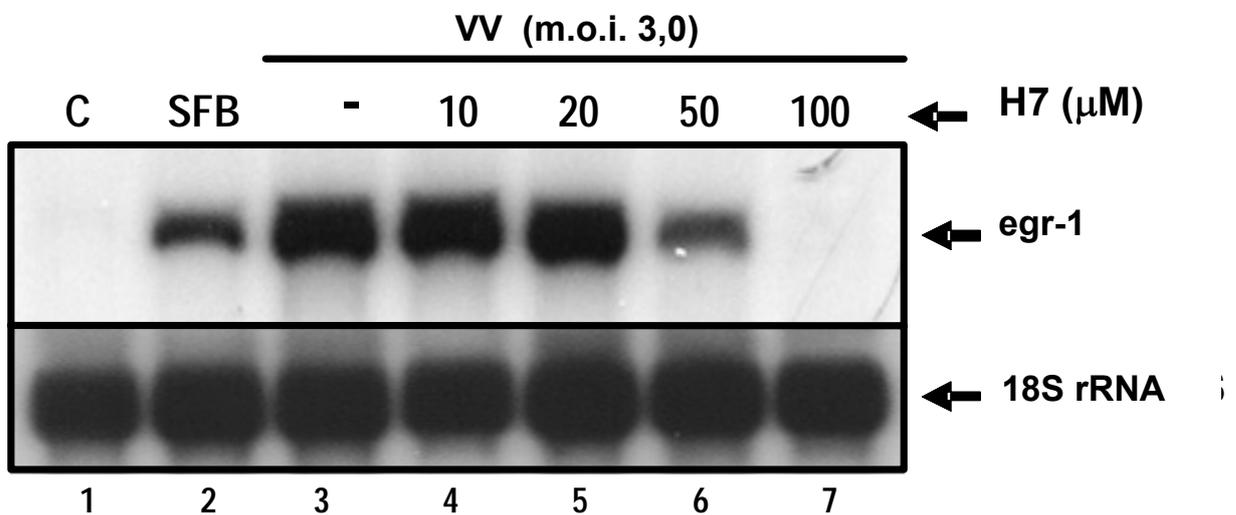


Figura 13: A acumulação de egr-1, após a infecção pelo VV, requer serina treonina quinase

Células A31 crescidas em DMEM suplementado com 7 % de SFB até atingirem 90 % de confluência foram carenciadas no mesmo meio contendo 1% de SFB por ~12 horas. As células foram pré-tratadas ou não com H7 por 30' e depois infectadas com VV WR, a m.o.i. 3,0. Após 4 horas de infecção o RNA celular total foi extraído e 15μg foram fracionados em gel de agarose/formaldeído a 1,5%, transferidos para membrana de nylon e hibridizados com sonda do gene egr-1 marcada com dCTP (³²P). Células não infectadas, ou tratadas com 10% SFB por 30 minutos, foram utilizadas, respectivamente, como controles negativo (C) e positivo (SFB). O controle da quantidade de RNA nas diferentes canaletas, foi feito utilizando-se o 18S rRNA.

6.2 – Análise da acumulação da proteína Egr-1 induzida pelo VV

Uma vez que a infecção pelo VV promoveu a expressão prolongada do mRNA de egr-1, fomos averiguar se o acúmulo da proteína Egr-1 seria correspondente à expressão gênica. Consistentemente, a proteína Egr-1 foi expressa durante praticamente todo o ciclo de multiplicação viral sendo evidente desde os momentos precoces da infecção (1 a 2 horas), aumentando a seguir e permanecendo elevada até os momentos mais tardios da infecção (30 horas), decaindo a seguir (36 horas) e voltando a níveis basais somente após 48 horas de infecção (Figura 14).

Da mesma forma como observamos para a mensagem do gene egr-1, a via sinalizadora MEK/ERK 1/2 foi extremamente importante na expressão da proteína Egr-1 em resposta à infecção pelo VV. O tratamento prévio das células A31 com o inibidor específico de MEK (PD98058) reduziu drástica ou completamente a expressão da proteína Egr-1 durante todo o ciclo de multiplicação do VV (Figura 15).

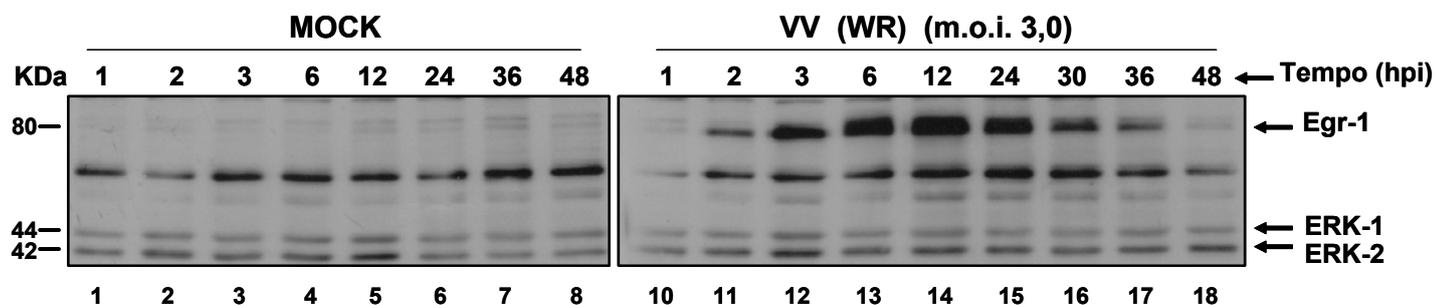


Figura 14: Cinética de expressão da proteína Egr-1 após a infecção pelo VV.

Células A31 foram crescidas em DMEM suplementado com 7 % de SFB até atingirem 90 % de confluência sendo, então, carenciadas no mesmo meio contendo 1% de SFB por ~12 horas. As células foram infectadas com VV WR a m.o.i. 3,0. Após os diferentes tempos pós-infecção indicados, as proteínas totais celulares foram extraídas. Vinte e cinco microgramas de proteínas foram fracionadas em gel de poliacrilamida/SDS (PAGE) 10% e transferidas para membranas de nitrocelulose, estas foram, então, sondadas com anticorpo anti- Egr-1. Células não infectadas foram utilizadas como controles negativos (mock). A normalização da quantidade de proteínas aplicadas nas diferentes canaletas, foi feita utilizando-se anticorpo anti- ERK 1/2.

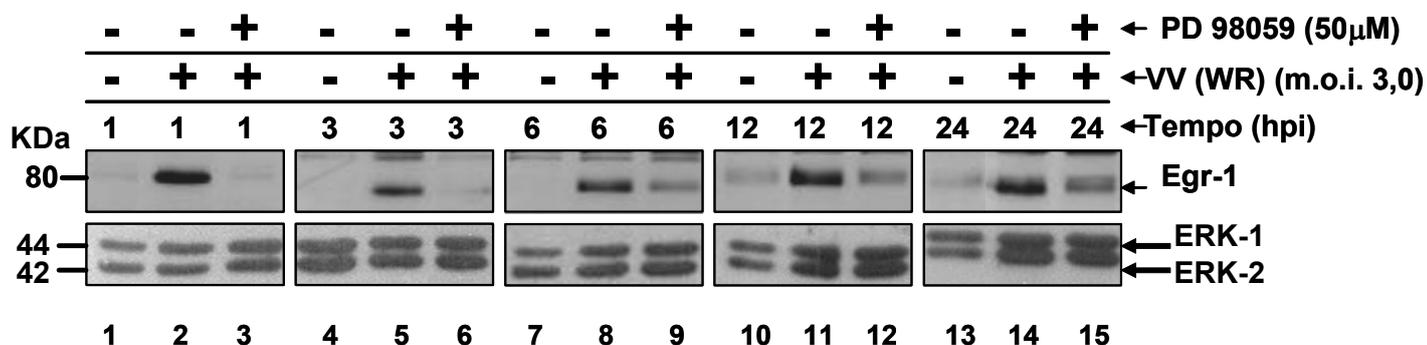


Figura 15: A expressão da proteína Egr-1 em resposta à infecção pelo VV é dependente de MEK.

Células A31 foram crescidas em DMEM suplementado com 7 % de SFB até atingirem 90 % de confluência sendo, então, carenciadas no mesmo meio contendo 1% de SFB por ~12 horas. As células foram pré-tratadas ou não com PD 98059 por 30' e então infectadas com VV WR. Após os diferentes tempos pós-infecção indicados, as proteínas totais celulares foram extraídas. Vinte e cinco microgramas de proteínas foram fracionadas em gel de poliacrilamida/SDS (PAGE) 10% e transferidas para membranas de nitrocelulose, estas foram sondadas com anticorpo anti-Egr-1. Células não infectadas nem tratadas com PD 98058 foram utilizadas como controles negativos. A normalização da quantidade de proteínas aplicadas nas diferentes canaletas, foi feita utilizando-se anticorpo anti- ERK 1/2.

6.3 - A proteína Egr-1 induzida pelo VV transloca-se para o núcleo e interage com seu sítio de reconhecimento no DNA

A proteína Egr-1 é um fator regulador transcricional, e como tal, após ser sintetizado no citoplasma, precisa ser translocada ao núcleo para efetivar sua função transativadora/repressora gênica. Para verificarmos se a proteína Egr-1 sintetizada após a infecção pelo VV, tem a capacidade de se translocar ao núcleo, podendo assim exercer a sua função, provavelmente, transativadora de genes celulares associados ao sucesso multiplicativo viral, ou se permaneceria no citoplasma para transativar genes virais, realizamos ensaios de microscopia confocal.

Após doze horas de infecção com o VV- Δ TK-GFP, que expressa a proteína verde fluorescente (GFP) sobre o controle do promotor artificial precoce/tardio do plasmídeo pSC65-gfp, nós observamos a forte expressão da proteína Egr-1 nas células infectadas. A proteína Egr-1 observada, localiza-se, preferencialmente, no núcleo, ao contrário de GFP, que está difusa no citoplasma celular. Como controle, os núcleos foram corados com DAPI (azul) (Figura 16, painel E). Ao realizarmos a sobreposição das duas imagens (verde e vermelho), podemos observar uma leve coloração alaranjada devido à presença de GFP ao “redor” do núcleo, mas não uma cor amarela que indicaria uma co-localização das duas proteínas.

No entanto, o tratamento por 30 minutos das células com o inibidor de MEK 1/2 (UO126) antes da infecção pelo VV- Δ TK-GFP reduziu, significativamente, a quantidade de proteína Egr-1 detectada no ambiente celular e impediu completamente a translocação desta proteína ao núcleo (Figura 16, painel F).

Como controles deste experimento, uma amostra não infectada e sondada com o anticorpo anti-Egr-1 e com o anti IgG de coelho conjugada a rodamina foram utilizados como controle negativo (Figura 16, painel A) e uma amostra tratada por 45 minutos com 10% de SFB e sondada com os mesmos anticorpos, foi utilizada como controle positivo da indução e translocação nuclear da proteína Egr-1 (Figura 16, painel B). Como controle da expressão da GFP pelo VV recombinante uma amostra infectada pelo VV- Δ TK-GFP por 12 horas foi somente fixada e analisada (Figura 16, painel C) e finalmente para verificar a expressão de proteínas virais durante a infecção pelo VV-

Δ TK-GFP, doze horas após a infecção, uma amostra celular foi sondada com o anticorpo anti a proteína estrutural do VV H3, utilizado para identificar as fábricas virais (Figura 16, painel D), sendo a expressão desta proteína semelhante à observada após a infecção com o VV WR (dado não mostrado).

O conjunto de dados apresentados até o momento, demonstra que o VV induz a transcrição, tradução e translocação ao núcleo da proteína Egr-1, sugerindo que esta proteína esteja atuando como um fator ativador transcricional durante a infecção por este vírus. Além disso, a participação da via MAPK MEK/ ERK 1/2 é crucial em todo este processo.

Para verificarmos se a proteína Egr-1 induzida pelo VV e transloca-se para o núcleo, estaria atuando como um regulador transcricional, nós realizamos ensaios de retardamento da mobilidade eletroforética utilizando como DNA ligante a sequência consenso do elemento regulador transcricional EBS (Sítio de ligação de Egr). Observamos, após 12 de infecção pelo VV, uma elevada atividade de ligação ao EBS (Figura 17 canaleta 7), sendo o complexo EBS/proteína formado, observado até 24 horas pós-infecção (Figura 17, canaleta 8). Estes resultados nos sugerem, que a proteína Egr-1, após se translocar ao núcleo, atua como regulador transcricional. Além disso, a ativação da via de sinalização MEK/ERK é requerida para que este evento ocorra, uma vez que o inibidor específico de MEK 1/2 (UO 126) impede completamente a formação do complexo EBS/proteína (Figura 17, canaletas 9 a 11).

A especificidade da ligação proteína/DNA foi confirmada por ensaios de competição homóloga ou heteróloga, respectivamente, utilizando-se o oligonucleotídeo EBS e o não relacionado NF- κ B, não marcados (Figura 17, canaletas 15 e 16), sendo que apenas o oligonucleotídeo EBS foi capaz de deslocar a formação de complexo DNA/proteína.

Para comprovarmos a participação de Egr-1 no complexo DNA/proteína formado, nós utilizamos o anticorpo anti-Egr-1. A pré-incubação deste anticorpo com o extrato proteico total antes da reação com o oligonucleotídeo Egr-1 marcado isotopicamente, foi capaz de provocar um super retardamento do complexo observado, caracterizando assim a presença de Egr-1 no mesmo (Figura 17, canaleta 17).

Desta forma, e baseado nos resultados até aqui apresentados, podemos sugerir que a proteína Egr-1 induzida após a infecção pelo VV, é capaz de se translocar até o núcleo, onde atuaria como um fator regulador transcricional.

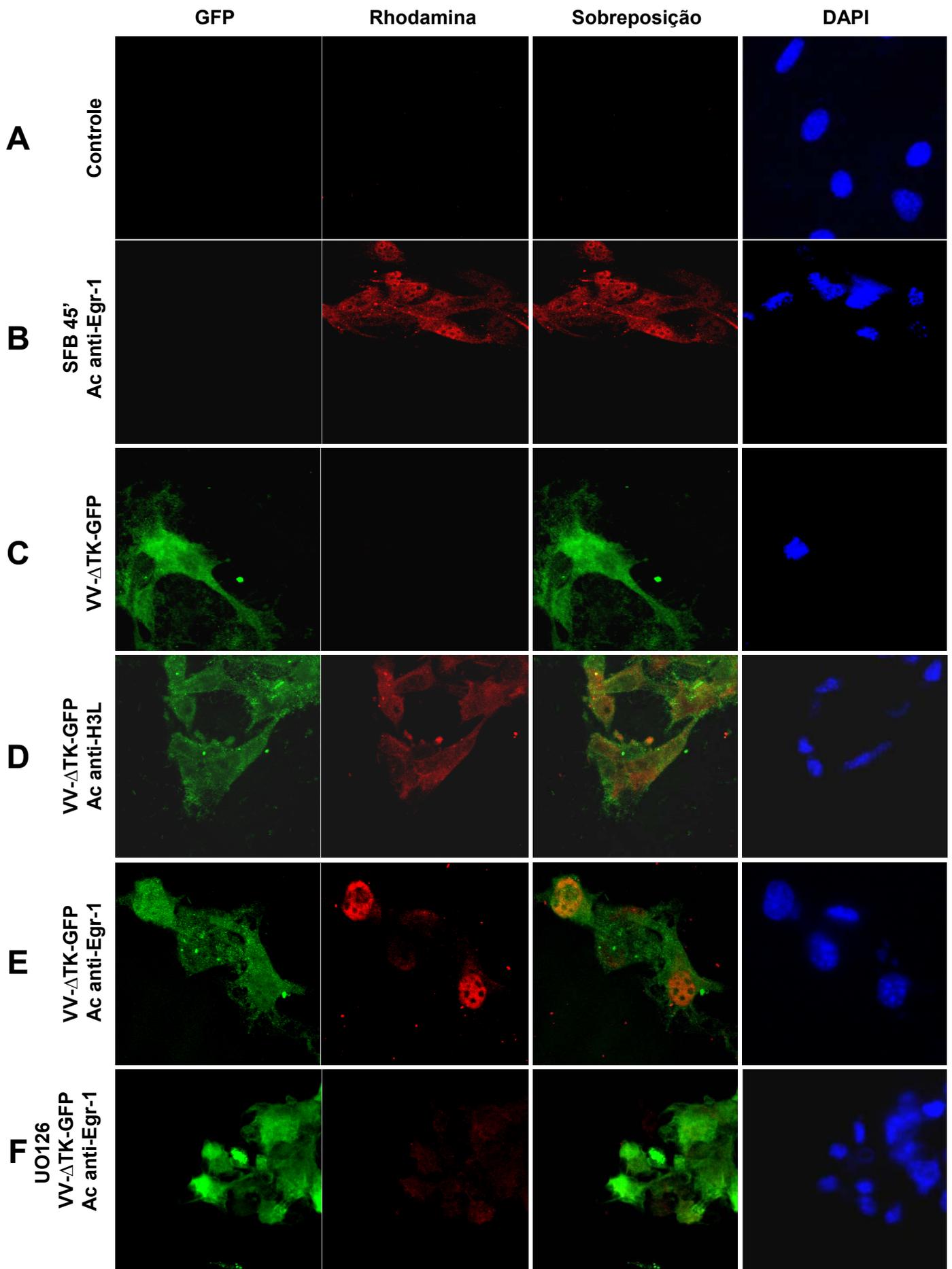


Figura 16: Localização celular da proteína Egr-1 em resposta à infecção pelo VV.

Células A31 foram crescidas em lamínulas e carenciadas por ~12 horas em meio DMEM suplementado com 1% SFB. As células foram previamente tratadas ou não com UO126 (15µg/ml) por 30 minutos e então infectadas com o VV-ΔTK-GFP, a m.o.i. 10,0. Após 12 horas as células foram lavadas, fixadas e permeabilizadas. Em seguida as células foram incubadas com o anticorpo primário de interesse, na diluição 1:200, seguida da reação com o anticorpo secundário marcado com Rhodamina (1:200). O núcleo foi marcado com DAPI (100mg/ml). As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro utilizando-se mowiol e analisadas em microscópio confocal. ZEISS (LSM 510 META), sendo as imagens obtidas processadas com o software ZEISS, LSM 510.

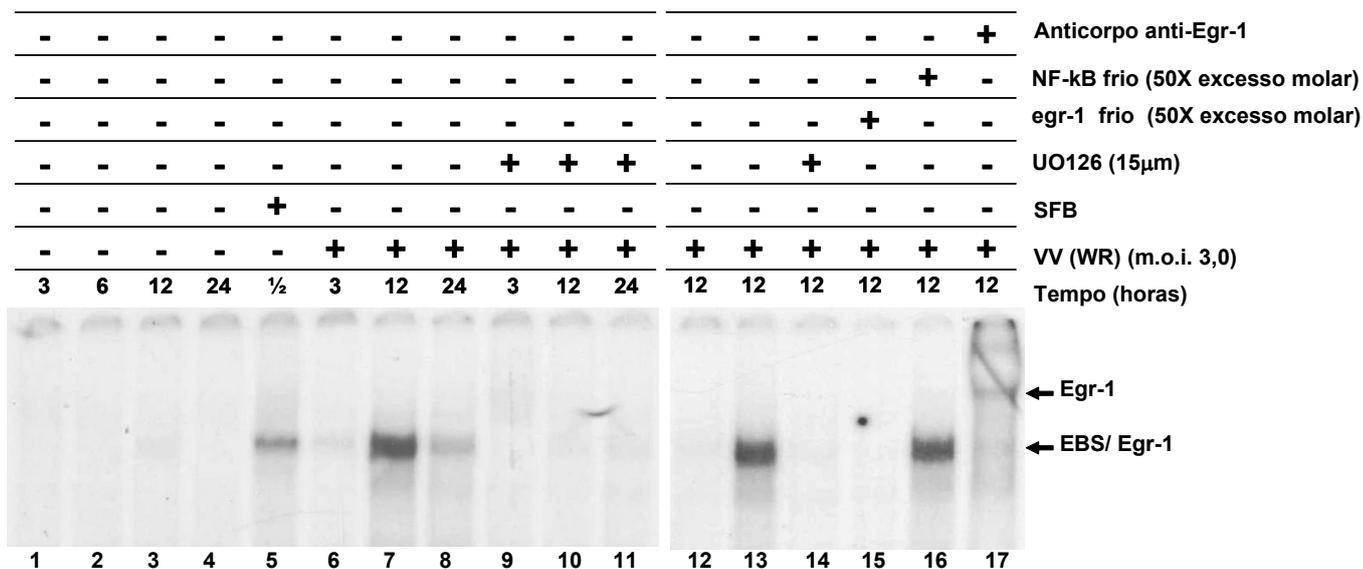


Figura 17: Análise das interações do elemento regulatório EBS com proteínas de células A31 infectadas pelo VV

Células foram crescidas em DMEM suplementado com 7 % de SFB até atingirem 90 % de confluência, sendo então, carenciadas no mesmo meio contendo 1% de SFB por ~12 horas. As células foram pré-tratadas ou não com UO 126 (15μg/ml) e infectadas com o VV WR m.o.i. 3,0. Após diferentes tempos, as proteínas totais celulares foram extraídas. Vinte microgramas de proteínas foram adicionadas de 5×10^4 cpm/amostra do oligonucleotídeo correspondente ao elemento EBS marcado com $^{32}\text{p}[\gamma\text{ATP}]$. A reação foi fracionada em gel de poliacrilamida 6%. Proteínas totais extraídas de células não infectadas foram utilizadas como controles negativos e células estimuladas com 10% de SFB como controle positivo. Como controle da especificidade da reação, as proteínas foram pré-incubadas com 50X excesso molar das sondas EBS ou NF-κB não marcadas. No ensaio de super retardamento realizado, utilizamos anticorpo anti-Egr-1, o qual foi incubado com as proteínas por 1 hora a 4°C , antes da adição da sonda marcada.

6.4 - O VV também estimula a ligação de proteínas à seqüência regulatória AP-1 de maneira dependente de MEK/ERK

O fator de transcrição AP-1 tem sido associado a diversos eventos celulares incluindo transformação, proliferação, diferenciação e apoptose. AP-1 é freqüentemente representado como um marcador de decisão nuclear comum que determina o destino de vida ou de morte celular em resposta a estímulos celulares. Entretanto, está claro que o contexto celular é crítico para determinar a contribuição de AP-1 (Ameyar *et al.*, 2003). AP-1 pode ser composto por qualquer homodímero ou heterodímero entre os membros das famílias JUN (c-Jun, v-Jun, Jun-B e Jun-D), FOS (c-Fos, Fos-B, Fra-1 e Fra2), fatores ativadores transcricionais (ATF-2, ATF-3, LRF-1, B-ATF, JDP-1, JDP-2) ou MAF (v-Maf, c-Maf, Maf-A/B/F/G/K, Nr1). Todas estas famílias pertencem à classe da família bZIP de seqüência específica de proteínas diméricas que se ligam ao DNA através de zíper de leucina (Bosscher *et al.*, 2003).

Em ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética, quando o oligonucleotídeo correspondente à seqüência consenso da seqüência regulatória AP-1 foi reagido com o lisado protéico de células infectadas pelo VV, observamos a formação do complexo DNA/proteína 3 horas após a infecção (Figura 18, canaleta 6) sendo que um significativo aumento na ligação ao DNA foi observado 12 horas pós-infecção, sendo mantido até 24 horas (Figura 18, canaletas 8 e 9). Além disso, a ativação de MEK/ERK 1/2 é absolutamente necessária para a ligação DNA/proteína, uma vez que o inibidor específico de MEK 1/2 (UO126), foi capaz de reduzir a níveis basais a formação do complexo DNA/ Proteína após a infecção pelo VV (Figura 18, canaletas 10 a 12).

A especificidade da ligação proteína/DNA foi confirmada por ensaios de competição heteróloga ou homóloga, respectivamente, utilizando-se o oligonucleotídeo não relacionado NF- κ B e o oligonucleotídeo AP-1 não marcados (Figura 18, canaletas 16 e 17), sendo que apenas o oligonucleotídeo AP-1 foi capaz de deslocar fortemente, a formação de complexo DNA/proteína.

Para melhor caracterizarmos o complexo DNA/proteína formado, utilizamos o anticorpo anti-JUN que reconhece o zíper de leucina das proteínas que podem participar do fator

de transcrição AP-1. A pré-incubação deste anticorpo com o extrato proteico total antes da reação com o oligonucleotídeo AP-1 marcado isotopicamente, foi capaz de abolir a formação do complexo DNA/proteína, identificando Jun como uma proteína participante deste complexo (Figura 18, canaleta 18).

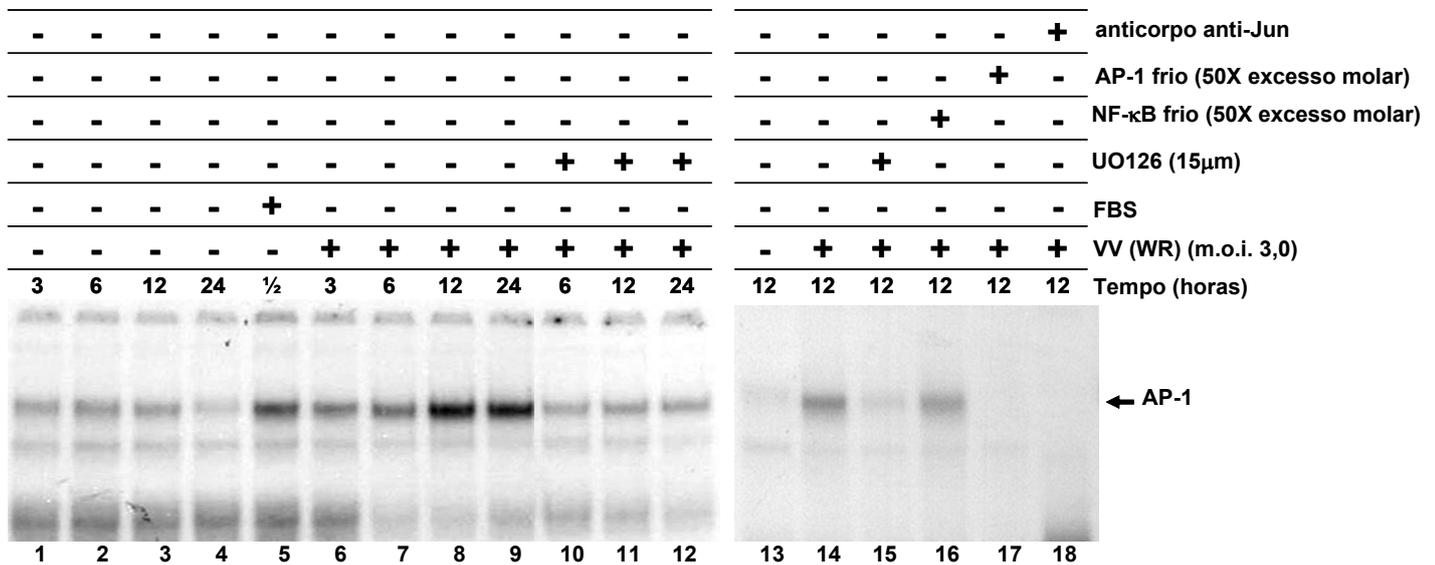


Figura 18: Análise das interações do elemento regulatório AP-1 com proteínas de células A31 infectadas com o VV

Células foram crescidas em DMEM suplementado com 7 % de SFB até atingirem 90 % de confluência, sendo então, carenciadas no mesmo meio contendo 1% de SFB por ~12 horas. As células foram pré-tratadas ou não com UO 126 (15μg/ml) e infectadas com o VV WR m.o.i. 3,0. Após diferentes tempos, as proteínas totais celulares foram extraídas. Vinte microgramas de proteínas foram adicionadas de 5×10^4 cpm/amostra do oligonucleotídeo correspondente ao elemento AP-1 marcado com $^{32}\text{p}[\gamma\text{ATP}]$. A reação foi fracionada em gel de poliácridamida 6%. Proteínas totais extraídas de células não infectadas foram utilizadas como controles negativos e células estimuladas com 10% de SFB como controle positivo. Como controle da especificidade da reação, as proteínas foram pré-incubadas com 50X excesso molar das sondas AP-1 ou NF-κB não marcadas. No ensaio de super retardamento realizado, utilizamos anticorpo anti-fosfo JUN, o qual foi incubado com as proteínas por 1 hora a 4°C , antes da adição da sonda marcada.

6.5 – O papel da via sinalizadora MEK/ERK 1/2 na expressão de Egr-1 e na multiplicação viral

6.5.1 – MEK/ERK 1/2 é requerida para a expressão de Egr-1 induzida pelo VV

Em estudo recente realizado em nosso laboratório, Andrade e colaboradores (2004), demonstraram que a infecção pelo VV promove a ativação sustentada de ERK 1/2, e verificaram através da utilização do inibidor PD 98059, que a proteína MEK é fundamental para esta ativação sendo também requerida para a multiplicação do VV, uma vez que, o inibidor foi capaz de reduzir a produção viral em aproximadamente uma unidade logarítmica. Entretanto, devemos considerar que a detecção por ensaios imunológicos de proteínas fosforiladas, embora necessário, o mesmo pode não ser suficiente para que estas proteínas estejam biologicamente ativas, e que a utilização de inibidores químicos de proteínas quinases pode gerar vários efeitos inespecíficos. Para solucionar estas questões, geramos em nosso laboratório, transfectantes expressando de forma estável dominância negativa (DN) para a proteína MEK, bem como, transfectantes estáveis apresentando o fenótipo selvagem (WT) para a mesma.

Primeiramente, os clones transfectados estavelmente com o plasmídeo expressando DN ou WT e resistentes a G418, foram caracterizados quanto a ativação do substrato de MEK ERK 1/2, após a indução com EGF (50ng/ml), ou após a infecção pelo VV WR. Foram selecionados dois clones apresentando fenótipo normal para MEK-1, semelhante às células não transfectadas (MEK-WT10 e MEK-WT11) e dois clones apresentando fenótipo dominante negativo para MEK-1 (MEK-DN2 e MEK-DN3) (Figura 19A).

A infecção celular pelo VV, no clone MEK-DN3, não foi capaz de induzir a expressão de Egr-1 em nenhum dos tempos analisados (Figura 19B, canaletas 1-6), ao contrário do que observamos nas células MEK-WT11, onde Egr-1 foi expressa normalmente em resposta a infecção pelo VV nos tempos analisados (Figura 19B, canaletas 8-13). Resultados semelhantes foram obtidos após infecção dos clones MEK-DN2 e MEK-WT10 (resultados não mostrados). Estes resultados, comprovam aqueles obtidos anteriormente pelo nosso Grupo utilizando o inibidor químico PD 98058, confirmando o papel da via MEK-ERK 1/2 na expressão da proteína Egr-1 após a infecção pelo VV.

6.5.2 – MEK/ERK 1/2 é necessária à multiplicação viral

Para verificarmos a relevância biológica desta via sinalizadora, realizamos a infecção do clone MEK-DN3 pelo VV, a qual produziu placas de lise menores do que aquelas observadas durante a infecção do clone selvagem (MEK-WT10), indicando uma dificuldade multiplicativa viral na ausência da ativação de ERK 1/2 pelo VV (Figura 20A). Para comprovar o papel da via MEK/ERK 1/2 na multiplicação do VV, realizamos também cinética de produção viral e observamos um decréscimo de aproximadamente uma unidade logarítmica no título viral obtido, respectivamente, 85,2 % e 91,2 % após 24 ou 48 hpi do clone MEK-DN3, quando comparado com os títulos obtidos com o clone MEK-WT10 (Figura 20B). Estes resultados ratificam, portanto, a importância da via MEK/ERK 1/2 para a eficiente multiplicação do VV. Resultados semelhantes foram obtidos quando utilizamos WT-11 versus DN-2.

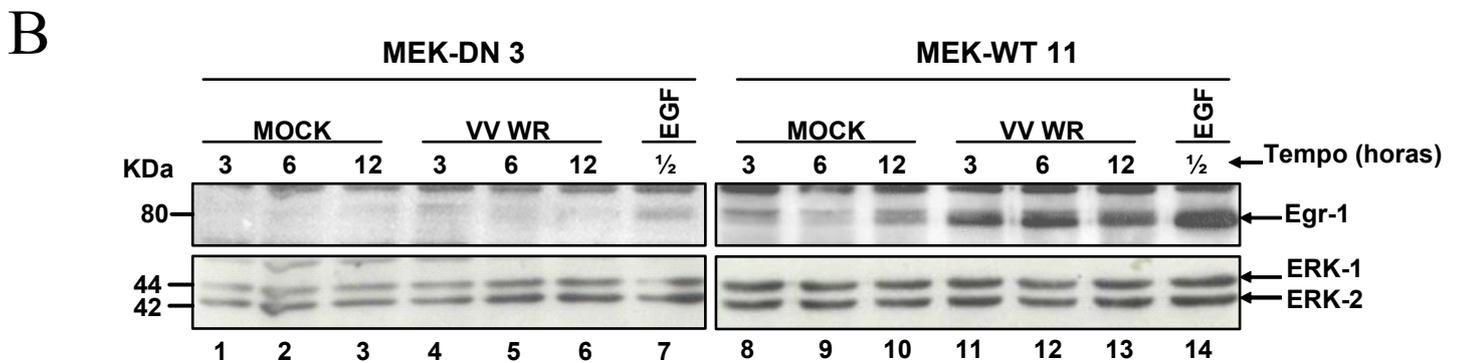
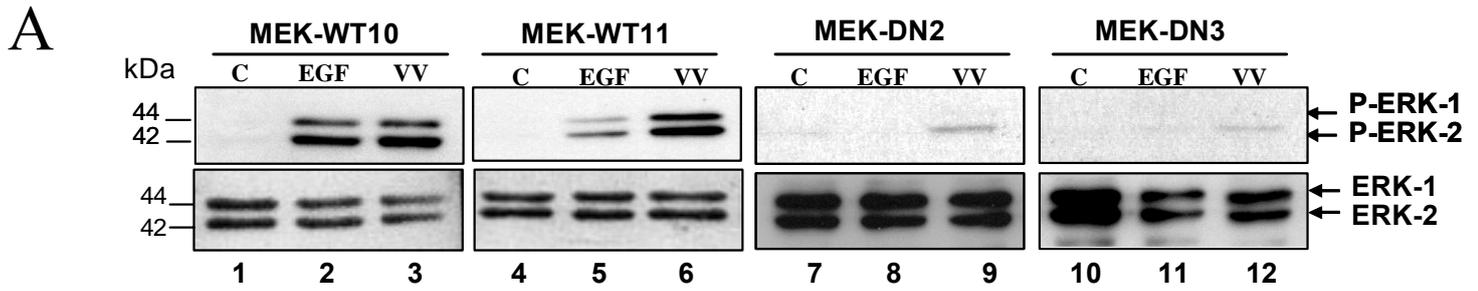
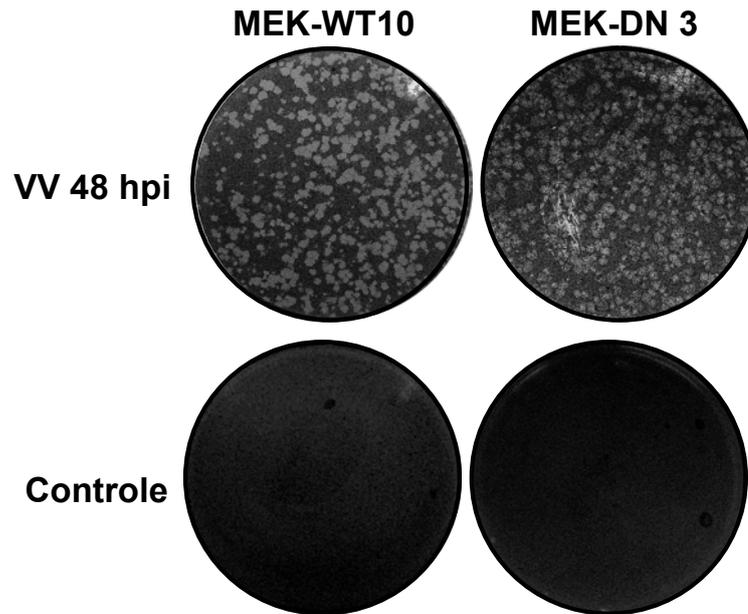


Figura 19: O papel de MEK/ERK 1/2 na expressão de Egr-1 em resposta à infecção celular pelo VV.

Os clones MEK-DN e MEK-WT foram crescidos em DMEM suplementado com 7 % de SFB até atingirem 90 % de confluência, sendo então, carenciados no mesmo meio contendo 1% de SFB por ~12 horas, quando foram infectados com VV (m.o.i. 3,0) por 4 horas (A) ou pelos tempos indicados (B) ou estimuladas com EGF (50µg/ml), por 30'. As proteínas totais celulares foram extraídas e 25 µg foram fracionadas em gel de poliacrilamida/SDS (PAGE) 10% e transferidas para membranas de nitrocelulose, sendo, então, sondadas com anticorpo anti fosfo ERK 1/2 (A) ou anti- Egr-1 (B). A normalização da quantidade de proteínas nas diferentes canaletas, foi feita utilizando-se anticorpo anti- ERK 1/2. Células não infectadas foram utilizadas como controles negativos (MOCK).

A



B

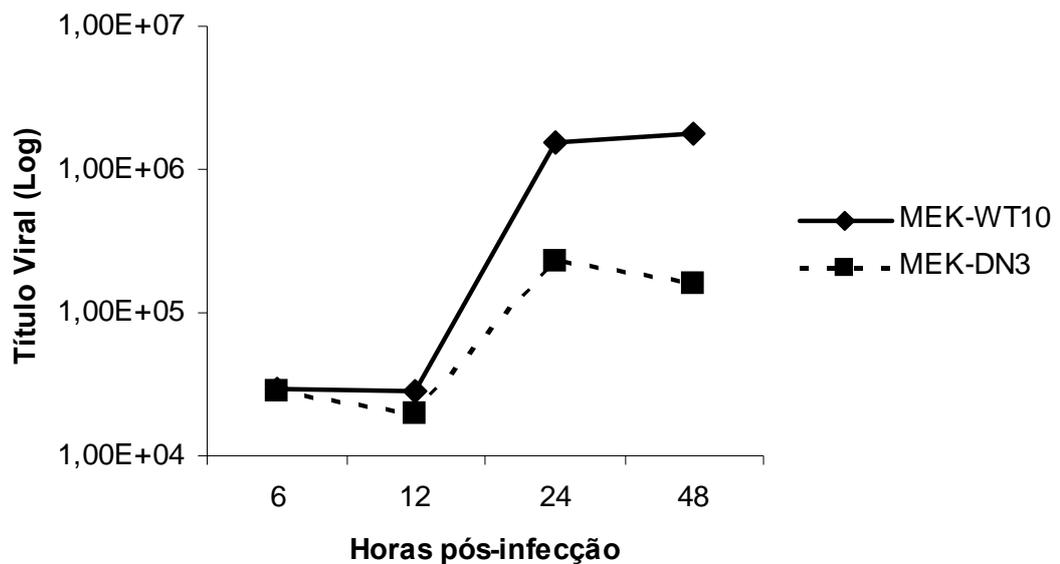


Figura 20: Relevância da via sinalizadora MEK/ERK para a multiplicação do VV

Células MEK-WT ou MEK-DN-10 (4×10^5), foram implantadas em placas de 6 câmaras e após 24 horas foram carenciadas por ~12h em meio DMEM suplementado com 1% SFB, sendo então, e infectadas com VV m.o.i. 3,0. (A) 48 horas pós -infecção a monocamada celular foi fixada e corada. Células não infectadas foram utilizadas como controles. (B) Após 6, 12, 24 e 48 horas pós-infecção os vírus foram coletados e o título determinado em células Vero.

6.7 – Análise da relevância de Egr-1 na multiplicação do VV

6.7.1 – Caracterização dos clones celulares expressando siRNA para Egr-1

Para examinar a importância da expressão de Egr-1 regulada pelo VV, e sua relevância biológica, geramos clones de célula A31 transfectados estavelmente com p*Silencer*-HI-neo-siRNA-anti-egr-1. Para caracterizar o nível de silenciamento gênico de egr-1 exercido pelo siRNA, aproximadamente 30 clones resistentes a G418 obtidos, foram analisados e caracterizados pelo acúmulo do mRNA e pela expressão de Egr-1. Foram selecionados um clone silenciado parcialmente para Egr-1 (siEGR1-01) e um clone onde se observava $\geq 90\%$ de silenciamento para Egr-1 (siEGR1-20) em comparação ao controle negativo (siRNA-15). As análises foram efetuadas em resposta ao tratamento com SFB e à infecção pelo VV (Figura 21).

Também foram gerados, analisados e caracterizados clones estavelmente transfectados com p*Silence* HI-neo-siRNA-controle negativo (expressa siRNA não relacionado, ou irrelevante, a nenhuma sequência genômica conhecida de humano, camundongo ou rato). Foi escolhido o clone siRNA-15, que expressa a proteína Egr-1 em níveis comparáveis àqueles de células A31 não transfectadas (Figura 21B).

6.7.2 – Análise da multiplicação do VV nos clones expressando siRNA para Egr-1

Inicialmente, realizamos ensaios de multiplicação viral a m.o.i. de 10,0, durante 12 horas, utilizando clones celulares expressando diferentes níveis de silenciamento para Egr-1. Verificamos a produção viral nas células silenciadas para Egr-1 (siEGR1-20) foi reduzida em 86%, ou seja, cerca de um log, em comparação àquela expressando níveis normais de Egr-1 (siRNA-15) (Tabela 1). Em contrapartida, a produção viral no clone parcialmente silenciado para Egr-1 (siEGR1-01) foi reduzida em apenas 43% (Tabela 1), indicando que a multiplicação do VV está diretamente relacionada com os níveis de expressão desta proteína.

Verificamos a seguir o fenótipo das placas de lise virais nas células silenciadas ou não para Egr-1. A infecção pelo VV nas células siEGR1-20 foi, não apenas numericamente

extremamente mais restrita, mas também as placas de lise foram significativamente menores do que aquelas observadas nas células siRNA-15, demonstrando assim maior dificuldade multiplicativa viral na ausência de Egr-1 e sua importância no ciclo de multiplicação do VV (Figura 22A).

Para averiguar a possibilidade da ausência (quase total ou parcial) de Egr-1 estar apenas retardando, ao invés de inibindo, a produção de nova progênie do VV, foi realizado uma curva de multiplicação viral em ciclo único. A Figura 22B mostra que a produção viral nas células silenciadas é sempre reduzida em relação aos títulos obtidos nas células selvagens, apresentando uma redução de ~71 % e de 81 %, após 24 e 48 horas de infecção, respectivamente. Este conjunto de resultados ilustra claramente o papel crucial desempenhado por Egr-1, cuja transcrição e tradução prolongada, sua translocação nuclear e, provavelmente, sua atividade reguladora transcricional, em resposta à infecção pelo VV, têm reflexos altamente positivos para a biologia deste orthopoxvírus.

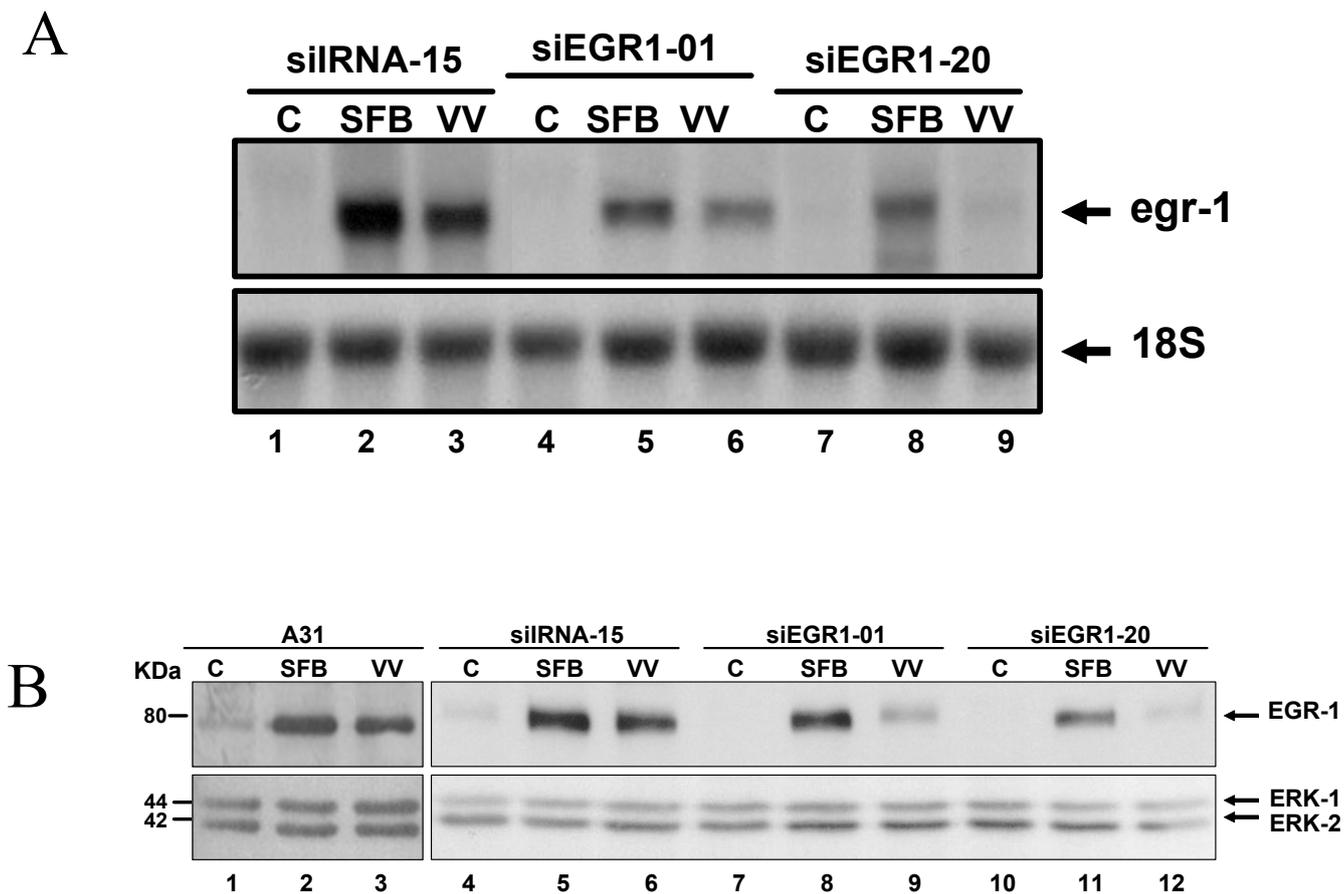


Figura 21: Caracterização dos clones celulares expressando siRNA para Egr-1

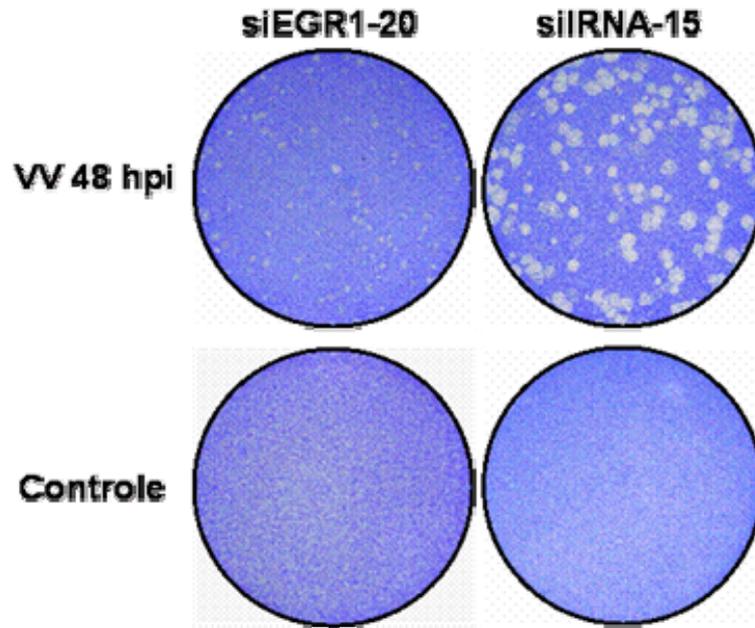
Células A31, ou clones estavelmente transfectados com p*Silencer*-HI-neo-siRNA-anti-egr-1 (siEGR), ou p*Silence* HI-neo-siRNA-controle negativo (siRNA) resistentes a G418, foram crescidos em DMEM suplementado com 7 % de SFB até atingirem 90 % de confluência, sendo então, carenciadas no mesmo meio contendo 1% de SFB por ~12 horas, quando foram infectadas com VV (m.o.i. 3,0) por 4 horas ou induzidas com 10% de SFB por (A) 30 ou (B) 45 minutos. (A) Os RNAs celulares totais foram extraídos e 15µg foram fracionados em gel de agarose/formaldeído a 1,5%, transferidos para membrana de nylon e hibridizados com sonda do gene egr-1 marcada com dCTP (³²P). O controle da quantidade de RNA nas diferentes canaletas, foi feito utilizando-se sonda para 18S rRNA. Células não induzidas foram utilizadas como controles negativos. (B) As proteínas totais celulares, foram extraídas e 25 µg foram fracionadas em gel de poliacrilamida/SDS (PAGE) 10% e transferidas para membranas de nitrocelulose, que foram sondadas com anticorpo anti- Egr-1. A normalização da quantidade de proteínas nas diferentes canaletas, foi feita utilizando-se anticorpo anti- ERK 1/2.

Tabela 1: Efeito do silenciamento do gene egr-1 por siRNA na multiplicação do VV.

Célula	% produção viral	% de inibição
siIRNA-15	100	0
siEGR-01	57	43
siEGR-20	14	86

Clones siEGR-01 e -20 e siIRNA-15 foram infectados com o VV a m.o.i. 10,0 e após 12 horas de infecção as células foram lisadas e os títulos virais determinados. Consideramos 100% o título viral obtido do clone não silenciado para o gene egr-1 (siIRNA-15).

A



B

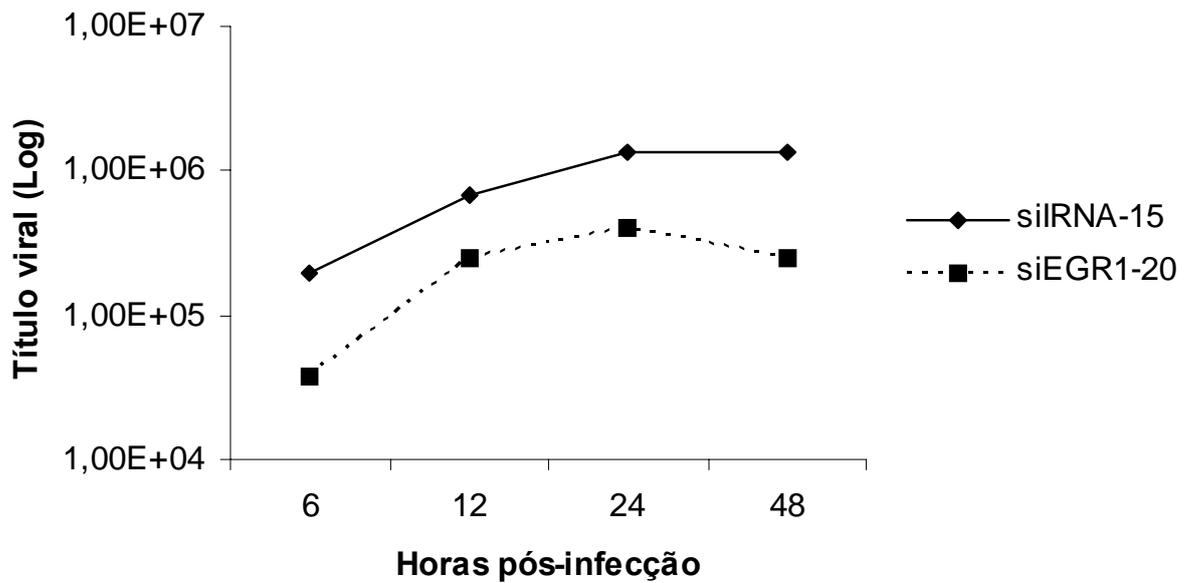


Figura 22: Relevância da proteína Egr-1 para a multiplicação do VV

Os clones celulares siEGR-20 ou siRNA-15 (4×10^5) foram implantados em placas de 6 câmaras, e após 24 horas, foram carenciadas por ~12h em meio DMEM suplementado com 1% SFB e infectados com VV a m.o.i. 3,0. (A) 48 horas pós-infecção a monocamada celular foi fixada e corada. Células não infectadas foram utilizadas como controles. (B) Após 6, 12, 24 e 48 horas de infecção os vírus foram coletados e os títulos determinados em células Vero.

7 – DISCUSSÃO

Durante a multiplicação dos poxvírus, um fenômeno de proliferação celular localizada pode ser observado. Este fenômeno tem sido associado à liberação de um fator de crescimento solúvel lançado no meio extracelular a partir das células infectadas. No caso do vírus Vaccinia este fator foi denominado fator de crescimento do VV (VGF), o qual apresenta similaridade estrutural e funcional aos fatores de crescimento EGF e TGF α (Blomquist *et al.*, 1984; Brown *et al.*, 1985; Reisner 1985; Buller *et al.*, 1988a e 1988b). Em função disso, tem se atribuído aos poxvírus uma atividade relacionada à proliferação celular durante a infecção, sendo o VGF o mediador responsável por desencadear esse efeito mitogênico. O resultado desta “estratégia” apresentada pelos poxvírus é que, estimulando a atividade proliferativa das células, a própria replicação viral seria favorecida em função da disponibilidade de precursores metabólicos, maquinaria enzimática e energia necessárias aos seus processos biossintéticos. De fato, alguns relatos demonstram que a replicação do mutante, deficiente para o VGF é mais eficiente em células que não estão em quiescência (Buller *et al.*, 1988a).

Além dos poxvírus, a indução de eventos celulares relacionados a mitogênese durante à infecção, como a ativação de proto-oncogenes ou da síntese de DNA, para ativar genes celulares necessários à replicação viral, foram relatadas para outros vírus, como por exemplo, citomegalovírus humano, vírus Epstein-Barr, adenovírus, vírus da hepatite B e HTLV, os quais foram capazes de promover a ativação transcricional do proto-oncogene *c-fos* como parte de suas estratégias replicativas (Boldogh *et al.*, 1990; Flemington e Speck, 1990; Su *et al.*, 1995; Natoli, *et al.*, 1995; Fujita e Shidu, 1995; Fujii *et al.*, 1995). Podemos ainda ressaltar a indução da expressão do gene *egr-1* pelos vírus HTLV-I, HSV, EBV e HIV (Black *et al.*, 1997; Tatarowicz *et al.*, 1997; Calogero, *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 2004; Dron *et al.*, 1999).

Magalhães e colaboradores, 2001, demonstraram que a indução do gene *c-fos* após a infecção pelo VV, é paralela a indução deste gene observada após tratamento com soro, isto é, foi detectada após 5 minutos sendo, máxima aos 30 minutos de infecção, declinando em seguida. A indução da expressão do mRNA de *c-fos* em células infectadas com VV foi independente da multiplicidade viral (m.o.i.), da presença da proteína VGF e da integridade do DNA viral. Através de ensaios do retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA), verificou-se o aumento da atividade de ligação dos fatores de transcrição (SRE, AP-1 e CRE) ao DNA.

No presente estudo, pudemos verificar que a indução de *egr-1* em resposta à infecção viral, (Figura 9), ocorreu de forma distinta daquelas observadas frente à estimulação do gene por SFB (Suktame *et al.*, 1988, Oliveira *et al.*, 1997) ou a expressão de *c-fos* induzida pelo VV (Magalhães *et al.*, 2001). Enquanto as induções decorrentes destes dois últimos estímulos apresentaram uma cinética rápida e transiente (5 a 30 minutos), a cinética de acumulação do mRNA de *egr-1*, embora ligeiramente retardada (30 minutos - 1 hora pós-infecção), foi prolongada (até 9 horas pós-infecção) (Figura 9). Os níveis elevados de acumulação da mensagem de *egr-1*, em resposta à infecção pelo VV, se correlacionam diretamente com aqueles da proteína Egr-1, os quais foram observados durante praticamente todo o ciclo de multiplicação do VV, desde 1 hora de infecção até 36 horas pós-infecção (Figura 14).

Andrade e colaboradores (2004), demonstraram que VGF, embora não seja essencial é necessário para a ativação máxima de ERK 1/2 e expressão da proteína Egr-1. Sugere-se então que o VGF não é o único responsável pela estimulação mitogênica desencadeada pelo VV, uma vez que este vírus é capaz de estimular mitogenicamente às células independentemente de VGF. Desta forma o VV pode estar atuando no sentido de retirar as células do estado de quiescência (G0), estimulando a mitogênese das mesmas, nos momentos iniciais de sua infecção. A expressão de Egr-1 remanescente induzida pelo VV VGF⁻ não envolve qualquer proteína solúvel, sendo, portanto, provavelmente dependente de proteínas intracelulares. Entretanto, a secreção de VGF no meio extracelular é capaz de induzir a expressão de Egr-1 nas células adjacentes não infectadas. (Andrade *et al.*, 2004).

Verificamos que o acúmulo de mRNA de *egr-1* é dependente da multiplicidade de infecção (Figura 10), o que sugere a participação de um gene(s) precoce(s) viral(is) na indução gênica, uma vez que a expressão do gene coincide com a síntese de proteínas virais precoces. Esta observação, novamente contrasta, com a expressão de *c-fos* estimulada pelo VV, a qual se mostrou independente da m.o.i. (Magalhães *et al.*, 2001).

A expressão de genes virais imediatamente precoces começam logo após o desnudamento primário, isto é, com a liberação do cerne no ambiente intracelular, resultando no desnudamento secundário, onde as nucleoproteínas que constituem o cerne são degradadas e o DNA viral é liberado no citoplasma da célula hospedeira. Estes eventos podem ser bloqueados por inibidores de transcrição e tradução,

significando serem dependentes de mRNA, e proteína, virais (Fenner, 2002). O desnudamento secundário também pode ser impedido pela exposição do vírus a altas doses de irradiação por luz ultravioleta (Bablanian, 1981). Observamos que a indução de *egr-1* é totalmente anulada quando infectamos as células com o VV irradiado com luz-ultravioleta (Figura 11, canaleta 8), e que o tratamento prévio das células com cicloheximida também foi capaz de inibir drasticamente a mensagem de *egr-1* induzida pelo VV (Figura 11, canaleta 5), sendo que esta inibição ocorreu de maneira dose-dependente (resultado não mostrado). Estes resultados demonstram que, além da entrada na célula, as primeiras etapas do ciclo de multiplicação viral são cruciais para a indução da expressão de *egr-1* pelo VV, e que esta expressão é mediada por proteínas virais sintetizadas precocemente, ou por um co-fator celular induzido pelo VV nos momentos iniciais da infecção, ou ambos.

A transcrição do gene *egr-1*, é rápida e transiente, após a célula ter sofrido um estímulo mitogênico e geralmente é paralela àquela observada para o proto-oncogene *c-fos* (Chavrier, *et al*, 1989; Suktame *et al*, 1988; Milbrandt, 1987) e não requer síntese de proteína “de novo”, e cicloheximida, leva a uma superindução deste gene, devido à estabilização do mRNA e o prolongamento do período de transcrição (Suktame *et al*, 1988). Para entender como ocorria o acúmulo de *egr-1* em resposta à infecção pelo VV, realizamos então, um experimento de decaimento, onde pudemos observar que a adição de actinomicina D após a infecção pelo VV, promoveu uma diminuição nos níveis do mRNA de *egr-1* de maneira tempo dependente, sugerindo que a o acúmulo prolongado do mRNA de *egr-1* induzido pelo VV, deve-se a transcrição gênica contínua e não a simples estabilização da mensagem no citoplasma (Figura 12).

Verificamos, posteriormente, que os sinais desencadeados pela infecção viral e levando à expressão de *egr-1*, requerem a participação de STKs, uma vez que observamos um decréscimo dose-dependente quando utilizamos um inibidor específico H7 (Figura 13).

Uma vez que, STKs são proteínas que podem atuar acima na cascata sinalizadora, podendo levar a ativação de MEK/ERK e subsequente expressão de *Egr-1*, resultados não publicados do nosso grupo (Andrade, AA e Bonjardim, CA), demonstram que a expressão do gene ocorre dependentemente de STKs, mas que estas STKs não se posicionam acima de MEK/ERK, o que sugere a co-participação de diferentes vias sinalizadoras associadas com a indução de *Egr-1* após a infecção com o VV. Os

resultados acima, no entanto, necessitam ser explorados mais detalhadamente, pois podem revelar diferenças marcantes, quando comparados com o poxvírus associado à mixomatose de coelhos (Mixoma vírus). Estudos realizados por Johnston e colaboradores (2003), demonstram que este vírus requer a participação de STKs para o seu sucesso multiplicativo. Verificaram ainda, que as STKs envolvidas levam a ativação das proteínas PAK-1 e Raf. No entanto, diferentemente daquilo observado para o VV (Andrade AA e Bonjardim CA), verificaram que estas STKs não são sensíveis à inibição provocada por H7. Não sabemos até o momento, se PAK-1 e Raf estariam participando abaixo na cascata sinalizadora que recruta STKs após a infecção com o VV, porém estudos que vem sendo conduzidos pela doutoranda Ana Paula Salgado em nosso Grupo, demonstram que a inativação funcional de Rac-1, acarreta a diminuição, em duas unidades logarítmicas, no título viral. Como Rac-1 pode transferir os sinais desencadeados pelo VV para PAK-1/Raf, isto vem sendo atualmente analisado pelo nosso Grupo.

Constatamos que a ativação da via sinalizadora MEK/ERK é fundamental, tanto para o acúmulo do mRNA de *egr-1* (Figura 11, canaleta 4), quanto para a expressão desta proteína durante praticamente todo o ciclo de multiplicação do VV (Figura 15).

Estes resultados, juntamente com o fato da ativação de ERK 1/2 culminar na ativação de Elk-1, nos sugere que a ativação transcricional de *egr-1* ocorra através do elemento regulatório SRE presente no promotor do gene *egr-1*. De fato, o acúmulo do mRNA de *egr-1* em resposta a estímulos mitogênicos como soro, PDGF, e PMA (phorbol 12 myristate 13 acetate) é quase completamente dependente da ativação da via de sinalização Ras-Raf-MEK-ERK (revisado por Thiel e Cibelli, 2002), que após serem fosforiladas induzem a atividade transcricional de *egr-1*, através da ativação do fator do complexo ternário, Elk-1 e ativação transcricional via SRE (Lim *et al.*, 1998; Christy e Nathans 1989; Duan *et al.*, 2002; revisado por Thiel e Cibele, 2002).

Resultados preliminares, que observamos utilizando SRE em ensaios de EMSA, sugerem que a infecção pelo VV acarreta a ligação de proteínas nesta seqüência regulatória e que a mesma é dependente de MEK/ERK, uma vez que foi inibida por PD98059. No entanto, como nossa análise restringiu-se a momentos precoces da infecção (até 4 horas), a mesma necessita ser extensiva até tempos tardios da infecção, sendo que, por estas razões, os resultados não foram incluídos nesta tese. Diferentes

elementos regulatórios presentes no promotor de *egr-1* podem ser requeridos, e contribuir diferencialmente na ativação transcricional deste gene, dependendo do estímulo e do tipo celular. Sendo assim, não podemos descartar a participação de outros elementos regulatórios presentes na região 5' do gene *egr-1*. Resultados obtidos em nosso laboratório demonstram que os fatores de transcrição CREB/ATF-1 também são fosforilados em resposta a infecção pelo VV, no entanto, esta ativação não pôde ser correlacionada com a via MEK/ERK, pois não foi afetada pelo prévio tratamento celular com o inibidor de MEK PD98059 (Andrade *et al.*, 2004).

Verificamos que a infecção pelo VV aumentou a atividade de ligação protéica ao elemento regulatório AP-1 de maneira dependente de MEK/ERK, além da participação da proteína Jun no complexo DNA/Proteína formado (Figura 17). Estes achados são reforçados pela observação de que a ativação das ERKs também é requerida para a fosforilação de c-Jun, uma vez que a presença do inibidor de MEK (PD98059) impediu a fosforilação de c-Jun em resposta a infecção pelo VV (Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira, doutorado em andamento). Ressaltamos que o fator de transcrição AP-1 é codificado por proto-oncogenes e tem sido associado a diversos eventos celulares incluindo transformação, proliferação, diferenciação e apoptose. AP-1 é, freqüentemente, representado como um marcador de decisão nuclear comum, que determina o destino de vida ou de morte celular em resposta a estímulos celulares (Ameyar *et al.*, 2003).

A participação de Egr-1, em múltiplos eventos celulares, é comumente atribuída à sua atividade transcricional, desta forma, a regulação da atividade de Egr-1 pode ocorrer tanto em nível transcricional, como pós-traducional (Mora *et al.*, 2004). A indução de Egr-1, não assegura, no entanto, que a mesma esteja exercendo sua função ativadora transcricional durante a infecção pelo VV. A translocação de Egr-1 do citoplasma para o núcleo é requisito fundamental, embora não suficiente, para a sua atividade transativadora. No entanto, como a replicação do VV ocorre exclusivamente no citoplasma da célula hospedeira (Moss, 1996), devemos considerar que Egr-1 poderia atuar como transativadora de genes virais, permanecendo então no citoplasma.

Constatamos que Egr-1, após traduzida em resposta a infecção pelo VV, transloca-se preferencialmente para o núcleo da célula hospedeira, onde provavelmente atua como transativadora transcricional (Figura 16, painel E). Embora a análise “*in silico*” não

tenha evidenciado nenhuma seqüência semelhante àquela utilizada por Egr-1 para se ligar ao DNA viral, e sua compartimentalização, principalmente nuclear, sugira função transativadora gênica, experimentos adicionais serão necessários para comprovar esta função.

A atividade reguladora transcricional de Egr-1 foi também reforçada pela sua capacidade de ligação ao EBS, após se translocar ao núcleo, em resposta à infecção pelo VV (Figura 17).

Assim como demonstramos que a via sinalizadora MEK/ERK é requerida para a transcrição e tradução de Egr-1, verificamos também que a mesma é igualmente necessária para que Egr-1 se transloque para o núcleo e possa atuar como regulador transcricional (Figura 16, painel F; Figura 17).

Infelizmente não localizamos as fábricas virais devido, provavelmente, ao fato de que o gene que codifica a proteína GFP, seja exógeno, além de não estar sob o controle de um promotor viral e não possuir nenhum sinal de localização celular. Isto poderá ser resolvido utilizando-se um vírus VV que tenha GFP fusionado a gene tardio viral. Como é o caso do vírus VV-F13-GFP (gentilmente cedido pelo Dr Bernard Moss, NIH, Bethesda, USA), o qual encontra-se, no momento, em fase de purificação.

Nosso Grupo já havia demonstrado que a ativação de MEK/ERK é requerida, tanto para a acumulação da proteína Egr-1 após a infecção pelo VV, quanto para o sucesso da multiplicação deste vírus (Magalhães *et al.*, 2001; Andrade *et al.*, 2004). No entanto, estes resultados foram baseados na detecção por ensaios imunológicos de proteínas fosforiladas e na utilização do inibidor químico PD 98059. Devemos levar em consideração que, a fosforilação de proteínas quinases, embora necessária, pode não ser suficiente, para que as mesmas estejam biologicamente ativas e a utilização de inibidores químicos pode gerar vários efeitos inespecíficos.

A utilização dos clones transfectantes expressando de forma estável dominância negativa (DN) para a proteína MEK, comprovou os resultados obtidos anteriormente pelo nosso grupo, uma vez que não verificamos o acúmulo da proteína Egr-1 nas células MEK-DN 3, ao contrário do observado nas células MEK-WT 11 (Figura 19B). Sendo assim, podemos afirmar que a ativação da via sinalizadora MEK/ERK é crucial para a

indução da expressão da proteína Egr-1 em resposta à infecção pelo VV, descontando, portanto, inespecificidade de ação..

Podemos também afirmar, que a via sinalizadora MEK/ERK é relevante funcionalmente para ciclo de multiplicação do VV, o que foi evidenciado pelo fenótipo das placas de lise geradas nas células MEK-DN 3, as quais foram significativamente menores do que aquelas produzidas nas células MEK-WT 11 (Figura 20A). Além disso, a ausência da ativação de MEK/ERK comprometeu significativamente a multiplicação viral, sendo, os títulos virais obtidos em torno de uma unidade logarítima menores do que aqueles observados nas células MEK-WT 11 (Figura 20B).

Devemos salientar que a ativação sustentada de ERK 1/2 pela infecção pelo VV é um modelo único na literatura. Vários estudos têm mostrado a ativação das MAPKs ERK 1/2 por diferentes vírus durante a sua multiplicação, por exemplo o vírus influenza (Kujime *et al.*, 2000), o EBV (Fenton e Sinclair, 1999) e o HIV (Ganju *et al.*, 1998), ativam as ERKs, em alguns momentos específicos da infecção. Por outro lado, os vírus RSV (Monick *et al.*, 2001), CVB3 (Luo *et al.*, 2002) e CMV (Johnson *et al.*, 2000), ativam as ERKs de forma bifásica, ou seja, primeiramente transientemente e nos momentos tardios de infecção de forma sustentada, se prolongando até o final de multiplicação viral. É importante ressaltar que este padrão de utilização desta via sinalizadora pelo VV, contrasta não apenas com os exemplos acima, mas também com aquele estimulado pelo vírus Mixoma (Wang, *et al.*, 2004). Enquanto para o VV, como demonstra este e outros trabalhos (Magalhães *et al.*, 2001; Andrade *et al.*, 2004), MEK/ERK é requerida para a transmissão de sinais mitogênicos precoces que se refletem na facilitação da multiplicação viral, a ativação de MEK/ERK é requerida para restringir o espectro de hospedeiro do Mixoma, portanto constituindo-se em um obstáculo à multiplicação deste vírus em células que não o seu hospedeiro natural, coelhos (Wang *et al.*, 2004).

Finalmente, pudemos demonstrar o importante papel desempenhado pela proteína Egr-1 durante o ciclo de multiplicação do VV, sendo sua relevância funcional observada através do seu silenciamento (siEGR-1). A produção viral correlacionou-se diretamente com o nível de silenciamento obtido com diferentes clones, verificando-se uma diminuição em torno de uma unidade logarítmica com derivam do clone que apresentou $\geq 90\%$ de silenciamento de egr-1 (Tabela 1; Figura 22B).

Além disso, o silenciamento de *egr-1*, ainda que não total, teve elevado impacto no fenótipo das placas de lises observadas, verificando-se não apenas a redução numérica das placas, mas também a diminuição do seu tamanho, o que deve estar refletindo dificuldades provocadas pelo nível de expressão de *Egr-1* no ciclo de multiplicação deste orthopoxvírus (Figura 22A).

Digno de notas, é a observação de como a utilização isolada de uma via sinalizadora pelo VV, ou a co-estimulação de vias sinalizadoras, podem contribuir para o sucesso multiplicativo deste orthopoxvírus, razão final da infecção de seus hospedeiros. Como demonstrado anteriormente pelo nosso Grupo (Magalhães *et al.*, 2001; Andrade *et al.*, 2004), e este trabalho corrobora, verificamos a relevância funcional de MEK/ERK, tanto na multiplicação, quanto no fenótipo de placa viral. Este resultado sugere que o tamanho de placa de lise viral é menor quando apenas MEK/ERK é funcionalmente inativado (Figura 20A), sendo maior quando a participação de outra(s) via(s) sinalizadora(s) envolvendo STKs seja simultaneamente requerida (Figura 22A).

Embora verificamos uma redução nos títulos virais, em torno de uma unidade logarítmica, para ambas as vias sinalizadoras analisadas, e como a produção viral foi dependente do nível obtido de silenciamento de *Egr-1*, não podemos ainda avaliar qual seria a contribuição de *Egr-1* remanescente para a multiplicação do VV, ou mesmo quanto a ausência de *Egr-1* estaria sendo compensada por algum outro membro da família EGR, embora seus reflexos no tamanho da placa de lise viral sejam significativos.

Surpreendentemente, a doutoranda Jamária A. P. Soares, do nosso Grupo de pesquisa, verificou que a infecção pelo vírus cowpox (CPV), embora promova a indução da expressão de *Egr-1* de 2 a 24 horas pós-infecção, a mesma parece não ter maior importância para a multiplicação deste vírus, uma vez que, a infecção das células silenciadas ou não para *egr-1* produziu efeitos semelhantes, tanto nos títulos virais obtidos, quanto no fenótipo das placas de lise virais observadas. Foi também demonstrado que a multiplicação do CPV é dependente de MEK/ERK, sendo capaz de induzir a fosforilação de ERK 1/2 da mesma forma que o VV. Estes resultados indicam que embora o CPV e o VV, compartilhem algumas características em comum quanto à utilização de vias de transdução de sinais, as mesmas, aparentemente, têm reflexos distintos na biologia destes vírus.

Existem na literatura, vários estudos que descrevem a importância funcional de proteínas virais no ciclo de multiplicação dos poxvírus, dentre elas: H3L (Fonseca *et al.*, 2000); DNA topoisomerase (Fonseca *et al.*, 2003); F10 (Szajner *et al.*, 2004), A13 (Unger *et al.*, 2004) dentre outras, ou mesmo gene celular, ciclofilina A, que afete a multiplicação deste vírus (Castro *et al.*, 2003). No entanto, a caracterização de uma via sinalizadora, levando a expressão de uma proteína celular, que tenha reflexo, tanto na multiplicação, quanto no fenótipo da placa de lise viral, não tem precedente na literatura dos poxvírus.

Baseado nos resultados apresentados neste trabalho, juntamente com os resultados obtidos anteriormente pelo nosso Grupo, nós sugerimos um modelo dos eventos proliferativos desencadeados durante a multiplicação do VV (Figura 23).

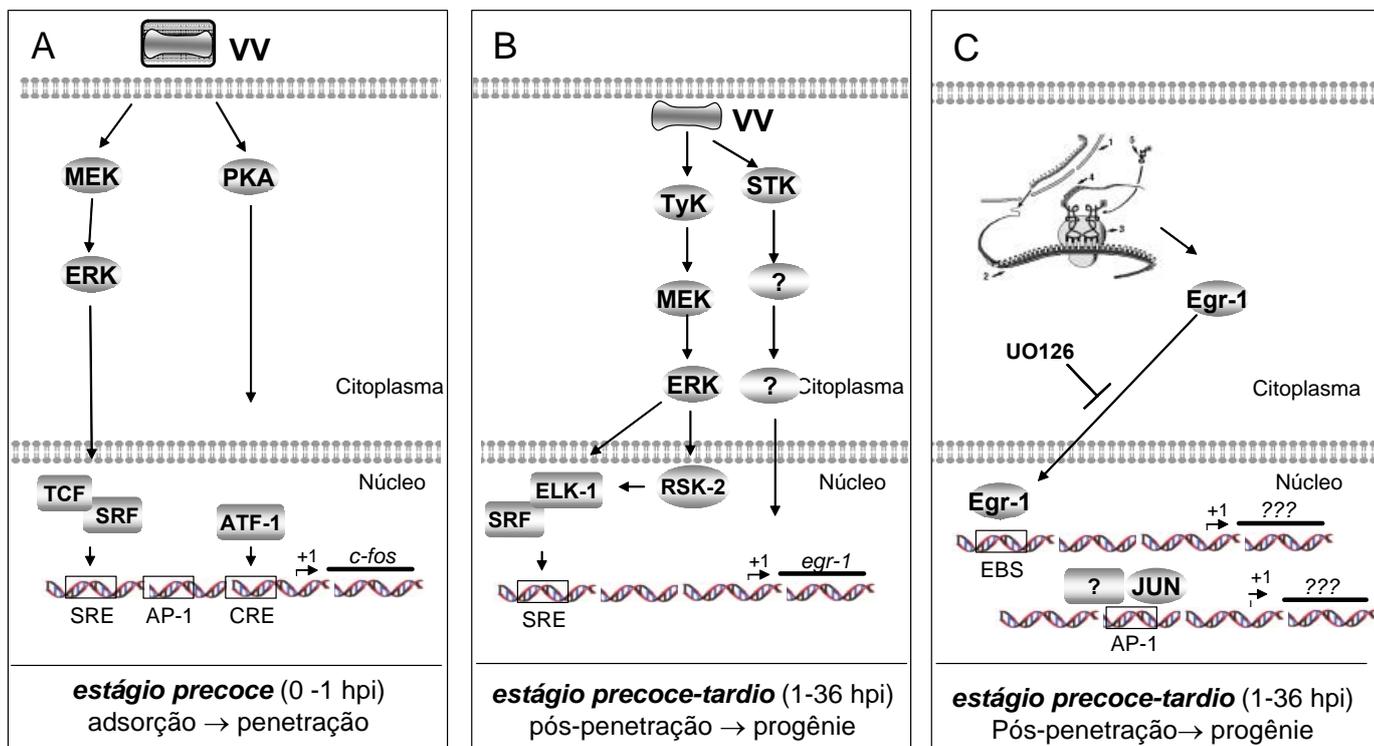


Figura 23 – Vias de sinalização disparadas pela infecção com o VV.

A) Eventos precoces durante a infecção pelo VV – até 1 hora. A ativação das quinases MEK/ERK e a expressão transitente de *c-fos* são verificadas em estágios muito precoces durante a interação vírus-célula e são independentes da proteína viral VGF. Um componente estrutural do vírus parece ser suficiente para a estimulação de *c-fos*, visto que a expressão de genes virais não é requerida. PKA também é recrutada para disparar os sinais precoces. **B) Eventos que ocorrem entre 1 hora pós infecção até estágios tardios da multiplicação do VV.** A ativação sustentada de ERK1/2 e RSK2 promove a fosforilação de Elk-1, o qual se liga, possivelmente em associação com SRF, ao elemento SRE localizado no promotor do gene *egr-1*, para promover a expressão de *egr-1*. Eventos localizados acima dessa via são também requeridos, os quais incluem fosforilação de tirosina e/ou fosforilação de serina/treonina quinases. **C) Eventos que ocorrem entre 1 hora pós infecção até estágios tardios da multiplicação do VV.** O mRNA de *egr-1* é traduzido e a proteína Egr-1 transloca-se ao núcleo, onde liga-se a seqüências regulatórias EBS e provavelmente atua como regulador transcricional, sendo dependente de MEK/ERK, juntamente com JUN; o qual se liga a sítios AP-1. A progênie viral resulta de um programa orquestrado, o qual é iniciado rapidamente após a interação do vírus com a célula e requer, pelo menos em parte, a ativação prolongada da via MEK/ERK/RSK2 e STKs.

8 – CONCLUSÃO

Demonstramos, após a realização deste trabalho, que a infecção pelo VV em células A31 promove o acúmulo prolongado do mRNA e da proteína Egr-1. Mostramos que o acúmulo do gene *egr-1* foi dependente da multiplicidade de infecção, das etapas iniciais do ciclo de multiplicação do VV e sua manutenção não é devida à estabilização da mensagem e sim resultado de contínua transcrição gênica. Podemos também demonstrar que a via sinalizadora MEK/ERK é essencial tanto para a acumulação do mRNA quanto da proteína Egr-1, durante praticamente todo o ciclo de multiplicação do vírus.

Verificamos também que a proteína Egr-1 induzida após a infecção pelo VV, transloca-se ao núcleo, onde, provavelmente, exerça função reguladora transcricional. Paralelamente, o aumento da atividade de ligação ao elemento AP-1, após a infecção pelo VV, sugere que também este fator de transcrição esteja promovendo a transcrição gênica. Em ambos os casos a via MEK/ERK é importante, sendo capaz de impedir a translocação de Egr-1 ao núcleo e também a atividade de ligação à AP-1.

Ratificamos, os resultados obtidos anteriormente pelo nosso Grupo, que demonstram o importante papel funcional da via sinalizadora MEK/ERK no ciclo de multiplicação do VV, pois a expressão de sua forma dominante negativa foi capaz de inibir significativamente a acumulação da proteína Egr-1, em resposta à infecção pelo vírus, bem como o diâmetro da placa de lise formada após a infecção, além de reduzir em aproximadamente uma unidade logarítima os títulos virais obtidos.

Finalmente, constatamos a relevância funcional do prolongado acúmulo da proteína Egr-1 na multiplicação do VV, uma vez que o seu silenciamento gênico, tanto restringiu a infecção viral diminuindo drasticamente o diâmetro das placas de lise observadas, quanto inibiu a produção viral em torno de uma unidade logarítmica.

Podemos concluir então, que a ativação da via de sinalização ativada pelo VV envolvendo MEK-ERK-RSK-2-Elk-1, além da ativação transcricional dos genes *c-fos* e *egr-1*, sendo este traduzido em sua proteína durante praticamente todo o ciclo de multiplicação do vírus, não são somente necessárias para a transmissão e manutenção de sinais de proliferação e/ou sobrevivência, mas também para uma multiplicação viral eficiente. Desta forma, a ativação coordenada de vias múltiplas de sinalização e a conseqüente expressão de genes diretamente relacionados com mitogênese após a

infecção pelo VV, durante diferentes estágios do seu ciclo de multiplicação, são determinantes para o sucesso na produção da prole viral.

9 – PERSPECTIVAS

Após a realização deste trabalho, acreditamos que contribuímos consideravelmente para o entendimento da íntima relação deste poxvírus com seu hospedeiro, principalmente no que se refere aos estímulos desencadeados durante a infecção. No entanto, outras questões foram levantadas e gostaríamos de desvendá-las futuramente, e dentre elas podemos citar:

- 1) Elucidar quais seriam os componentes envolvidos na transmissão de sinais via STKs em resposta à infecção pelo VV.
- 2) Pretendemos melhor esclarecer o papel de Egr-1 na multiplicação do VV, pontuando no ciclo de multiplicação deste vírus, através de microscopia eletrônica, em qual estágio do ciclo de multiplicação a proteína Egr-1 é determinante, bem como saber quais são seus genes alvos.
- 3) Verificar, através de vírus termo-sensíveis, se as proteínas quinases virais B1R e F10, contribuem para a acumulação prolongada de Egr-1 em resposta a infecção celular pelo VV.

10– REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHIM, R. Role of human papillomaviruses in the malignant transformation of keratinocytes. *Rom J Virol*, v. 48 p.71-83, 1997.

ALCAMI, A., & SMITH, G. L. Receptors for gamma-interferon encoded by poxviruses: implications for the unknown origin of vaccinia virus. *Trends Microbiol*, v. 4 n.8 p.321-326, 1996.

AMEYAR, M., WISNIEWSKA, M., & WEITZMAN, J. B.. A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie*, v. 85 n.8 p.747-752, 2003.

ANDRADE, A. A., SILVA, P. N., PEREIRA, A. C., DE SOUSA, L. P., FERREIRA, P. C., GAZZINELLI, R. T., KROON, E. G., ROPERT, C., & BONJARDIM, C. A.. The vaccinia virus-stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is required for virus multiplication. *Biochem J*, v. 381n.Pt 2 p.437-446, 2004.

ARENZ, C., & SCHEPERS, U. RNA interference: from an ancient mechanism to a state of the art therapeutic application? *Naturwissenschaften*, v. 90 n.8 p.345-359, 2003.

BABLANIAN, R., COPPOLA, G., SCRIBANI, S., & ESTEBAN, M. Inhibition of protein synthesis by vaccinia virus. III. The effect of ultraviolet-irradiated virus on the inhibition of protein synthesis. *Virology*, v. 112 n.1 p.1-12, 1981.

BEAUD, G. Vaccinia virus DNA replication: a short review. *Biochimie*, v. 77 n.10 p.74-779, 1995.

BECKMANN, A. M., & WILCE, P. A. Egr transcription factors in the nervous system. *Neurochem Int*, v. 31 n.4 p.477-510; discussion 517-476, 1997.

BENN, J., & SCHNEIDER, R. J. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 91 n.22p.10350-10354, 1994.

BLACK, A. C., LUO, J., CHUN, S., & TABIBZADEH, S. Constitutive expression of the HTLV-I pX and env regions in Jurkat T-cells induces differential activation of SRE, CRE and NF kappa B pathways. *Virus Genes*, v.15 n.2 p.105-117, 1997.

BLOMQUIST, M. C., HUNT, L. T., & BARKER, W. C. Vaccinia virus 19-kilodalton protein: relationship to several mammalian proteins, including two growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 81 n.23 p.7363-7367, 1984.

BOLDOGH, I., ABUBAKAR, S., & ALBRECHT, T. Activation of proto-oncogenes: an immediate early event in human cytomegalovirus infection. *Science*, v. 247 n.4942 p.561-564, 1990.

BONJARDIM, C. A. A mutant cell line partially responsive to both IFN-alpha and IFN-gamma. *Braz J Med Biol Res*, v. 30 n.1 p.41-50, 1997.

BOSSCHER, K., VANDEN BERGHE, W., & HAEGEMAN, G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev*, v. 24 n.4 p.488-522, 2003.

BOYA, P., PAULEAU, A. L., PONCET, D., GONZALEZ-POLO, R. A., ZAMZAMI, N., & KROEMER, G. Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death. *Biochim Biophys Acta*, v. 1659 n.2-3 p.178-189, 2004.

BROWN, J. P., TWARDZIK, D. R., MARQUARDT, H., & TODARO, G. J. Vaccinia virus encodes a polypeptide homologous to epidermal growth factor and transforming growth factor. *Nature*, v. 313 n.6002 p.491-492, 1985.

BROYLES, S. S. Vaccinia virus transcription. *J Gen Virol*, v. 84 pt.9 p.2293-2303, 2003.

BULLER, R. M., CHAKRABARTI, S., COOPER, J. A., TWARDZIK, D. R., & MOSS, B. Deletion of the vaccinia virus growth factor gene reduces virus virulence. *J Virol*, v. 62 n.3 p.866-874, 1988a.

BULLER, R. M., CHAKRABARTI, S., MOSS, B., & FREDRICKSON, T. Cell proliferative response to vaccinia virus is mediated by VGF. *Virology*, v. 164 n.1 p.182-192, 1988b.

BULLER, R. M., & PALUMBO, G. J. Poxvirus pathogenesis. *Microbiol Rev*, v.55 n.1 p.80-122, 1991.

CALOGERO, A., CUOMO, L., D'ONOFRIO, M., DE GRAZIA, U., SPINSANTI, P., MERCOLA, D., FAGGIONI, A., FRATI, L., ADAMSON, E. D., & RAGONA, G. Expression of Egr-1 correlates with the transformed phenotype and the type of viral latency in EBV genome positive lymphoid cell lines. *Oncogene*, v. 13 n.10 p.2105-2112, 1996.

CAMPOS, M. A. S., KROON, E. G. Critical period for irreversible block of vaccinia virus replication. *REV MIROBIOL.* v.24 p.104-110, 1993.

CAO, X. M., KOSKI, R. A., GASHLER, A., MCKIERNAN, M., MORRIS, C. F., GAFFNEY, R., HAY, R. V., & SUKHATME, V. P. Identification and characterization of the Egr-1 gene product, a DNA-binding zinc finger protein induced by differentiation and growth signals. *Mol Cell Biol*, v. 10 n.5 p.1931-1939, 1990.

CAPODICI, J., KARIKO, K., & WEISSMAN, D. Inhibition of HIV-1 infection by small interfering RNA-mediated RNA interference. *J Immunol*, v.169 n.9 p.5196-5201, 2002.

CARRASCO, L., & BRAVO, R. Specific proteins synthesized during the viral lytic cycle in vaccinia virus-infected HeLa cells: analysis by high-resolution, two-dimensional gel electrophoresis. *J Virol*, v. 58 p.69-577, 1986.

CARTER, G. C., HOLLINSHEAD, M., LAW, M., SMITH, G.L. Vaccinia virus intracellular mature virus and extracellular enveloped virus enter cells by fusion with the plasma membrane. *XV th International Poxvirus and Iridovirus Conference* Keble College, Oxford, England. September 3rd-8rd, p. 1, 2004.

CASTRO, A. P., CARVALHO, T. M., MOUSSATCHE, N., & DAMASO, C. R. Redistribution of cyclophilin A to viral factories during vaccinia virus infection and its incorporation into mature particles. *J Virol*, v. 77 n.16 p.9052-9068, 2003.

CAVALLARO, K. F., & ESPOSITO, J. J. Sequences of the raccoon poxvirus hemagglutinin protein. *Virology*, v. 190 n.1 p 434-439, 1992.

CHANG, F., STEELMAN, L. S., LEE, J. T., SHELTON, J. G., NAVOLANIC, P. M., BLALOCK, W. L., FRANKLIN, R. A., & MCCUBREY, J. A. Signal transduction

mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia*, v. 17 n.7 p.1263-1293, 2003.

CHANG, F., STEELMAN, L. S., & MCCUBREY, J. A. Raf-induced cell cycle progression in human TF-1 hematopoietic cells. *Cell Cycle*, v. 1 n.3 p.220-226, 2002.

CHANG, L., & KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, v. 410 n.6824 p.37-40, 2001.

CHAVRIER, P., JANSSEN-TIMMEN, U., MATTEI, M. G., ZERIAL, M., BRAVO, R., & CHARNAY, P. Structure, chromosome location, and expression of the mouse zinc finger gene Krox-20: multiple gene products and coregulation with the proto-oncogene c-fos. *Mol Cell Biol*, v. 9 p.787-797, 1989.

CHEN, S. Y., LU, J., SHIH, Y. C., & TSAI, C. H. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A regulates c-Jun protein through extracellular signal-regulated kinase. *J Virol*, v. 76 p.9556-9561, 2002.

CHENG, S., SCHMIDT-GRIMMINGER, D. C., MURANT, T., BROKER, T. R., & CHOW, L. T. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev*, v. 9 n.19 p.2335-2349, 1995.

CHRISTY, B., & NATHANS, D. Functional serum response elements upstream of the growth factor-inducible gene zif268. *Mol Cell Biol*, v. 9 p.4889-4895, 1989.

CHRISTY, B. A., LAU, L. F., & NATHANS, D. A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with "zinc finger" sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 85 p.7857-7861, 1988.

CHUNG, C. S., HUANG, C. Y., & CHANG, W. Vaccinia virus penetration requires cholesterol and results in specific viral envelope proteins associated with lipid rafts. *J Virol*, v. 79 n.3 p.1623-1634, 2005.

CHURCH, G. M., & GILBERT, W. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.8 n.17 p.1991-1995, 1984.

CLARKE, P., MEINTZER, S. M., WIDMANN, C., JOHNSON, G. L., & TYLER, K. L. Reovirus infection activates JNK and the JNK-dependent transcription factor c-Jun. *J Virol*, v. 75 n.23 p.11275-11283, 2001.

CONDIT, R. C., & NILES, E. G. Regulation of viral transcription elongation and termination during vaccinia virus infection. *Biochim Biophys Acta*, v.1577 n,2 p.325-336, 2002.

COOPER, G. M. In "*Oncogenes*": Pathways of Mitogenic Signals Transduction. 2nd ed. London, Jones and Bartlett Publishers, pp279-306, 1995.

DALES, S., & POGO, B. G. Biology of poxviruses. *Virol Monogr*, v.18 p.1-109, 1981.

DeFILIPPES, F. M. Restriction enzyme mapping of vaccinia virus DNA. *J Virol*, v.43 n.1 p.136-149, 1982.

DOUGLASS, N. J., RICHARDSON, M., & DUMBELL, K. R. Evidence for recent genetic variation in monkeypox viruses. *J Gen Virol*, v.75 pt.6 p.1303-1309, 1994.

DRON, M., HAMEAU, L., BENBOUDJEMA, L., GUYMARHO, J., CAJEAN-FEROLDI, C., RIZZA, P., GODARD, C., JASMIN, C., TOVEY, M. G., & LANG, M. C. Cloning of a long HIV-1 readthrough transcript and detection of an increased level of early growth response protein-1 (Egr-1) mRNA in chronically infected U937 cells. *Arch Virol*, v.144 n.1 p.19-28, 1999.

DUAN, R., XIE, W., LI, X., MCDUGAL, A., & SAFE, S. Estrogen regulation of c-fos gene expression through phosphatidylinositol-3-kinase-dependent activation of serum response factor in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 294 n.2 p.384-394, 2002.

DUBOCHET, J., ADRIAN, M., RICHTER, K., GARCES, J., & WITTEK, R. Structure of intracellular mature vaccinia virus observed by cryoelectron microscopy. *J Virol*, v.68 n.3 p.1935-1941, 1994.

DYKXHOORN, D. M., NOVINA, C. D., & SHARP, P. A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.4 n.6 p.457-467, 2003.

ELBASHIR, S. M., HARBORTH, J., LENDECKEL, W., YALCIN, A., WEBER, K., & TUSCHL, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, v.411 n.6836 p.494-498, 2001.

ELBASHIR, S. M., HARBORTH, J., WEBER, K., & TUSCHL, T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, v. 26 n.2 p.199-213, 2002.

ERHARDT, A., HASSAN, M., HEINTGES, T., & HAUSSINGER, D. Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off cell line. *Virology*, v.292 n.2 p.272-284, 2002.

ESPOSITO, J. J., & KNIGHT, J. C. Orthopoxvirus DNA: a comparison of restriction profiles and maps. *Virology*, v.143 n.1 p.230-251, 1985.

FENG, W. H., HONG, G., DELECLUSE, H. J., & KENNEY, S. C. Lytic induction therapy for Epstein-Barr virus-positive B-cell lymphomas. *J Virol*, v. 78 n.4 p.1893-1902, 2004.

FENNER, F. Poxviruses in *Clinical Virology*. RICHMAN, D. D.; WHITLEY, R. & HAYDEN, F. G. eds. American Society for Microbiology Press. Washington, DC – USA, p. 359-374, 2002.

FENNER, F., WITTEK, R., DUMBELL, K. R. The orthopoxviruses. *Academic Press Inc.* San Diego, California, p.29-84, 1989.

FENTON, M., & SINCLAIR, A. J. Divergent requirements for the MAPK(ERK) signal transduction pathway during initial virus infection of quiescent primary B cells and disruption of Epstein-Barr virus latency by phorbol esters. *J Virol*, v.73 n.10 p.8913-8916, 1999.

FLEMINGTON, E., & SPECK, S. H. Epstein-Barr virus BZLF1 trans activator induces the promoter of a cellular cognate gene, c-fos. *J Virol*, v.64 n.9 p.4549-4552, 1990.

FONSECA, F., & MOSS, B. Poxvirus DNA topoisomerase knockout mutant exhibits decreased infectivity associated with reduced early transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100 n.20 p.11291-11296, 2003.

FONSECA, F. G., WOLFFE, E. J., WEISBERG, A., & MOSS, B. Characterization of the vaccinia virus H3L envelope protein: topology and posttranslational membrane insertion via the C-terminal hydrophobic tail. *J Virol*, v.74 n.16 p.7508-7517, 2000.

FU, M., ZHU, X., ZHANG, J., LIANG, J., LIN, Y., ZHAO, L., EHRENGRUBER, M. U., & CHEN, Y. E. Egr-1 target genes in human endothelial cells identified by microarray analysis. *Gene*, v.315 p.33-41, 2003.

FUJII, M., CHUHJO, T., MINAMINO, T., MASAOKI, N., MIYAMOTO, K., & SEIKI, M. Identification of the Tax interaction region of serum response factor that mediates the aberrant induction of immediate early genes through CArG boxes by HTLV-I Tax. *Oncogene*, v.11 n.1 p.7-14, 1995.

FUJITA, M., & SHIKU, H. Differences in sensitivity to induction of apoptosis among rat fibroblast cells transformed by HTLV-I tax gene or cellular nuclear oncogenes. *Oncogene*, v.11 n.1 p.15-20, 1995.

GANJU, R. K., MUNSHI, N., NAIR, B. C., LIU, Z. Y., GILL, P., & GROOPMAN, J. E. Human immunodeficiency virus tat modulates the Flk-1/KDR receptor, mitogen-activated protein kinases, and components of focal adhesion in Kaposi's sarcoma cells. *J Virol*, v.72 n.7 p.6131-6137, 1998.

GARON, C. F., BARBOSA, E., & MOSS, B. Visualization of an inverted terminal repetition in vaccinia virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.75 n.10 p.4863-4867, 1978.

GASHLER, A. L., SWAMINATHAN, S., & SUKHATME, V. P. A novel repression module, an extensive activation domain, and a bipartite nuclear localization signal defined in the immediate-early transcription factor Egr-1. *Mol Cell Biol*, v. 13 n.8 p.4556-4571, 1993.

GE, Q., MCMANUS, M. T., NGUYEN, T., SHEN, C. H., SHARP, P. A., EISEN, H. N., & CHEN, J. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100 n.5 p.2718-2723, 2003.

GITLIN, L., KARELSKY, S., & ANDINO, R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*, v.418 n.6896 p.430-434, 2002.

GOEBEL, S. J., JOHNSON, G. P., PERKUS, M. E., DAVIS, S. W., WINSLOW, J. P., & PAOLETTI, E. The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology*, v.179 n.1 p.247-266, 1990.

GRIFFITHS, G., ROOS, N., SCHLEICH, S., & LOCKER, J. K. Structure and assembly of intracellular mature vaccinia virus: thin-section analyses. *J Virol*, v.75 n.22 p.11056-11070, 2001.

HAGEMANN, C., & BLANK, J. L. The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cell Signal*, v.13 n.12 p.863-875, 2001.

HAZZALIN, C. A., & MAHADEVAN, L. C. MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.3 n.1 p.30-40, 2002.

HENDERSON, D. A., INGLESBY, T. V., BARTLETT, J. G., ASCHER, M. S., EITZEN, E., JAHRLING, P. B., HAUER, J., LAYTON, M., MCDADE, J., OSTERHOLM, M. T., O'TOOLE, T., PARKER, G., PERL, T., RUSSELL, P. K., & TONAT, K. Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *Jama*, v.281 n.22 p.2127-2137, 1999.

HILL, C. S., & TREISMAN, R. Differential activation of c-fos promoter elements by serum, lysophosphatidic acid, G proteins and polypeptide growth factors. *Embo J*, v.14 n.20 p.5037-5047, 1995.

HINDLEY, A., & KOLCH, W. Extracellular signal regulated kinase (ERK)/mitogen activated protein kinase (MAPK)-independent functions of Raf kinases. *J Cell Sci*, v. 115 n.Pt 8 p.1575-1581, 2002.

HOLLINSHEAD, M., RODGER, G., VAN EIJL, H., LAW, M., HOLLINSHEAD, R., VAUX, D. J., & SMITH, G. L. Vaccinia virus utilizes microtubules for movement to the cell surface. *J Cell Biol*, v.154 n.2 p.389-402, 2001.

HOLLINSHEAD, M., VANDERPLASSCHEN, A., SMITH, G. L., & VAUX, D. J. Vaccinia virus intracellular mature virions contain only one lipid membrane. *J Virol*, v. 73 n.2 p.1503-1517, 1999.

HORGAN, A. M., & STORK, P. J. Examining the mechanism of Erk nuclear translocation using green fluorescent protein. *Exp Cell Res*, v. 285 n.2 p.208-220, 2003.

HUGIN, A. W., & HAUSER, C. The epidermal growth factor receptor is not a receptor for vaccinia virus. *J Virol*, v.68 n.12 p.8409-8412, 1994.

ICHIHASHI, Y. Extracellular enveloped vaccinia virus escapes neutralization. *Virology*, v.217 n.2 p.478-485, 1996.

INGLESBY, T. V., HENDERSON, D. A., BARTLETT, J. G., ASCHER, M. S., EITZEN, E., FRIEDLANDER, A. M., HAUER, J., MCDADE, J., OSTERHOLM, M. T., O'TOOLE, T., PARKER, G., PERL, T. M., RUSSELL, P. K., & TONAT, K. Anthrax as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *Jama*, v.281 n.18 1735-1745, 1999.

JENSEN, O. N., HOUTHAEVE, T., SHEVCHENKO, A., CUDMORE, S., ASHFORD, T., MANN, M., GRIFFITHS, G., & KRIJNSE LOCKER, J. Identification of the major membrane and core proteins of vaccinia virus by two-dimensional electrophoresis. *J Virol*, v.70 n.11 p.7485-7497, 1996.

JOHNSON, R. A., HUONG, S. M., & HUANG, E. S. Activation of the mitogen-activated protein kinase p38 by human cytomegalovirus infection through two distinct pathways: a novel mechanism for activation of p38. *J Virol*, v.74 n.3 p.1158-1167, 2000.

JOHNSTON, J. B., BARRETT, J. W., CHANG, W., CHUNG, C. S., ZENG, W., MASTERS, J., MANN, M., WANG, F., CAO, J., & MCFADDEN, G. Role of the

serine-threonine kinase PAK-1 in myxoma virus replication. *J Virol*, v. 77 n.10 p.5877-5888, 2003.

JOKLIK, W. K. The purification fo four strains of poxvirus. *Virology*, v.18 p.9-18, 1962.

JOKLIK, W. K. The poxviruses. *Bacteriol Rev*, v.30 n.1 p.33-66, 1966.

KAPADIA, S. B., BRIDEAU-ANDERSEN, A., & CHISARI, F. V. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100 n.4 p.2014-2018, 2003.

KASTNER, A., ESPANEL, X., & BRUN, G. Transient accumulation of retinoblastoma/E2F-1 protein complexes correlates with the onset of neuronal differentiation in the developing quail neural retina. *Cell Growth Differ*, v.9 n.10 p.857-867, 1998.

KATZ, E., & MOSS, B. Formation of a vaccinia virus structural polypeptide from a higher molecular weight precursor: inhibition by rifampicin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.66 n.3 p.677-684, 1970.

KELLY, K., COCHRAN, B. H., STILES, C. D., & LEDER, P. Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell*, v.35 n.3 pt.2 p.603-610, 1983.

KIM, S. M., PARK, J. H., CHUNG, S. K., KIM, J. Y., HWANG, H. Y., CHUNG, K. C., JO, I., PARK, S. I., & NAM, J. H. Coxsackievirus B3 infection induces cyr61 activation via JNK to mediate cell death. *J Virol*, v. 78 n.24 p.13479-13488, 2004.

KIM, V. N. RNA interference in functional genomics and medicine. *J Korean Med Sci*, v.18 n.3 p.309-318, 2003.

KUJIME, K., HASHIMOTO, S., GON, Y., SHIMIZU, K., & HORIE, T. p38 mitogen-activated protein kinase and c-jun-NH2-terminal kinase regulate RANTES production by influenza virus-infected human bronchial epithelial cells. *J Immunol*, v.164 n.6 p.3222-3228, 2000.

KYRIAKIS, J. M., & AVRUCH, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, v.81 n.2 p.807-869, 2001.

LEE, J. T., JR., & MCCUBREY, J. A. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia*, v. 16 n.4 p.486-507, 2002.

LIM, C. P., JAIN, N., & CAO, X. Stress-induced immediate-early gene, egr-1, involves activation of p38/JNK1. *Oncogene*, v.16 n.22 p.2915-2926, 1998.

LINGEL, A., & IZAURRALDE, E. RNAi: finding the elusive endonuclease. *Rna*, v. 10 n.11 p.1675-1679, 2004.

LOCHMULLER, H., JOHNS, T., & SHOUBRIDGE, E. A. Expression of the E6 and E7 genes of human papillomavirus (HPV16) extends the life span of human myoblasts. *Exp Cell Res*, v.248 n.1 p.186-193, 1999.

LUO, H., YANAGAWA, B., ZHANG, J., LUO, Z., ZHANG, M., ESFANDIAREI, M., CARTHY, C., WILSON, J. E., YANG, D., & MCMANUS, B. M. Coxsackievirus B3 replication is reduced by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. *J Virol*, v.76 n.7 p.3365-3373, 2002.

MAGALHAES, J. C., ANDRADE, A. A., SILVA, P. N., SOUSA, L. P., ROPERT, C., FERREIRA, P. C., KROON, E. G., GAZZINELLI, R. T., & BONJARDIM, C. A. A mitogenic signal triggered at an early stage of vaccinia virus infection: implication of MEK/ERK and protein kinase A in virus multiplication. *J Biol Chem*, v.276 n.42 p.38353-38360, 2001.

MALKIN, A. J., MCPHERSON, A., & GERSHON, P. D. Structure of intracellular mature vaccinia virus visualized by in situ atomic force microscopy. *J Virol*, v. 77 n.11 p.6332-6340, 2003.

MARTINEZ, J., & TUSCHL, T. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev*, v. 18 n.9 p.975-980, 2004.

MASSUNG, R. F., JAYARAMA, V., & MOYER, R. W. DNA sequence analysis of conserved and unique regions of swinepox virus: identification of genetic elements supporting phenotypic observations including a novel G protein-coupled receptor homologue. *Virology*, v.197 n.2 p.511-528, 1993.

McINTOSH, A. A., & SMITH, G. L. Vaccinia virus glycoprotein A34R is required for infectivity of extracellular enveloped virus. *J Virol*, v.70 n.1 p.272-281, 1996.

McMAHON, S. B., & MONROE, J. G. A ternary complex factor-dependent mechanism mediates induction of egr-1 through selective serum response elements following antigen receptor cross-linking in B lymphocytes. *Mol Cell Biol*, v.15 n.2 p.1086-1093, 1995.

MEYER, R. G., KUPPER, J. H., KANDOLF, R., & RODEMANN, H. P. Early growth response-1 gene (Egr-1) promoter induction by ionizing radiation in U87 malignant glioma cells in vitro. *Eur J Biochem*, v.269 n.1 p.337-346, 2002.

MILBRANDT, J. A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science*, v.238 n.4828 p.797-799, 1987.

MONICK, M., STABER, J., THOMAS, K., & HUNNINGHAKE, G. Respiratory syncytial virus infection results in activation of multiple protein kinase C isoforms leading to activation of mitogen-activated protein kinase. *J Immunol*, v.166 n.4 p.2681-2687, 2001.

MORA, G. R., OLIVIER, K. R., CHEVILLE, J. C., MITCHELL, R. F., JR., LINGLE, W. L., & TINDALL, D. J. The cytoskeleton differentially localizes the early growth response gene-1 protein in cancer and benign cells of the prostate. *Mol Cancer Res*, v. 2 n.2 p.115-128, 2004.

MOSS, B. Regulation of vaccinia virus transcription. *Annu Rev Biochem*, v.59 p.661-688, 1990.

MOSS, B. Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development. *Science*, v.252 n.5013 p.1662-1667, 1991.

MOSS, B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.93 n.21 p.11341-11348, 1996.

MOSS, B. *Poxviridae: the viruses and their replication*. In *Fields' Virology*. FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. & GRIFFIN, D. E. eds. 4th. v.2. Lippincot-Raven Press Publishers. Philadelphia, PA, p. 2849-2883, 2001.

MULLER, H. K., WITTEK, R., SCHAFFNER, W., SCHUMPERLI, D., MENNA, A., & WYLER, R. Comparison of five poxvirus genomes by analysis with restriction endonucleases HindIII, BamI and EcoRI. *J Gen Virol*, v.38 n.1 p.135-147, 1978.

MULLER, R., BRAVO, R., BURCKHARDT, J., & CURRAN, T. Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature*, v.312 n.5996 p.716-720, 1984.

NATOLI, G., AVANTAGGIATI, M. L., CHIRILLO, P., DE MARZIO, E., COLLEPARDO, D., FALCO, M., BALSANO, C., & LEVRERO, M. Modulation of intracellular signal transduction pathways by the hepatitis B virus transactivator pX. *J Hepatol*, v.22 n.1 Suppl p.14-20, 1995.

NGUYEN, M., BRANTON, P. E., ROY, S., NICHOLSON, D. W., ALNEMRI, E. S., YEH, W. C., MAK, T. W., & SHORE, G. C. E1A-induced processing of procaspase-8 can occur independently of FADD and is inhibited by Bcl-2. *J Biol Chem*, v.273 n.50 p.33099-33102, 1998.

OLIVEIRA, J. G., KROON, E. G., FERREIRA, P. C., & BONJARDIM, C. A. The low proliferation rates of human amniotic cells are neither associated to deregulated proto-oncogenes' expression nor to the effect of IFN alpha 2. *Placenta*, v.18 n.2-3 p.163-168, 1997.

OPAVSKY, M. A., MARTINO, T., RABINOVITCH, M., PENNINGER, J., RICHARDSON, C., PETRIC, M., TRINIDAD, C., BUTCHER, L., CHAN, J., & LIU, P. P. Enhanced ERK-1/2 activation in mice susceptible to coxsackievirus-induced myocarditis. *J Clin Invest*, v.109 n.12 p.1561-1569, 2002.

ORTIZ, M. A., & PAEZ, E. Identification of viral membrane proteins required for cell fusion and viral dissemination that are modified during vaccinia virus persistence. *Virology*, v.198 n.1 p.155-168, 1994.

ORY, S., & MORRISON, D. K. Signal transduction: implications for Ras-dependent ERK signaling. *Curr Biol*, v. 14 n.7 p.R277-278, 2004.

PARK, W. S., MIYANO-KUROSAKI, N., HAYAFUNE, M., NAKAJIMA, E., MATSUZAKI, T., SHIMADA, F., & TAKAKU, H. Prevention of HIV-1 infection in human peripheral blood mononuclear cells by specific RNA interference. *Nucleic Acids Res*, v. 30 n.22 p.4830-4835, 2002.

PLESCHKA, S., WOLFF, T., EHRHARDT, C., HOBOM, G., PLANZ, O., RAPP, U. R., & LUDWIG, S. Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol*, v. 3 n.3 p.301-305, 2001.

POPIK, W., & PITHA, P. M. Early activation of mitogen-activated protein kinase kinase, extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and c-Jun N-terminal kinase in response to binding of simian immunodeficiency virus to Jurkat T cells expressing CCR5 receptor. *Virology*, v. 252 n.1 p.210-217, 1998.

POUYSSSEGUR, J., VOLMAT, V., & LENORMAND, P. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol*, v. 64 n.5-6 p.755-763, 2002.

QUEIMADO, L., LOPES, C., DU, F., MARTINS, C., FONSECA, I., BOWCOCK, A. M., SOARES, J., & LOVETT, M. In vitro transformation of cell lines from human salivary gland tumors. *Int J Cancer*, v.81 n.5 p.793-798, 1999.

RAND, T. A., GINALSKI, K., GRISHIN, N. V., & WANG, X. Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101 n.40 p.14385-14389, 2004.

REISNER, A. H. Similarity between the vaccinia virus 19K early protein and epidermal growth factor. *Nature*, v.313 n.6005 p.801-803, 1985.

RISCO, C., RODRIGUEZ, J. R., LOPEZ-IGLESIAS, C., CARRASCOSA, J. L., ESTEBAN, M., & RODRIGUEZ, D. Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment membranes and vimentin filaments participate in vaccinia virus assembly. *J Virol*, v. 76 n.4 p.1839-1855, 2002.

ROOS, N., CYRKLAFF, M., CUDMORE, S., BLASCO, R., KRIJNSE-LOCKER, J., & GRIFFITHS, G. A novel immunogold cryoelectron microscopic approach to investigate the structure of the intracellular and extracellular forms of vaccinia virus. *Embo J*, v.15 n.10 p.2343-2355, 1996.

RUPPRECHT, H. D., SUKHATME, V. P., RUPPRECHT, A. P., STERZEL, R. B., & COLEMAN, D. L. Serum response elements mediate protein kinase C dependent transcriptional induction of early growth response gene-1 by arginine vasopressin in rat mesangial cells. *J Cell Physiol*, v.159 n.2 p.311-323, 1994.

RUSSO, M. W., SEVETSON, B. R., & MILBRANDT, J. Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.92 n.15 p.6873-6877, 1995.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATS, T. Molecular cloning A laboratory manual 2nd Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, books 1 and 2.

SALEH, M. C., VAN RIJ, R. P., & ANDINO, R. RNA silencing in viral infections: insights from poliovirus. *Virus Res*, v. 102 n.1 p.11-17, 2004.

SCHMELZ, M., SODEIK, B., ERICSSON, M., WOLFFE, E. J., SHIDA, H., HILLER, G., & GRIFFITHS, G. Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. *J Virol*, v.68 n.1 p.130-147, 1994.

SCHWARZ, D. S., TOMARI, Y., & ZAMORE, P. D. The RNA-induced silencing complex is a Mg²⁺-dependent endonuclease. *Curr Biol*, v. 14 n.9 p.787-791, 2004.

SILVERMAN, E. S., & COLLINS, T. Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology. *Am J Pathol*, v.154 n.3 p.665-670, 1999.

SMITH, C. C., NELSON, J., AURELIAN, L., GOBER, M., & GOSWAMI, B. B. Ras-GAP binding and phosphorylation by herpes simplex virus type 2 RR1 PK (ICP10) and

activation of the Ras/MEK/MAPK mitogenic pathway are required for timely onset of virus growth. *J Virol*, v. 74 n.22 p.10417-10429, 2000.

SMITH, G. L., & LAW, M. The exit of vaccinia virus from infected cells. *Virus Res*, v. 106 n.2 p.189-197, 2004.

SMITH, G. L., MURPHY, B. J., & LAW, M. Vaccinia virus motility. *Annu Rev Microbiol*, v. 57 p.323-342, 2003.

SMITH, G. L., SYMONS, J. A., KHANNA, A., VANDERPLASSCHEN, A., & ALCAMI, A. Vaccinia virus immune evasion. *Immunol Rev*, v.159 p.137-154, 1997.

SMITH, G. L., VANDERPLASSCHEN, A., & LAW, M. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J Gen Virol*, v. 83 n.Pt 12 p.2915-2931, 2002.

SODEIK, B., DOMS, R. W., ERICSSON, M., HILLER, G., MACHAMER, C. E., VAN 'T HOF, W., VAN MEER, G., MOSS, B., & GRIFFITHS, G. Assembly of vaccinia virus: role of the intermediate compartment between the endoplasmic reticulum and the Golgi stacks. *J Cell Biol*, v.121 n.3 p.521-541, 1993.

SODEIK, B., & KRIJNSE-LOCKER, J. Assembly of vaccinia virus revisited: de novo membrane synthesis or acquisition from the host? *Trends Microbiol*, v.10 n.1 p.15-24, 2002.

SONG, E., LEE, S. K., WANG, J., INCE, N., OUYANG, N., MIN, J., CHEN, J., SHANKAR, P., & LIEBERMAN, J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med*, v. 9 n.3 p.347-351, 2003.

STEVENSON, M. Dissecting HIV-1 through RNA interference. *Nat Rev Immunol*, v.3 n.11 p.851-858, 2003.

SU, Z. Z., YEMUL, S., STEIN, C. A., & FISHER, P. B. c-fos is a positive regulator of carcinogen enhancement of adenovirus transformation. *Oncogene*, v.10 n.10 p.2037-2049, 1995.

SUKHATME, V. P. Early transcriptional events in cell growth: the Egr family. *J Am Soc Nephrol*, v.1 n.6 p.859-866, 1990.

SUKHATME, V. P., CAO, X. M., CHANG, L. C., TSAI-MORRIS, C. H., STAMENKOVICH, D., FERREIRA, P. C., COHEN, D. R., EDWARDS, S. A., SHOWS, T. B., CURRAN, T., & ET AL. A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell*, v.53 n.1 p.37-43, 1988.

SVAREN, J., SEVETSON, B. R., APEL, E. D., ZIMONJIC, D. B., POPESCU, N. C., & MILBRANDT, J. NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol Cell Biol*, v.16 n.7 p.3545-3553, 1996.

SZAJNER, P., JAFFE, H., WEISBERG, A. S., & MOSS, B. Vaccinia virus G7L protein Interacts with the A30L protein and is required for association of viral membranes with dense viroplasm to form immature virions. *J Virol*, v. 77 n.6 p.3418-3429, 2003.

SZAJNER, P., WEISBERG, A. S., & MOSS, B. Evidence for an essential catalytic role of the F10 protein kinase in vaccinia virus morphogenesis. *J Virol*, v. 78 n.1 p.257-265, 2004.

TANOUE, T., & NISHIDA, E. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal*, v. 15 n.5 p.455-462, 2003.

TATAROWICZ, W. A., MARTIN, C. E., PEKOSZ, A. S., MADDEN, S. L., RAUSCHER, F. J., 3RD, CHIANG, S. Y., BEERMAN, T. A., & FRASER, N. W. Repression of the HSV-1 latency-associated transcript (LAT) promoter by the early growth response (EGR) proteins: involvement of a binding site immediately downstream of the TATA box. *J Neurovirol*, v.3 n.3 p.212-224, 1997.

THIEL, G., & CIBELLI, G. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol*, v.193 n.3 p.287-292, 2002.

THIEL, G., KAUFMANN, K., MAGIN, A., LIETZ, M., BACH, K., & CRAMER, M. The human transcriptional repressor protein NAB1: expression and biological activity. *Biochim Biophys Acta*, v.1493 n.3 p.289-301, 2000.

TSAI-MORRIS, C. H., CAO, X. M., & SUKHATME, V. P. 5' flanking sequence and genomic structure of Egr-1, a murine mitogen inducible zinc finger encoding gene. *Nucleic Acids Res*, v.16 n.18 p.8835-8846, 1988.

UNGER, B., & TRAKTMAN, P. Vaccinia virus morphogenesis: a13 phosphoprotein is required for assembly of mature virions. *J Virol*, v. 78 n.16 p.8885-8901, 2004.

VANDERPLASSCHEN, A., HOLLINSHEAD, M., & SMITH, G. L. Antibodies against vaccinia virus do not neutralize extracellular enveloped virus but prevent virus release from infected cells and comet formation. *J Gen Virol*, v.78 pt. 8 p.2041-2048, 1997.

VANDERPLASSCHEN, A., & SMITH, G. L. A novel virus binding assay using confocal microscopy: demonstration that the intracellular and extracellular vaccinia virions bind to different cellular receptors. *J Virol*, v.71 n.5 p.4032-4041, 1997.

VANSLYKE, J. K., FRANKE, C. A., & HRUBY, D. E. Proteolytic maturation of vaccinia virus core proteins: identification of a conserved motif at the N termini of the 4b and 25K virion proteins. *J Gen Virol*, v.72 pt2 p.411-416, 1991a.

VANSLYKE, J. K., & HRUBY, D. E. Immunolocalization of vaccinia virus structural proteins during virion formation. *Virology*, v.198 n.2 p.624-635, 1994.

VANSLYKE, J. K., WHITEHEAD, S. S., WILSON, E. M., & HRUBY, D. E. The multistep proteolytic maturation pathway utilized by vaccinia virus P4a protein: a degenerate conserved cleavage motif within core proteins. *Virology*, v. 183 n.2 p.467-478, 1991b.

VENKATESAN, S., GERSHOWITZ, A., & MOSS, B. Complete nucleotide sequences of two adjacent early vaccinia virus genes located within the inverted terminal repetition. *J Virol*, v.44 n.2 p.637-646. 1982.

WADHWA, R., KAUL, S. C., MIYAGISHI, M., & TAIRA, K. Know-how of RNA interference and its applications in research and therapy. *Mutat Res*, v. 567 n.1 p.71-84, 2004.

WAGNER, A., DOERKS, A., ABOUD, M., ALONSO, A., TOKINO, T., FLUGEL, R. M., & LOCHELT, M. Induction of cellular genes is mediated by the Bell transactivator in foamy virus-infected human cells. *J Virol*, v. 74 n.10 p.4441-4447, 2000.

WANG, F., MA, Y., BARRETT, J. W., GAO, X., LOH, J., BARTON, E., VIRGIN, H. W., & MCFADDEN, G. Disruption of Erk-dependent type I interferon induction breaks the myxoma virus species barrier. *Nat Immunol*, v. 5 n.12 p.1266-1274, 2004.

WARD, B. M., & MOSS, B. Vaccinia virus intracellular movement is associated with microtubules and independent of actin tails. *J Virol*, v.75 n.23 p.11651-11663, 2001.

WIDMANN, C., GIBSON, S., JARPE, M. B., & JOHNSON, G. L. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, v. 79 n.1 p.143-180, 1999.

WILKINSON, M. G., & MILLAR, J. B. Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *Faseb J*, v.14 n.14 p.2147-2157, 2000.

WOLFFE, E. J., KATZ, E., WEISBERG, A., & MOSS, B. The A34R glycoprotein gene is required for induction of specialized actin-containing microvilli and efficient cell-to-cell transmission of vaccinia virus. *J Virol*, v.71 n.5 p.3904-3915, 1997.

YANG, S. H., SHARROCKS, A. D., & WHITMARSH, A. J. Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene*, v. 320 p.3-21, 2003.

YANG, Y., DONG, B., MITTELSTADT, P. R., XIAO, H., & ASHWELL, J. D. HIV Tat binds Egr proteins and enhances Egr-dependent transactivation of the Fas ligand promoter. *J Biol Chem*, v.277 n.22 p.19482-19487, 2002.

YOO, Y. D., CHIOU, C. J., CHOI, K. S., YI, Y., MICHELSON, S., KIM, S., HAYWARD, G. S., & KIM, S. J. The IE2 regulatory protein of human cytomegalovirus induces expression of the human transforming growth factor beta1 gene through an Egr-1 binding site. *J Virol*, v.70 n.10 p.7062-7070, 1996a.

YOO, Y. D., UEDA, H., PARK, K., FLANDERS, K. C., LEE, Y. I., JAY, G., & KIM, S. J. Regulation of transforming growth factor-beta 1 expression by the hepatitis B virus

(HBV) X transactivator. Role in HBV pathogenesis. *J Clin Invest*, v.97 n.2 p.388-395, 1996b.

YOSHINOUCI, M., YAMADA, T., KIZAKI, M., FEN, J., KOSEKI, T., IKEDA, Y., NISHIHARA, T., & YAMATO, K. In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by E6 siRNA. *Mol Ther*, v. 8 n.5 p.762-768, 2003.

YU, J. Y., DERUITER, S. L., & TURNER, D. L. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99 n.9 p.6047-6052, 2002.

ZENG, Y., WAGNER, E. J., & CULLEN, B. R. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell*, v. 9 n.6 p.1327-1333, 2002.

ZHANG, Y., AHN, B. Y., & MOSS, B. Targeting of a multicomponent transcription apparatus into assembling vaccinia virus particles requires RAP94, an RNA polymerase-associated protein. *J Virol*, v.68 n.3 p.1360-1370, 1994.

ZHOU, Y. F., YU, Z. X., WANISHSAWAD, C., SHOU, M., & EPSTEIN, S. E. The immediate early gene products of human cytomegalovirus increase vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and expression of PDGF beta-receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, v.256 n.3 p.608-613, 1999.