

PATRÍCIA NOGUEIRA DA GAMA SILVA

**A EXPRESSÃO DO GENE DE
RESPOSTA PRECOCE AO
CRESCIMENTO (EGR-1) EM
RESPOSTA À INFECÇÃO
PELO VÍRUS VACCÍNIA.**

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

BELO HORIZONTE /2000

PATRÍCIA NOGUEIRA DA GAMA SILVA

**A EXPRESSÃO DO GENE DE
RESPOSTA PRECOCE AO
CRESCIMENTO (EGR-1)
APÓS INFECÇÃO PELO
VÍRUS VACCINIA.**

**TRABALHO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE VÍRUS
DO DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UFMG.**

**ORIENTADOR: PROFESSOR CLÁUDIO ANTÔNIO
BONJARDIM.**

BELO HORIZONTE /2000

"Valeu a pena? Tudo vale a pena se
a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
tem que passar além da dor.
Deus, ao mar o perigo e o abysmo
deu mas nele é que espalhou o céu"
Fernando Pessoa

Vocês que não se contentaram em apenas me dar a vida, que me ensinaram a vivê-la com dignidade, que tantas vezes me incentivaram, que compartilharam dos meus sonhos e que sempre lutaram ao meu lado. Vocês, de que tanto me orgulho, merecem muito mais que um simples agradecimento, mas todas as palavras ficam pequenas diante da grandeza do seu amor.

Muito obrigada, Pai.
Muito obrigada, Mãe.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Cláudio Antônio Bonjardim, por ter sido um mestre exemplar e um amigo, pelo incentivo e apoio que contribuíram de forma preciosa em minha formação acadêmica, científica e pessoal.

Aos professores Erna Geessien Kroon, Paulo César Peregrino Ferreira e Edel Figueiredo Barbosa, pela amizade, disponibilidade, colaborações, apoio e ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório de Vírus, Jaqueline, Alex, Flávio, Maurício, João Marques, Waleska, Giliane, Alzira, Daniela Miranda, Luís Filipe, Lina, Cíntia, Landa, Maria Amélia, Rodrigo, Luiz Gonzaga, Valéria, Marina, Fabrício, Monique, Olga, Leonéide, Andréia, Daniela Lemos, Thaís, Marcelo, João Rodrigues, Alexandre, Renatinha, Marco, Angela, Raquel, Ilda e Cida, pelo convívio, e todos os “Socorros”.

Aos colegas do Laboratório de Biologia de Microrganismos Intracelulares, Gustavo, Roberto, Luciana, Cláudia, Érica, Jaqueline, Haleta, Carolina, Ana Helena pelo convívio.

Ao José Carlos e Anderson, pela presença, apoio, ensinamentos e amizade que foram de fundamental importância para a execução deste trabalho.

À Katinha e Cris, pela preciosa amizade, apoio, presença e ajuda para que este desafio fosse vencido.

À Bernadete que de sua existência resta conosco o exemplo, a saudade imensa, o eterno agradecimento além do pesar por não poder te abraçar agora e compartilhar com você a alegria da tarefa cumprida.

À Maria Cristina Almeida Prado pela atenção dispensada junto à Secretaria da Pós-graduação.

Às “Pervas”_ Aléxia, Lud, Pacú`s, e Tati, por todos os momentos que vivemos durante estes sete anos. Pela presença, carinho, e amizade nas horas que eu mais precisei.

Aos meus irmãos Guto e Cris, pelo amor e amizade. Ao Guto em especial pelo escaneamento das minhas fotos.

À minha vovó Delci, por estar presente tão significativamente em toda a minha vida.

À minha família (Tios, primos e adendos), pela simples existência em minha vida.

Aos meus AMIGOS Janaína, Marina, Elaine e Richard pela amizade, apoio, incentivo, alegrias, pelos gestos carinhosos e por acreditarem em mim e torcerem pelo meu sucesso.

Agradeço a Deus, Àquele que sempre esteve ao meu lado, em silêncio protegendo, guiando e amparando os meus passos nesta caminhada. Que tornou possível a concretização de um ideal, dando-me a vida, amor e força para chegar até aqui, donde partirei para caminhos mais longos com a certeza de que nunca estarei só.

SUMÁRIO

1 - RESUMO	1
2 - INTRODUÇÃO	3
3 - RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	25
4 - OBJETIVOS	28
4.1 - Objetivo geral	28
4.2 - Objetivos específicos	28
5 - MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1 - Células	29
5.1.1 - Células Vero	29
5.1.2 - Células A31	29
5.2 - O vírus Vaccínia	29
5.3 - Transformação Bacteriana	30
5.4 - Extração de DNA Plasmidial	31
5.4.1 - Preparação em pequena escala	31
5.4.2 - Preparação em larga escala	31
5.5 - Sondas Moleculares	33
5.5.1 - EGR-1	33
5.5.2 - GAPDH e Oligonucleotídeo 18S	33
5.5.3 - Oligonucleotídeo SRE	34
5.5.4 - Oligonucleotídeo AP-1	34
5.5.5 - Marcação isotópica das sondas moleculares	34
5.6 - Análise da expressão do gene precoce EGR-1	36

5.6.1 - Extração do RNA celular total	36
5.6.2 - Fracionamento eletroforético dos RNAs	37
5.6.3 - Transferência de “Northern”	37
5.6.4 - Hibridizações	37
5.7 - Inibidores de proteínas	38
5.7.1 - H7	38
5.7.2 - H89	38
5.7.3 - Tyrphostin AG 126	39
5.7.4 - PD 98059	39
5.7.5 - Ro 31-8220	39
5.8 - Análise das interações DNA /Proteínas	39
5.8.1 - Extratos protéicos celulares	39
5.8.2 - Análise do retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA)	40
6 - RESULTADOS	42
7 - DISCUSSÃO	55
8 - PERSPECTIVAS	59
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Expressão do gene EGR-1 em células A31 infectadas pelo VV.	46
Figura 2: Expressão do gene EGR-1 em células A31 infectadas pelo VV VGF ^{-/-} .	47
Figura 3: Efeito da multiplicidade de infecção na indução do gene EGR-1.	48
Figura 4 Expressão de EGR-1 em células A31 infectadas pelo VV inativado com luz U.V.	49
Figura 5: Efeito do inibidor de síntese proteica cicloheximida na indução de expressão do gene EGR-1 pelo VV.	50
Figura 6: Influência do inibidor de proteína quinase H7 na indução de gene EGR-1 pelo VV.	51
Figura 7: Efeito de diferentes inibidores de proteínas quinases na indução do gene EGR-1.	52
Figura 8: Análise das interações do elemento regulatório AP-1 com proteínas de células A31 infectadas pelo VV.	53
Figura 9: Análise das interações do elemento regulatório SRE com proteínas de células A31 infectadas pelo VV.	54

ABREVIATURAS

AP-1	Proteína ativadora transcricional 1
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	fita complementar ao DNA
cAMP	AMP cíclico
<i>c-fos</i> e <i>c-jun</i>	proto-oncogenes celulares fos e jun
Chx	Cicloheximida
Ci	curie
CDK	Quinases dependentes de ciclinas
CRE	Elemento de resposta ao cAMP
dCTP	Dideoxicitosina trifosfato+
ddH ₂ O	água deionizada
DMEM	meio mínimo de Eagle, modificado por Dulbecco
DNA	ácido desoxirribonucléico.
DO	Densidade óptica
dsRNA	RNA dupla fita
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EGF/ EGFR:	fator de crescimento epidérmico e seu receptor.
EGR	gene de resposta precoce ao crescimento
EMSA	Ensaio do retardamento de mobilidade eletroforética
ERK 1/2	Quinase regulada por sinais extracelulares
FC	fator de crescimento
GAPDH	Gliceraldeído fosfato desidrogenase.
GAS	sítio no DNA de ativação pelo IFN γ .
IFN $\alpha/\beta/\gamma$:	Interferons α β ou γ .
ITR	Terminações repetitivas e invertidas
JAK:	Tirosinas quinases da família Janus.
JNK (SAPK)	Jun N-terminal quinase
Kb	Quilobases

Kda	Quilodaltons
LB	
M	Molar
m.o.i.	Multiplicidade de infecção.
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos.
MEM	meio mínimo de Eagle
MEK	
MRNA, rRNA:e tRNA	ácido ribonucléico mensageiro, ribossomal e transportador.
OFR	fase aberta de leitura
Pb	Pares de base
PBS	solução salina tamponada contendo fosfato
PCI	fenol-clorofórmio-álcool isoamílico
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto
PRB	Proteína do retinoblastoma
p/v	Peso volume
SDS	duodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino.
SIE	Elemento indutível em meio condicionado por sis
SRE	Elemento de resposta ao soro
SRF	fator de resposta ao soro
SSC	solução de citrato de sódio
STATs	Proteínas transdutoras de sinal e ativadoras transcricionais.
TBE	
TE	Tris-EDTA
UFP	unidade viral formadora de placa.
TNF	Fator de necrose tumoral
U	Unidade
UV	ultra violeta
VGF	fator de crescimento do vírus Vaccínia.
VV	vírus Vaccínia.
WBB	

1 - RESUMO

Com a finalidade de maximizar os recursos para a 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. Assim, processos como estimulação mitogênica celular, inibição da apoptose e indução de diferenciação celulares são estratégias comumente utilizadas por diversos vírus. O Vírus Vaccinia (VV) é o protótipo de família poxviridae, seu genoma é constituído de DNA dupla fita linear, potencialmente capaz de codificar aproximadamente 200 polipeptídeos.

Para melhor compreensão dos eventos que ocorrem precocemente durante a infecção pelo VV, nós analisamos o papel do gene de resposta precoce ao crescimento (EGR-1). A expressão de EGR-1 em resposta a infecção pelo VV foi observada após 1 hora de infecção viral e permanece elevada até 9 horas pós infecção. Também analisamos a participação do VGF (fator de crescimento do VV), na expressão do gene EGR-1, e observamos que a expressão deste gene foi independente da presença de VGF. A expressão do gene EGR-1 foi dependente da multiplicidade de infecção, sendo evidente com a menor m.o.i. 0,01 e máxima nas multiplicidades 0,1 e 1,0.

Uma vez que a expressão de EGR-1, foi totalmente anulada quando as células foram infectadas com o VV previamente inativado com U.V. e que o inibidor de síntese proteica, cicloheximida, foi capaz de inibir a expressão de EGR-1 de maneira dose dependente, podemos sugerir que para a indução de EGR-1 pelo VV é necessário síntese de proteínas virais e/ou celulares.

Foram investigados também o efeito de diferentes inibidores de proteína-quinases, na indução da expressão do gene EGR-1 pelo VV. Os resultados demonstram que o inibidor H7, foi capaz de inibir de maneira dose dependente a expressão de EGR-1 em resposta à infecção pelo VV. O inibidor de MEK PD 98059, foi capaz de inibir significativamente a expressão de EGR-1 pelo VV, o mesmo não foi observado quando utilizamos os inibidores H89, AG-126, isto é, inibidores de PKA e ERK 1 e 2 respectivamente. Entretanto o inibidor de PKC (Ro 318220) aparentemente elevou o acúmulo de EGR-1.

A regulação da expressão do gene EGR-1 é exercida através de diferentes elementos regulatórios existentes na porção 5' dentre eles dois AP-1, quatro sítios SP-1, dois elementos de resposta ao cAMP (CRE) e 6 CarG boxes ou SRE. Desta

forma, verificamos a participação de alguns destes elementos regulatórios através da análise das interações DNA/Proteína (EMSA), utilizando-se oligonucleotídeos referentes às sequências AP-1 e SRE do gene em resposta a infecção pelo VV e este estudo evidenciou a formação de complexos DNA/proteína tanto com a sequência de AP-1 quanto de SRE. A infecção com o VV induz a atividade de ligação proteica ao elemento SRE 120 minutos após a infecção, aumentando gradativamente até 270 minutos pós infecção. No entanto, a ligação proteica à sequência AP-1 foi observada somente após 3-4 horas de infecção.

Os ativadores transcricionais que se ligam à AP-1 e SRE foram também analisados utilizando-se anticorpos policlonais e verificamos a participação da proteína FOS no complexo formado no sítio AP-1 e da proteína SRF no complexo formado no sítio SRE. A eventual relevância desses resultados na replicação do VV será discutida.

2 - INTRODUÇÃO

2.1- O Vírus Vaccínia

Poxviridae compreende uma ampla família de complexos vírus DNA que se replicam no citoplasma celular de vertebrados e invertebrados. As propriedades gerais desta família incluem: complexos vírus 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 replicação 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 generos: *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxvirus* e *Yatapoxvirus*. Os membros de um gênero são genética e antigenicamente relacionados, e possuem morfologia similar e hospedeiros comuns. Entretanto, a reação sorológica cruzada entre diferentes generos é comumente observada (MOSS, 1996).

O vírus Vaccínia (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.

2.1.2 – Morfologia do Vírion

O vírus Vaccínia 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 & 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, pelos primeiros estudiosos. (FENNER *et al.*, 1989).

Diferentemente da grande maioria de vírus de genoma DNA, a replicação e montagem dos poxvírus ocorrem no citoplasma da célula hospedeira em regiões especiais desprovidas de organelas e membranas (MOSS, 1990). A família *Asfarviridae* também apresenta essa característica (MOSS, 1996). Durante a montagem das partículas virais, ocorre primeiramente o aparecimento de estruturas membranosas no interior das chamadas “fábricas virais”. Essas membranas adquirem forma esférica e as partículas virais imaturas sofrem eventos

adicionais de maturação como clivagem de proteínas do capsídeo (MOSS & ROSEMBLUM, 1973), para darem origem às primeiras partículas maduras infecciosas ou vírions (DALES & POGO, 1981). Esta forma tem sido descrita como vírus nus intracelulares ou INV, não obstante sejam delimitados por pelo menos um envelope lipídico. Acredita-se que uma quantidade variável desses vírus seja transportada aos corpúsculos de Golgi onde sofrem um empacotamento (ICHIHASHI *et al.*, 1971; MORGAN, 1976; HILLER & WEBER, 1985). Relatos sugerem que essas formas são naturalmente liberadas da célula por fusão de seu envelope mais externo à membrana citoplasmática, sendo a seguir liberado para o meio extracelular (DALES & POGO, 1981; FENNER *et al.*, 1989). Esta segunda forma do vírus denominada vírus envelopado extracelular ou EEV, contém polipeptídeos adicionais não encontrados nas formas de INV (PAYNE, 1978), os quais são importantes para a disseminação do vírus durante infecções *in vitro* ou *in vivo* (PAYNE & KRISTENSSON, 1985; BLASCO & MOSS, 1992, 1991). Atualmente, têm-se descrito 4 formas da partícula do vírus Vaccínia dentre elas: vírus imaturos (IV), vírus nus intracelulares ou vírus maduros intracelulares (INV ou IMV), vírus intracelulares envelopados (IEV) e vírus extracelulares envelopados (EEV). Ambas as formas INV e EEV são infectivas (SODEIK *et al.*, 1993 & SCHMELZ *et al.*, 1994).

A partícula viral completa ou vírion apresenta basicamente quatro elementos estruturais principais sendo: envelope, membrana externa, corpúsculos laterais e cerne (FENNER *et al.*, 1989).

O cerne, estrutura mais interna do vírion, 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.

A membrana externa é uma bicamada lipoproteica 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).

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 & HRUBY, 1994). Entretanto, dados recentes, obtidos em um

estudo utilizando-se técnicas de microscopia crio-eletrônica, DUBOCHET e colaboradores (1994) sugerem 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.

O envelope, estrutura mais externa do vírion, é também de origem celular obtida a partir da membrana citoplasmática para as partículas extracelulares e a partir de mediações entre retículo endoplasmático e complexo de Golgi no caso das partículas intracelulares. 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).

2.1.3 – 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 entre 100 e 200 milhões de Daltons, compreendendo entre 160 e 220 Kpb. O genoma completo do vírus Vaccínia (amostra Copenhagen) consiste de 191,636 pb, codificando um total de 263 genes potenciais, e foi obtido 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.*, 1989).

De maneira geral, para a grande maioria dos poxvírus e, principalmente, para os ortopoxvírus, as seqüências de DNA localizadas na porção central do genoma apresentam-se extremamente conservadas, o que pode ser confirmado a partir de mapas de restrição gerados com diferentes membros da família. Por outro lado, as regiões mais externas do genoma, pelo mesmo critério, não se apresentam tão conservadas. (MÜLLER *et al.*, 1977; DeFILIPPES, 1982; ESPOSITO e KNIGHT, 1985; DOUGLASS *et al.*, 1994; VENKATESAN *et al.*, 1982, GOEBEL *et al.*, 1990). A região central do genoma codifica principalmente polipeptídeos estruturais e enzimas envolvidas no metabolismo do ácido nucleico, enquanto que genes relacionados à interação com o hospedeiro estão

preferencialmente localizados nas regiões terminais variáveis. Estas, por sua vez, estão arranjadas em estruturas típicas, contendo seqüências repetidas e invertidas (ITRs) de até 12Kpb e foram primeiramente demonstradas por GARON e colaboradores em 1978. Os dados da literatura demonstram que estas regiões ITR são de fundamental importância, uma vez que codificam vários genes responsáveis pela interação vírus-hospedeiro e mecanismos de patogênese. (GARON, *et al.*, 1978; ESPOSITO e KNIGHT, 1985; BROWN *et al.*, 1985; REISNER, 1985; FENNER *et al.*, 1989; MASSUNG *et al.*, 1993).

2.1.4 – Ciclo replicativo dos poxvírus

Conforme citado anteriormente, a replicação e montagem dos poxvírus ocorrem 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 replicativo varia de 12 a 24 horas em células de linhagem contínua derivadas de rim de macaco (Vero). As informações relativas ao ciclo replicativo do vírus Vaccínia que se seguem, refletem também as informações para a grande maioria dos poxvírus (BULLER e PALUMBO, 1991).

2.1.4.1 - Adsorção e penetração

A infecção dos poxvírus inicia-se com a adsorção da partícula viral à superfície celular. Diferentemente do que acontece com a maioria dos outros vírus, os poxvírus não possuem um único ligante específico de interação com receptores celulares, sendo que, pelo menos cinco polipeptídeos presentes no envelope e membrana externa virais são importantes no processo de adsorção. A grande maioria dos poxvírus codifica uma proteína semelhante ao fator de crescimento epidérmico celular (EGF), a qual, para o vírus Vaccínia, foi denominada **VGF** ou fator de crescimento do VV (BULLER e PALUMBO., 1991). Em função disso, postulou-se até recentemente a existência de uma forma de VGF presente no envelope viral o qual se ligaria ao receptor de EGF durante a adsorção e penetração nas células hospedeiras (EPPSTEIN *et al.*, 1985). No entanto, relato recente mostra que o vírus Vaccínia não utiliza o mesmo receptor celular utilizado pelo EGF. No estudo em questão, foram utilizados além de vírus selvagem, uma cepa de vírus mutante deletado para o gene de VGF, uma linhagem de células que não expressa o receptor de EGF (**EGFR**) e um subclone dessas carregando estavelmente o gene humano para EGFR. A expressão do VGF pelo vírus Vaccínia ou de EGFR pelas células não influenciou nem na adsorção, nem na penetração do vírus nas células (HUGIN & HAUSER 1994).

A utilização de anticorpos monoclonais contra diferentes proteínas do vírion tem sido fundamental na determinação da complexa interação dos poxvírus com as células hospedeiras, não apenas do ponto de vista da adsorção e penetração, mas também na elucidação de fenômenos desencadeados nas células infectadas como por exemplo a detecção da proteína 14 K, a qual é capaz de induzir a fusão celular, evento este importante para a disseminação da infecção dos poxvírus. (MEYER *et al.*, 1994).

Imediatamente após a adsorção, através de um processo de fusão entre o envelope viral e a membrana plasmática, se dá a penetração, onde o vírus é internalizado no citoplasma, evento este denominado desnudamento primário (DOMS *et al.*, 1990).

2.1.4.2 - Desnudamento

Durante o desnudamento primário, o vírus perde o envelope, sendo a membrana externa degradada por enzimas celulares. O processo não é afetado por inibidores de RNA ou de síntese protéica, e culmina com a liberação do cerne viral no citoplasma, o qual ainda contém o genoma do vírus. Na etapa seguinte, ocorre o desnudamento secundário, quando o DNA viral é liberado no citoplasma da célula hospedeira. O processo pode ser bloqueado por inibidores de transcrição e tradução, o que significa que o mesmo é dependente da síntese de RNA e proteínas virais (FENNER *et al.*, 1989; MOSS, 1990).

2.1.4.3 - Expressão de genes virais

Os genes virais podem ser caracterizados de acordo com o momento em que são expressos, sendo genes precoces aqueles cujos produtos são sintetizados antes da replicação do DNA viral e genes intermediários ou tardios aqueles cujos produtos são sintetizados durante ou após a replicação do DNA viral, (MOSS, 1990).

Aproximadamente 100 polipeptídeos são provenientes de genes precoces e estão relacionados com a regulação da multiplicação viral e envolvem enzimas e fatores de ligação ao DNA, além de fatores de crescimento ou proteínas de interação com o hospedeiro. Estes últimos serão descritos em seção à parte.

A transcrição dos genes precoces não requer a síntese de proteínas “de novo”, sendo realizada exclusivamente por enzimas contidas no próprio vírion como, por exemplo, a RNA-polimerase-DNA-dependente, enzimas responsáveis pela

metilação e poliadenilação dos mRNAs recém-sintetizados e fatores de transcrição precoces responsáveis pela ativação dos genes precoces (MOSS, 1990; ZHANG *et al.*, 1994; SMITH *et al.*, 1997).

A maioria dos genes tardios codifica os polipeptídeos estruturais ou enzimas que farão parte do vírion. Estes genes apresentam em suas regiões promotoras a seqüência conservada TAAAT, onde se ligam os fatores ativadores transcricionais tardios associados às polimerases virais (FENNER *et al.*, 1989; SMITH *et al.*, 1997).

Existe ainda uma terceira classe de proteínas sintetizadas imediatamente após a duplicação do DNA viral, constituída principalmente por fatores de transcrição, denominadas proteínas intermediárias (MOSS,1990; BULLER & PALUMBO, 1991).

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

2.1.4.4 - Regulação gênica

A regulação gênica dos poxvírus ocorre em nível transcricional, através da ligação das proteínas regulatórias aos promotores de cada gene ou cada fase de leitura aberta. Até recentemente, acreditava-se que a regulação gênica dos poxvírus acontecesse 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 tardiamente precoces, os produtos destes, por sua vez, regulariam a transcrição dos genes intermediários, assim sucessivamente (MOSS, 1990).

No entanto, relatos mais recentes têm demonstrado que alguns fatores transcricionais, os quais se acreditava ser de origem viral, podem ser isolados também de células não infectadas, sugerindo que a regulação da transcrição de alguns genes pode ser dependente de fatores celulares, colocando em questão um simples modelo de cascata para regulação gênica para os poxvírus (ROSALES *et al.*, 1994; KOVACS *et al.*, 1994). Analisando-se as diferenças de estabilidade dos

diferentes RNAs mensageiros virais precoces e tardios, MOSS (1990), sugere a possibilidade da existência de regulação pós-traducional para os poxvírus.

2.1.4.5 - Replicação do DNA

Após 2 a 3 horas de infecção com o VV, ocorre início da síntese de DNA pelas enzimas replicativas virais, a qual se estende por mais 3 horas, quando declina rapidamente terminando várias horas antes que a nova progênie viral possa ser detectada. O processo se inicia com um corte em um sítio específico no DNA parental nas regiões das terminações repetidas e invertidas (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 (FENNER et al., 1989). Durante a replicação do DNA podem ocorrer recombinações dos genomas virais (BULLER e PALUMBO, 1991).

2.1.4.6 - Morfogênese e liberação das partículas virais

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). Nessas regiões não foram detectados polirribossomos, demonstrando que as proteínas foram produzidas e transportadas para as mesmas (FENNER *et al.*, 1989).

Segundo SODEIK e colaboradores (1993), a formação de partículas virais se dá através da participação de membranas celulares, as quais atuam envolvendo o viroplasma e partículas maduras. Relatos recentes demonstram que estas membranas são originadas a partir do compartimento intermediário entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, e não da forma como se acreditava até recentemente, em que as estruturas membranosas observadas nos sítios de morfogênese seriam sintetizadas pelos poxvírus num processo denominado síntese “de novo”, pelas enzimas virais as quais atuariam sobre lipídios celulares (SODEIK *et al.*, 1993; SCHMELZ *et al.*, 1994).

2.1.5 – Poxvírus isolados no Brasil

O vírus Cotia foi isolado a partir de camundongos sentinelas, na estação florestal Cotia, São Paulo, em 1961. ESPOSITO e colaboradores (1979) demonstraram uma reação cruzada entre os vírus Cotia e anti-soros para o vírus Myxoma e análises em gel de poliacrilamida de proteínas estruturais, sugeriam uma relação entre este vírus e os vírus Myxoma e vírus do fibroma de Shope. A partir das análises do perfil de restrição do genoma do vírus Cotia, ESPOSITO e colaboradores (1979) sugerem que o vírus Cotia pode ser considerado um recombinante natural entre Ortopoxvírus e Leporipoxvírus, enquanto UEDA e colaboradores (1995) sugerem a criação de um novo gênero para a inclusão deste vírus.

Em 1963, o vírus BeAn foi isolado do rato *Oryzomys*, capturado na floresta de Utinga, Belém, Pará e foi relacionado sorologicamente ao vírus Cotia, sendo considerado um poxvírus (LANNA, 1980). O vírus BeAn 58058 apresenta características biológicas muito semelhantes ao vírus Vaccínia porém, estudos comparativos entre os vírus BeAn e o Vaccínia, demonstram que o vírus BeAn 58058 é bem menos virulento (LANNA, 1980). Tanto o vírus Cotia, quanto o vírus BeAn 58058 foram estudados no Laboratório de Vírus da UFMG por LANNA (1980), que investigou propriedades biológicas dos vírus e VIANNA (1982), que enfatizou as relações sorológicas entre estes vírus e o protótipo Vaccínia. FONSECA e colaboradores (1996) baseados nos perfis de restrição dos genomas de Cotia e BeAn 58058, em ensaios de hibridização cruzada entre os genomas digeridos destes vírus e o genoma total do VV, na análise da detecção de transcritos virais e na análise da síntese de proteínas virais, sugerem a classificação destes poxvírus silvestres junto ao gênero *Orthopoxvírus*. Além disto, FONSECA e colaboradores sugerem que o isolamento do vírus BeAn 58058 poderia ter sido resultado de um escape do VV do laboratório para o meio ambiente, na época da vacinação.

O vírus Belo Horizonte (vBH), isolado em 1993, no biotério do ICB/UFMG, foi caracterizado biologicamente no Laboratório de Vírus da UFMG. A identificação da amostra viral como sendo um isolado de poxvírus realizada utilizando-se técnicas como hemadsorção e soroneutralização, além de testes de microscopia eletrônica, nos quais foram detectadas partículas apresentando morfologia característica. A caracterização molecular baseada no perfil de restrição do seu genoma e detecção de genes conservados na família *Poxviridae* e no gênero *Orthopoxvírus* foi realizado e o vírus vBH apresentou um perfil de restrição

característico dos poxvírus e os genes TK e VGF foram detectados em seu genoma.

O vírus Araçatuba foi isolado na cidade de Araçatuba, SP, a partir de um rebanho em que as vacas apresentavam lesões ulcerativas nas tetas, típicas de infecção por Cowpox. Além das vacas, o ordenhador também apresentava uma lesão típica de cowpox nas mãos. Esta amostra está atualmente sendo caracterizada no Laboratório de Vírus (ICB/UFMG) pela doutoranda Giliane Trindade.

2.2 – Os fatores de Crescimento

2.2.1 – Sinalização celular desencadeada pelos fatores de crescimento

A proliferação celular é controlada por fatores de crescimento extracelulares, os quais se ligam aos receptores específicos situados na superfície celular, e são capazes de estimular a mitogênese. Na ausência desses fatores de crescimento, ou seja, quando são privadas de soro, as células entram no estado de quiescência ou G_0 . A re-exposição ao soro ou agentes mitogênicos é capaz de induzir novamente as células a entrarem em mitose. O estímulo gerado pelo fator de crescimento na membrana celular é transmitido através do citoplasma, indo até o núcleo, estimulando então a expressão de genes associados com a proliferação (*c-fos*, *c-jun*, *EGR-1*, *c-myc*, etc) e estes por sua vez, às células a saírem de G_0 , e entrarem na fase S (síntese de DNA) (COOPER, 1995).

A sinalização celular desencadeada por fatores de crescimento (FC) tais como EGF e PDGF, por exemplo, envolve fosforilação direta a partir das porções citoplasmáticas de seus receptores, os quais apresentam atividade tirosina quinásica associada, estes se auto-fosforilam nos resíduos de tirosina, desencadeando a cascata de sinalização celular envolvendo ras-MAP quinases (proteínas quinases ativadas por mitógenos) e/ou Proteína Quinase C (PKC) - MAP quinases (CARPENTER e WAHL, 1990; MOODIE *et al.*, 1993).

Recentemente, foi demonstrado que, além das vias anteriores, que são as principais utilizadas pelos FCs, alternativamente, estes fatores também podem utilizar a via transdutora de sinal que emprega as proteínas JAK/STATs. As proteínas tirosinas quinases JAK pertencem à família das Janus quinases e compreendem 4 membros, JAK 1-3 e Tyk 2, as quais estão associadas à

receptores de membrana e uma vez estimuladas são fosforiladas, e a seguir fosforilam a cadeia do receptor celular ao qual se associam, criando assim um sítio no qual as STATs possam interagir com o receptor, quando são então fosforiladas (ativadas) pelas JAKs. As proteínas STATs (transdutoras de sinal e ativadoras transcricionais) compreendem 7 membros sendo STAT 1 a 4, 5A e 5 B e 6, são encontradas de forma latente no citoplasma e se associam ao receptor após estimulação pelas citocinas e/ou FCs, e após serem ativadas transferem o sinal ao núcleo celular. Esta via foi originalmente descrita para interferons (IFNs), sendo que o IFN α se utiliza das tirosinas quinases Tyk2 e JAK1, além das STATs 1 - 3. O IFN γ por sua vez, emprega JAK1 e JAK2, além da STAT 1 (SILVENOINEN *et al.*, 1993; RUFF-JAMISON *et al.*, 1993; SADOWISKI *et al.*, 1993; LEAMAN *et al.*, 1996 e STARK *et al.*, 1998).

Estudos realizados tanto “*in vitro*” quanto “*in vivo*” demonstraram que, durante a estimulação pelos fatores de crescimento, STAT 1 α (p91) é fosforilada e forma um complexo específico que se liga à sequência do DNA, situada na região regulatória do proto-oncogene *c-fos*, conhecida como (SIE) ou elemento indutível em meio condicionado com Sis, a qual apresenta alta similaridade com a sequência GAS: sítio de ativação pelo interferon gama (RUFF-JAMISON *et al.*, 1993 & SADOWISKI *et al.*, 1993). Devido ao fato que o EGF e VGF dividem similaridades estruturais e funcionais, isto abriu perspectivas para a análise da utilização da via JAK/STAT pelo VV durante sua multiplicação. Durante a nossa monografia ao Bacharelado em Ciências Biológicas, testamos esta hipótese utilizando linhagens celulares deficientes em JAK/STAT (BONJARDIM, 1998) e pudemos concluir que esta via sinalizadora não desempenha papel significativo na multiplicação do vírus Vaccínia (Monografia apresentada ao Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG, em 28 de novembro de 1997).

Os receptores de fatores de crescimento tais como EGF e PDGF, ao serem estimulados sofrem um processo de dimerização e se autofosforilam. A autofosforilação ocorre de maneira cruzada nos resíduos de tirosina de cada uma das cadeias dos receptores. Uma vez fosforiladas, estas servem como sítio específico de ligação para proteínas com domínios SH2, as quais são então fosforiladas e transferem os sinais mitogênicos através do citoplasma até o núcleo (KARIN & HUNTER 1995).

Os domínios SH2 se ligam especificamente a peptídeos contendo fosfotirosina. Existem basicamente três principais vias transdutoras de sinal que dependem deste sinal inicial disparado através das fosfotirosinas: a fosfolipase C, a qual

catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol, gerando os segundos mensageiros diacilglicerol e inositol trifosfato, sendo esta utilizada também pelo VGF do VV (KIM, *et al.*, 1995), as STATs (descritas acima) e as MAP quinases (HILES *et al.*, 1992; LOWENSTEIN *et al.*, 1992; FU e ZHANG, 1993; CAI *et al.*, 1993).

A ativação da via sinalizadora ras-MAP quinases envolve primeiramente a ativação dos proto-oncogenes *ras* e *raf* (proteínas), os quais iniciam a cascata de fosforilação através das MAP quinases, e estas irão transmitir o sinal mitogênico até o núcleo. Esta cascata envolve a fosforilação de proteínas serinas, treoninas e tirosinas quinases as quais se translocam ao núcleo, ativando fatores de transcrição e, conseqüentemente, alterando a expressão gênica (HOWE *et al.*, 1992; COOPER, 1995; ROBINSON e COBB, 1997).

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 dentro de 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).

2.2.2 – Os proto-oncogenes

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).

Oncogenes foram inicialmente identificados como genes carreados por vírus que causam transformação em suas células alvo. A maioria dos oncogenes virais possuem um gene celular relacionado, os quais são essenciais nas funções metabólicas e integridade celular. Estes genes celulares são chamados proto-oncogenes.

Os proto-oncogenes estão, em geral, relacionados com regulação do crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular e, somente quando desregulados ou

estruturalmente alterados, podem levar as células a um estado neoplásico ou provocar câncer (LEWIS, 1995).

2.2.2.1 - Ativação transcricional do proto-oncogene c-fos

A regulação da expressão do proto-oncogene *c-fos* é um exemplo particularmente bem estudado de indução gênica imediatamente precoce. Sua transcrição é extremamente rápida, sendo detectada 10-15 minutos após estimulação com fatores de crescimento (MULLER *et al.*, 1984; OLIVEIRA *et al.*, 1997). A ativação transcricional de *c-fos* é mediada por dois elementos regulatórios principais: o elemento de resposta ao soro (SRE) e o elemento indutível em meio condicionado por sis (SIE), (TREISMAN, 1992; HILL e TREISMAN 1995).

A transcrição e o nível de mRNA de *c-fos* retornam a níveis basais após duas horas de estimulação com fatores de crescimento. Embora a síntese de proteína não seja requerida para a indução de *c-fos*, ela é necessária para o desligamento da transcrição, sugerindo que seja necessário a síntese de um repressor. Alguns dados indicam que a própria síntese da proteína FOS estimule a sua auto-repressão, se ligando no elemento SRE do promotor do gene, pois FOS é fosforilada pelas MAP quinases, tanto em seu domínio de repressão (carboxi terminal), quanto em seu domínio de ativação (amino terminal) no complexo AP-1 (FOS/JUN). No entanto, apesar de bastante evidente a participação das MAP quinases na ativação e repressão de *c-fos*, esses eventos não foram ainda totalmente elucidados. Além disso, dados mais recentes indicam a existência de uma proteína, p66^{shc}, com atividade reguladora negativa de FOS. P66^{shc} faz parte da família das proteínas que contêm domínios SH2 (^{shc}proteínas), e que compreende também P52^{shc} e P46^{shc}, as quais são alvos de tirosinas quinases citoplasmáticas. P66^{shc} além de inibir a transcrição de *c-fos*, é incapaz de transformar fibroblasto de camundongo, *in vitro*, diferentemente das duas outras isoformas, além de não ativar MAP quinases, o que também difere de P52^{shc} e P46^{shc} (MIGLIACCIO, 1997; KARIN & HUNTER 1995).

O protótipo de SRE foi identificado como um elemento regulatório essencial no promotor do proto-oncogene *c-fos*. Ele foi definido originalmente como um oligonucleotídeo contendo um sítio ligante ao fator de resposta ao soro (SRF), uma proteína ubíqua de 67 kDa cuja ligação parecia ser essencial para a resposta do promotor à estimulação pelo soro. A seqüência SRE presente tanto no promotor de *c-fos*, quanto de outros promotores, responde a sinais de diversos fatores de crescimento, através da interação com diferentes receptores. Esta resposta pode ser dependente ou independente de proteína quinase C (PKC).

Além disso, a atividade de SRE pode ser modulada pelos níveis de AMP cíclico (cAMP) intracelular. Estudos mais recentes têm demonstrado que a atividade de SRE é também potencializada por outras moléculas sinalizadoras intracelulares, por exemplo, a atividade de SRE é estimulada por formas ativadas de tirosinas quinases associadas à membrana como Src e Fps, além de formas ativadas de *Raf*, e por Ras (TREISMAN, 1992).

O elemento SRE na região regulatória do gene *c-fos* é reconhecida pelo fator de resposta ao soro (SRF) que forma um complexo com uma segunda proteína denominada Elk1, SAPs 1 ou 2 também denominada fator do complexo ternário (TCF), após a estimulação mitogênica (DALTON & TREISMAN, 1992; PRICE *et al.*, 1995; PRICE *et al.*, 1996). Como requisitos, ambos SRF e Elk1 são necessariamente fosforilados pelas MAP quinases, para que se forme o complexo SRF/Elk1 ativado, aumentando então, a atividade de ligação ao DNA, promovendo a transcrição de *c-fos* (HIPSKIND & NORDHEIM, 1991; COOPER, 1995; CAHILL *et al.*, 1996). A ativação de SRE parece ser regulada negativamente por um mecanismo envolvendo a proteína FOS (TREISMAN, 1992).

As proteínas do complexo ternário pertencem à família de domínio Ets, que incluem Elk-1, SAP-1, e SAP-2. A sequência primária destas proteínas apresenta significativa similaridade em três regiões distintas. A região N-terminal compreende o domínio Ets, o qual promove a ligação ao DNA. A região mais central é requerida para a formação do complexo ternário que têm-se demonstrado que ocorre através do contato direto entre Elk-1 e SRF. A região carboxi terminal é o domínio de ativação possuindo vários sítios conservados de fosforilação por MAP quinases. A ativação das proteínas do complexo ternário, Elk-1 e SAP-1 resulta na ativação transcricional de genes dependentes de SRE (WHITMARSH *et al.*, 1997)

MAGALHÃES e colaboradores (2000) estudando a estimulação mitogênica desencadeada precocemente após a infecção com o VV envolvendo o gene *c-fos*, demonstraram que o vírus Vaccinia estimula a expressão do gene utilizando-se dos elementos regulatórios existentes no promotor do gene como o SRE e AP-1.

2.2.2.2 – Ativação transcricional de c-jun (AP-1)

Em contraste ao *c-fos*, a indução de *c-jun* em resposta aos fatores de crescimento é mediado pelo elemento de ligação ao DNA AP-1 e a proteína JUN parece funcionar como auto-regulador positivo, sendo *junB* seu regulador negativo.

Estímulos mitogênicos resultam na fosforilação de proteínas JUN pre-existentes, no seu domínio de ativação amino-terminal (COOPER 1995). JUN é um dos componentes do fator de transcrição AP-1, e seu melhor “par” tem sido FOS. O complexo conhecido com AP-1 pode consistir de heterodímeros entre um membro da família JUN (que também inclui JunB e JunD), e um da família FOS (também inclui FosB, Fra1 e Fra2). No entanto estes heterodímeros não são tão estáveis como JUN-FOS. Homodímeros de JUN também são capazes de se ligarem ao sítio AP-1. (KARIN e HUNTER, 1995; CURRAM e FRANZA, 1988; COOPER, 1995)

As proteínas JNK/SAPKs (MAPK ativada por estresse ou Quinase Jun-N terminal) provavelmente são responsáveis pela estimulação da atividade transcricional de c-jun, através da fosforilação dos resíduos Ser 63 e Ser 73 no sítio de ativação de JUN. entretanto ambas as serinas são seguidas por prolinas, característica de proteínas alvo de MAPKs, e nem ERK nem p38^{MAPK} fosforilam eficientemente este sítio. De fato, ERKs MAPKs fosforilam um sítio localizado na porção carboxi-terminal de JUN, associado com a inibição da ligação ao DNA, (KARIN e HUNTER, 1995).

Diferentes vias e mecanismos, incluindo a indução de c-fos e c-jun assim como as modificações pós-transducionais de seus produtos, contribuem para a atividade de AP-1. Uma vez que seu sítio é encontrado nas regiões regulatórias de diversos genes celulares, incluindo, proto-oncogenes como c-jun, c-fos e EGR-1 é provável que alguns genes podem ter uma maior resposta à indução de c-fos e ativação de ERKs e outros à fosforilação de Jun e ativação de JNK/SAPK. (COOPER 1995, KARIN e HUNTER, 1995).

2.2.2.3 – Ativação transcricional de EGR-1

O gene da resposta precoce ao crescimento (Egr-1), também conhecido como Krox-24, Zif/268, NGFI-A e TIS8, codifica um fator de transcrição, EGR, com massa molecular de aproximadamente 80kDa e que contem 3 C₂H₂ dedos de zinco, característica de uma classe de fatores de transcrição de eucariotos. Outros membros da família do gene Egr são Egr-2, Egr-3 e Egr-4 contêm domínios dedos de zinco similares, mas se diferem nas regiões fora destes domínios (MCMAHON e MONROE, 1995; CAO *et al*, 1990; CHRISTY *et al*, 1988; SUKHATME *et al*, 1988). A proteína EGR liga-se a sequências ricas em GC no promotor de vários genes incluindo fatores de crescimento e citocinas, sendo esta ligação dependente de zinco (CAO *et al.*, 1990).

EGR-1 é um gene imediatamente precoce, induzido por diversos sinais de crescimento e diferenciação como por exemplo soro, PDGF, EGF, NGF (Nerve growth factor), TNF (fator de necrose tumoral) e está funcionalmente relacionado à proliferação e diferenciação celular (HILL e TREISMAN, 1995; SUKHATME *et al.*, 1988; SUKHATME, 1990; NGUYEN *et al.*, 1993). Além disso Egr-1 é induzido por estresse e diferentes tipos de danos no DNA, agentes como luz U.V e radiação ionizante (HUANG *et al.*, 1994; LIM *et al.*, 1998).

A transcrição do gene Egr é rápida e transiente após a célula ter sofrido um estímulo mitogênico e geralmente é paralela àquela observada para *c-fos* (SUKTAME *et al.*, 1988; MILBRANDTM 1987) e não requer síntese de proteína “de novo”, uma vez que o inibidor de síntese proteica cicloheximida, leva a uma superindução deste gene, devido a estabilização do mRNA e o prolongamento do período de transcrição (CHAVRIER, *et al.*, 1989, CHRISTY e NATHANS, 1989).

Os diversos sinais que conduzem à ativação transcricional de Egr podem ser mediados por múltiplos sítios regulatórios encontrados no promotor de Egr, entre eles dois sítios AP1, 4 sítios SP1, 2 elementos de resposta ao cAMP (CRE) e 4 CarG boxes ou SRE (TSAI-MORRIS *et al.*, 1988; , CHRISTY e NATHANS, 1989; RUPPRECHT *et al.*, 1994).

A correlação entre *c-fos* e *c-egr* pode ser explicada em parte pela presença de elementos em comum no promotor de ambos os genes, principalmente SRE (McMALTHON e MONROE,1995). Segundo HODGE e colaboradores (1998), o hormônio do crescimento (HC) que é o principal regulador natural de crescimento e metabolismo corpóreo, regula a expressão de genes celulares, dentre eles *c-fos* e EGR de maneira dependente de SRE. O hormônio do crescimento estimula a fosforilação de Elk-1 e a expressão de genes dependentes de Elk-1 através da via envolvendo Ras / MEK e ERK 1 e 2. A superexpressão de um dominante negativo de Ras, reduz a fosforilação de Elk-1 estimulada por HC e a utilização de PD098059 (100µM) um inibidor específico de MEK aboliu a fosforilação de Elk-1, juntos estes dados reforçam a hipótese de que Ras/MEK e ERK-1 e 2 seja a principal via utilizada pelo HC para ativação de Elk-1 (por fosforilação) e consequente expressão de genes regulados por SRE como por exemplo *c-fos* e *c-egr*. Este autores também demonstraram que o HC não ativa JNK e produz um leve aumento na atividade de p38^{MAPK}, o qual não contribui significativamente para a estimulação da fosforilação ou ativação de Elk-1 por HC.

Como já citamos o gene EGR também é ativado por diferentes estresse celulares, LIM e colaboradores (1998) estudaram a indução de EGR-1 por diferentes estresses como choque térmico, luz U.V., anisomicina, arsenito de sódio, e em todos os tratamentos o gene EGR-1 foi induzido através de fosforilação de Elk-1, via JNK1 e p38 e não via ERK2. JNK e p38 após serem fosforiladas induzem a atividade transcricional de EGR-1, através da ativação do complexo fator ternário, Elk-1. O estresse celular também culminou num aumento na fosforilação da proteína EGR-1 e em sua atividade de ligação ao DNA. De acordo com os dados acima apresentados, sugere-se que a indução do gene EGR-1 por fatores de crescimento e estresse são mediados através de diferentes subgrupos de MAPquinas, as quais podem também afetar diferentemente a função de EGR-1 e de seus genes alvos (LIM, *et al.*, 1998)

O vírus T-Linfotrófico humano (HTLV-I) causa a leucemia/linfoma de células T em adultos (ATLL). O ativador transcricional do vírus, HTLV Tax, pode ativar uma variedade de genes celulares. Entretanto, a transformação de células T promovida pelo HTLV-I, pode envolver proteínas virais adicionais, as quais são produtos do processamento simples ou duplo do mRNA. Para determinar o efeito combinado dessas proteínas virais na expressão de genes celulares, BLACK e colaboradores (1997) utilizaram transfectantes estáveis que expressavam constitutivamente as regiões pX e env do HTLV-I produzidos em células T-Jurkat (J3.9). Através de transferência de “Northern” eles demonstraram que estas células aumentaram substancialmente os níveis de mRNA de EGR-1 e *c-jun*, e ainda através do ensaio do retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA), realizados com extratos de células J3.9, verificaram um aumento da ligação à CRE e SRE, o que sugere que as proteínas pX e aquelas da região do env de HTLV-I promovem a ativação persistente de CRE e SRE.

Durante a latência do vírus Herpes simples (HSV) em neurônios, uma única família de transcritos virais (Transcritos associados à latência ou LATs) são sintetizados. Dentro da região promotora de LAT, TATAROWICZ e colaboradores (1997) identificaram uma sequência consenso para a ligação da proteína EGR numa posição incomum, imediatamente após o “TATA box”. As proteínas EGR são rapidamente induzidas por estímulos, os quais também induzem a reativação do HSV. Para determinar a participação das proteínas EGR no controle transcricional de LAT, estes autores analisaram a interação entre EGR e o promotor LAT e demonstraram que as proteínas EGR se ligam especificamente à sequência consenso de EGR no promotor de LAT, impedindo assim que a proteína que se liga ao TATA box (TBP) reconheça esta sequência e

assim ative os genes relacionadas à latência do HSV. Conseqüentemente o genoma viral será reativado. CALOGERO e colaboradores (1996) estudaram a participação de EGR na infecção pelo herpesvírus Epstein Barr (EBV), e demonstraram que EGR-1 é regulado positivamente minutos após a interação do vírus EBV com o linfócito B.

Infecções pelo vírus HIV são caracterizadas pela desregulação funcional das células do sistema imune num estágio precoce e mais tardiamente pela depleção dos linfócitos CD4+. Recentemente foi reportado que o HIV provoca modificações na expressão de genes celulares fisiologicamente importantes como das citocinas. DRON e colaboradores (1999) demonstraram que o HIV induz um aumento nos níveis normais de mRNA de Egr-1 em células U937 (promonócitos). O aumento de EGR-1 foi observado tanto em dois clones de U937 cronicamente infectados por HIV-1, quanto em células U937 infectadas com HIV-1 em comparação com células controles não infectadas. Logo, o aumento na expressão de EGR-1, está intimamente associado à infecção pelo HIV-1 e não se restringe apenas às células U937, uma vez que o aumento de EGR-1 foi também observado em linhagens de células T, CEM e Jurkat infectadas com as cepas de HIV, Bru e IIIb, respectivamente.

Estes exemplos ilustram, portanto, a participação de EGR como mediadora de alguns estímulos que ocorrem nas células após a infecção com diferentes vírus.

2.3 – Interação Vírus / Hospedeiro

Os vírus desenvolveram ao longo da evolução, diferentes mecanismos capazes de permitir-lhes uma evasão ao sistema de defesas do organismo como os interferons e respostas celular e humoral, envolvendo eventos que ocorrem tanto no meio extracelular como intracelular à célula infectada (SMITH *et al.*, 1997). Relatos também demonstram a ocorrência de efeitos mitogênicos desencadeados por infecções virais. Diferentes mecanismos, envolvendo diferentes vírus, constituem parte das estratégias de multiplicação desses vírus, para maior eficiência na replicação viral (SMITH *et al.*, 1997). Alguns exemplos desses mecanismos, envolvendo não apenas os poxvírus, mas diferentes vírus serão discutidos a seguir.

A família *Poxviridae* compreende vírus citocidas e, conforme mencionado anteriormente, são capazes de infectar hospedeiros vertebrados e invertebrados. A

infecção *in vitro* pelos poxvírus é capaz de causar alguns efeitos clássicos como granulação celular, formação de sincícios e formação de células globulosas (BULLER e PALUMBO, 1991). O efeito citopático desencadeado na célula infectada se dá em função do desligamento das funções metabólicas celulares como a síntese proteica e a rápida degradação de mRNAs celulares mediados pelo vírus (BULLER e PALUMBO, 1991).

A compreensão dos mecanismos de interação vírus-célula e patogênese desencadeada pelos poxvírus foi extremamente favorecida após o completo sequenciamento do vírus Vaccínia, amostra Copenhagen, realizado por GOEBEL e colaboradores (1990). Foi possível, a partir desses estudos, identificar um grande número de fases de leitura abertas no genoma viral que possuíam alto grau de similaridade com seqüências de proteínas celulares com função conhecida. Descobriu-se que os poxvírus são capazes de produzir uma série de fatores solúveis que agem fora da célula infectada comprometendo mecanismos de defesa imune do hospedeiro. Uma proteína análoga ao receptor do fator de necrose tumoral (TNF), foi descrita para os vírus “shope fibroma” e Myxoma, membros do gênero *Leporipoxvirus*, e para os vírus Variola e *Poxvirus* bovino, pertencentes ao gênero *Orthopoxvirus*. Esta proteína é capaz de se ligar ao TNF, inibindo a ação do mesmo na célula (SCHREIBER and McFADDEN, 1994; PALUMBO *et al.*, 1994 & UPTON, 1991). Mais recentemente um terceiro análogo de rTNF foi descrito por LOPAREV e colaboradores (1998), e denominado CrmD, o qual é produzido, em quantidades substancialmente menores pelo vírus Cowpox em comparação com o vírus mais virulento Ectromelia (cepa Moscow). CrmD é secretado em células infectadas como complexos "tipo" dissulfeto que se ligam neutralizando TNF e LT α (linfotoxina α). O fato dos ortopoxvírus contêm três, talvez mais, genes que codificam análogos de rTNF, os quais são produzidos em diferentes quantidades e secretados de distintas formas, dão suporte à tese que os poxvírus têm-se adaptado, e estas proteínas fazem parte de uma estratégia que neutralizam os amplos mecanismos de defesa dos hospedeiros (LOPAREV *et al.*, 1998).

Durante a infecção com diferentes poxvírus, polipeptídeos solúveis análogos de receptores para outras citocinas como IL-1 β e Interferons tipos I e II, foram detectados (COLAMONICI, 1995; SYMONS *et al.*, 1995; MOSSMAN *et al.*, 1995; ALCAMI & SMITH, 1995; SPRIGGS *et al.*, 1992 & UPTON, 1992). Em nosso laboratório, atualmente, estão sendo caracterizados os análogos de receptores dos Interferons α e β codificados pelos vírus Cotia e BeAn, além do

análogo de IFN γ R codificado pelo vírus BeAn. Estes análogos de receptores são capazes de se ligar às respectivas citocinas, “seqüestrando” as mesmas, e impedindo dessa forma que se liguem aos verdadeiros receptores celulares e exerçam seus papéis fisiológicos.

Relatos também mostram que o vírus Vaccinia codifica ainda um grupo de proteínas secretadas análogas a componentes do sistema complemento a exemplo do análogo de receptor da proteína C4b, o qual compete com o receptor próprio, paralisando a cascata do complemento. Desta forma os poxvírus anulam parcialmente os mecanismos imune não-específicos, como o sistema complemento, a ação dos interferons e a resposta inflamatória, mecanismos estes que são rapidamente induzidos e constituem a primeira resposta do hospedeiro contra a infecção (SMITH, 1993; PALUMBO *et al.*, 1994).

Os exemplos acima mostram a atuação de análogos virais detectados antes da infecção, ou seja eventos extracelulares. No entanto, os poxvírus desenvolveram também mecanismos capazes de interferir com eventos intracelulares desencadeados por citocinas. O IFN γ está implicado na defesa do organismo contra a infecção pelo VV (MULLER *et al.*, 1994), sendo que o vírus desenvolveu mecanismos para neutralizar a ação do IFN dentro da célula, tais como: a proteína VV E3L, a qual se liga competitivamente ao RNA dupla fita (dsRNA) impedindo assim que a proteína-quinase dependente de dsRNA (PKR) seja ativada (CHANG *et al.*, 1992). Além dessa, a proteína VV K3L tem similaridade com o fator de iniciação de síntese proteica de eucarioto (eIF-2 α), o qual é substrato para a PKR. A proteína VV E3L ao se ligar à PKR, impede que a mesma fosforile o eIF-2 α (Forma inativada) e conseqüentemente não há interrupção da síntese proteica celular, contribuindo portanto, à virulência do VV (BEATTIE *et al.*, 1991).

As serinas-proteases exercem importante papel de ativação das respostas inflamatórias e são controladas negativamente pelas serpinas celulares. Vários poxvírus são capazes de codificar proteínas análogas às serpinas. A presença desses análogos virais é capaz de impedir a ação ativadora da resposta inflamatória desencadeada pelas serinas-proteases (BULLER e PALUMBO, 1991).

Os poxvírus também desenvolveram mecanismos capazes de induzir eventos proliferativos celulares, codificando proteínas análogas- a fatores de crescimento celulares. 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 Vaccínia essa proteína, designada como fator de crescimento do vírus Vaccínia (**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). KIM e colaboradores, 1995, demonstraram que a adição tanto de VGF purificado (fator de crescimento do VV), quanto a própria infecção com o VV são capazes de promover a ativação da fosfolipase C, via fosforilação nos resíduos de tirosina, a qual, conforme mencionado anteriormente, catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol, gerando os segundos mensageiros diacilglicerol e inositol trifosfato. O mesmo fenômeno não foi observado após a infecção utilizando um mutante deletado para o gene VGF. Os dados também mostram que os resíduos de tirosina fosforilados pelo VGF são idênticos àqueles fosforilados pelo fator de crescimento celular EGF em células A431 (Carcinoma epidermóide) (KIM *et al.*, 1995).

Duas hipóteses têm sido sugeridas para o papel funcional do VGF: a primeira presume a existência de uma forma de VGF de membrana que seria utilizada para a adsorção do vírus à célula hospedeira (EPPSTEIN *et al.*, 1985). A segunda, e mais aceita, postula que o VGF, uma vez secretado no sobrenadante, estimula o crescimento e/ou a atividade metabólica das células não infectadas adjacentes, favorecendo, dessa forma, a expansão da infecção (BULLER *et al.*, 1988_a e 1988_b; STROOBANT *et al.*, 1985). Em última instância, 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 (2000), 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 as células independente de VGF.

Além dos poxvírus, mecanismos semelhantes para outros vírus, envolvendo estratégias de replicação têm sido descritos e também se referem a tais fenômenos como 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 & 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, como dito anteriormente, está associado com proliferação e diferenciação celulares.

A infecção com HCMV é capaz de ativar a transcrição dos proto-oncogenes *c-fos*, *c-jun* e *c-myc*. Nem mesmo a inativação da infectividade viral com irradiação ultravioleta ou a utilização de drogas que sabidamente reduzem ou eliminam a detecção de antígenos virais precoces, como cicloheximida e anisomicina, afetaram a indução desses proto-oncogenes pelo vírus (BOLDOGH *et al.*, 1990).

De maneira semelhante, a infecção com o papilomavírus humano (HPV) é capaz de induzir a transcrição e amplificação de DNA em queratinócitos. Como nestas células o ciclo celular pode levar dias e até semanas e a síntese de DNA viral requer a participação de enzimas de replicação de DNA do hospedeiro, o HPV “desenvolveu” um mecanismo capaz de reativar genes do hospedeiro essenciais à sua replicação, envolvendo a proteína E7, facilitando assim sua replicação em células diferenciadas e quiescentes (CHENG, *et al.*, 1995).

O ciclo de divisão celular é regulado por um número de fatores, os quais vão sofrer alterações pós-traducionais, promovendo a entrada das células em síntese de DNA, que é a entrada no período S do ciclo com posterior mitose ou a “caminharem” para a apoptose. A proteína do retinoblastoma (pRB) é uma proteína da família das supressoras de tumor e apresenta um papel crucial na progressão do ciclo celular. Esta proteína é alvo de CDK4/6 (quinase dependente de ciclina) e se for fosforilada por CDK se desliga de E2F, o qual é uma família de fatores de transcrição que, uma vez estando livre de pRB, ativam genes cujos produtos estão diretamente envolvidos com a passagem do ciclo celular da fase G0/G1 (quiescência) para a fase S (síntese de DNA) (Figura 1C). A proteína p53, é também da família das proteínas supressoras de tumor, embora com um mecanismo diferente daquele observado para pRB. A p53 é capaz de induzir apoptose toda vez que a célula sofrer algum dano na estrutura do DNA (FRIDOVICH-KEIL, *et al.*, 1990).

As proteínas E6 e E7 do HPV apresentam também capacidade induzir efeitos como imortalização e transformação celulares. Estudos indicam que E6 do HPV pode atuar na degradação de p53. Com a degradação de p53 e conseqüente inibição da apoptose, pelo vírus, as alterações/mutações no DNA vão sendo acumuladas, culminando com a transformação celular. Outros estudos com a proteína E7 demonstram que esta tem capacidade de se ligar à proteína também

supressora de tumor pRB. Esta proteína, conforme dito acima, em um estado hipofosforilado, pode se ligar e bloquear fatores de transcrição da família E2F, cujos produtos são fundamentais para que a célula saia da fase G0/G1 (quiescência) e entre na fase S do ciclo celular (síntese de DNA). Se ligando a pRB, a proteína E7 do HPV teria o papel de impedir que a mesma “sequestre” o fator de transcrição E2F, de forma que as células se proliferem continuamente (LOCHMULLER, *et al.*, 1999; QUEIMADO, 1999; KASTNER,1998; ACHIM,1997).

ANDRADE (1999) estudando o efeito da infecção pelo VV na expressão do mRNA do gene regulado por IFN- γ p21^{WAF1/CIP1}, (inibidor de proteína quinase dependente de ciclina-CDK), demonstrou que o vírus regula negativamente a expressão do gene, assim como a ligação de STAT-1 no promotor do gene, o que deve favorecer a progressão do ciclo celular, facilitando assim, a multiplicação viral.

Em suma, os dados acima confirmam que, além de poxvírus, muitos outros vírus senão todos, durante a infecção, e como parte de suas estratégias de replicação, desenvolveram mecanismos os quais estão certamente associados com ativação de genes e/ou fatores reguladores transcripcionais envolvidos com a mitogênese e/ou diferenciação celulares.

A ocorrência desses e de muitos outros mecanismos virais provavelmente têm sido adquiridos em função da “íntima” relação parasitária intracelular dos vírus com as células e/ou organismos hospedeiros, culminando num processo de coevolução. Nesse contexto, para os diferentes vírus e diferentes sistemas hospedeiros, muitos outros mecanismos e vias de sinalizações celulares induzidas em resposta à infecção ainda aguardam elucidações.

3 - RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Diferentemente das bactérias ou fungos a geração de uma nova progênie de vírus é altamente dependente das condições fisiológicas da célula hospedeira, uma vez que estes microrganismos têm limitada capacidade codificadora gênica. Portanto, a energia, os precursores metabólicos e a maquinaria enzimática necessária à multiplicação vírica precisam ser fornecidos pelo hospedeiro. Desta forma, a interação vírus-hospedeiro, em nível celular é caracterizada pelas alterações morfológicas, estruturais, funcionais e bioquímicas, evidenciadas pelos diferentes efeitos citopáticos observados. Dentre eles, podemos citar: lise celular, formação de sincícios, formação de corpúsculos de inclusão, alterações no número de cromossomos, transformação celulares, entre outras (KNIPE, 1990). Com a finalidade de maximizar os recursos para a 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. Assim, processos como estimulação mitogênica celular, inibição de apoptose e indução de diferenciação celulares são estratégias comumente utilizadas por diversos vírus.

Como ilustração podemos citar: o produto do gene BHFR-1 do herpesvírus Epstein Barr que é análogo à proteína celular bcl-2 e que tem função anti apoptótica (DAWSON *et.al*, 1995); e o bloqueio da síntese do inibidor de kinase dependente de ciclina p21WAF exercido pela proteína HBx de HBV, que promove a progressão do ciclo celular (BENN e SCHNEIDER, 1995). Com relação à estimulação mitogênica destacamos: a secreção de VGF pelo VV que exerce este efeito promovendo a expansão da infecção (BULLER *et al.*, 1985, TWARDZIK *et al.*, 1985); a indução do proto-oncogene *c-fos*, reconhecidamente associado com proliferação e diferenciação celulares, é comumente utilizada pelos vírus citomegalovírus (BOLDOGH *et al.*, 1990), Epstein-Barr (FLEMINGTON e SPECK, 1990), HTLV-I (FUJITA e H. SHIKU, 1995; FUJII *et al.*, 1995), HBV (NATOLI, *et al.*, 1995) e adenovírus (SU *et al.*, 1995), dentre outros.

Em nosso laboratório observamos a rápida indução do gene *c-fos* após a infecção com VV. O mRNA de *c-fos* em células infectadas com VV é evidenciado após 10 minutos, com pico de expressão aos 30 minutos e voltando a níveis basais em 60 minutos (Dissertação de Mestrado José Carlos Magalhães, 1997). Como a expressão de *c-fos* antecede a expressão de outros genes envolvidos com mitogênese, seria interessante analisar também a participação do gene EGR-1.

Desta forma, poderia se caracterizar um programa co-estimulatório de genes envolvidos com mitogênese, o qual seria ativado precocemente em resposta à infecção pelo VV.

Sabendo-se que a indução de *c-fos* pelo VV ocorre via ativação da sequência SRE existente no promotor do gene (Dissertação de Mestrado José Carlos Magalhães, 1997), sequência esta também encontrada no promotor do gene EGR (McMALTHON e MONROE, 1995; RUPPRECHT. *et al.*, 1994), resolvemos então analisar a expressão deste gene após a infecção celular pelo VV.

Outro aspecto relevante a se considerar na análise da eventual indução de EGR pelo VV é que a proteína EGR desempenha papel regulatório importante na infecção celular causada pelos vírus da família herpes, tais como: vírus herpes simples (HSV), vírus Epstein Barr (EBV) e citomegalovírus (CMV), além dos vírus HTLV-I/II e vírus da hepatite B (HBV). Como já descrevemos mais detalhadamente na introdução desta dissertação, as relações entre EGR e estes vírus, farei a seguir uma descrição mais sucinta.

A indução à latência, comum aos vírus da família herpes, envolve a transcrição de mensageiros específicos denominados LAT. A reativação da infecção, portanto, implica na desativação dos genes LAT. Em HSV-I, a região promotora de LAT possui um sítio para ligação de EGR. A ocupação deste sítio pela EGR impede que a proteína ativadora transcricional TBP se ligue ao sítio TATA, o qual se posiciona adjacente ao sítio de EGR. Desta forma, EGR bloqueia a transcrição dos genes LAT, reativando a multiplicação viral (TATAROWICZ *et al.*, 1997).

A infecção experimental de linfócitos B com o EBV também promove aumento de EGR, minutos após a infecção (CALOGERO *et al.*, 1996). Por outro lado, a infecção celular pelo CMV promove aumento transcricional de TGF decorrente da interação das proteínas IE2 de CMV e EGR (YOO *et al.*, 1996). Mecanismo semelhante e envolvendo também TGF- β , é utilizado pelo HBV, cuja proteína HBx interage com EGR para promover também a transcrição de outros genes precoces (YOO *et al.*, 1996).

Os vírus HTLV-I e II, por sua vez, tornam constitutiva a expressão de EGR via transativação mediada pela proteína Tax. A expressão desregulada de EGR deve contribuir para o descontrole da divisão celular e conseqüente transformação associada (SAKAMOTO *et al.*, 1992).

Assim a ativação múltipla de 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 progênies virais.

4 – OBJETIVOS

4.1 - Objetivo geral

Analisar a expressão do gene de resposta precoce ao crescimento (EGR-1) após infecção celular com o vírus Vaccínia.

4.2 - Objetivos específicos

- Determinar a cinética de expressão do mRNA do gene EGR-1, após infecção celular pelo vírus Vaccínia e seu mutante VGF⁻
- Analisar o efeito da multiplicidade de infecção (m.o.i.) na indução de EGR-1 em células infectadas pelo VV.
- Analisar o efeito da inativação da partícula vírica na indução da expressão de EGR-1 infectadas pelo VV.
- Analisar o efeito de diferentes inibidores de proteínas quinases na expressão do gene EGR-1, em resposta à infecção pelo VV.
- Analisar a participação do elemento regulatório AP-1, na indução da expressão de EGR-1 em células infectadas pelo VV, assim como a participação da proteína FOS, neste complexo.
- Analisar a participação do elemento regulatório SRE, na indução da expressão de EGR-1 em células infectadas pelo VV, assim como a participação da proteína SRF, neste complexo AP-1.

5 - MATERIAL E MÉTODOS

5.1 - CÉLULAS

5.1.1 - Células 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 nº 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 do vírus Vaccínia (VV) e para sua titulação.

5.1.2 - Células A31

As células A31, clone derivado de fibroblasto de camundongo Balb/c 3T3, foram utilizadas para analisar a indução e expressão do gene EGR-1, assim como dos extratos proteicos, após a infecção com o vírus Vaccínia. A linhagem foi mantida em meio DMEM, suplementado com 7% de SFB e antibióticos (Gentamicina 40µg/ml, Penicilina 200 U/ml, Fungizona 1,5µg/ml). Estas células foram gentilmente cedidas pela Dra M.C.S. Sogayar do Departamento de Bioquímica da USP.

5.2 - O VÍRUS VACCÍNIA

O vírus Vaccínia WR (Western Reserve) foi cedido pelo Dr C. Jungwirth (Universität Würzburg, Germany). O vírus, foi multiplicado em células Vero com aproximadamente 95% de confluência, estas foram infectadas com o VV, utilizando-se a multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 0,01 com meio sem soro por 1 hora para a adsorção do vírus. Após adsorção, o inóculo foi removido e substituído por meio suplementado com 1% SFB e as células mantidas à 37° sendo observadas ao microscópio óptico até 90% de efeito citopático (E.P.C.), quando foram lavadas com PBS 1X, coletadas e congeladas para posterior purificação.

A purificação ocorreu 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 ressuspensionado em tampão Tris-HCl 10mM, pH 8,0, e submetido à 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 vírions (partículas virais completas e infectivas), 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, ressuspensionado no mesmo tampão, aliquotado e congelado a -70°C.

A titulação do estoque de vírus obtido, foi realizada de acordo com o método descrito por CAMPOS E KROON (1993). Brevemente, as células foram crescidas por 10 a 16 horas em meio MEM contendo 5% SFB, sendo $1,5 \times 10^6$ células/câmara (9,6 cm² de área). 200 µl de uma série de diferentes diluições, realizadas na razão de 10, da suspensão contendo o vírus a ser titulado, foram inoculadas às culturas recém confluídas, sendo uma falsamente infectada mantida como controle celular. Após 1 hora de adsorção, o meio de inóculo foi removido e meio MEM contendo 1% de SFB adicionado. A revelação foi realizada 48 horas pós-infecção através da fixação das culturas com formaldeído a 10% em PBS e coloração com solução 1 % (p/v) de cristal violeta em PBS1x. 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 - TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

A bactéria *Escherichia coli* competente estocada em freezer -70°C foram descongeladas em banho de gelo por 30 minutos. Em tubos plásticos tipo Eppendorfs (1,5 ml) foram adicionados 100µl da bactéria competente à 50 A 100 ng de DNA e imediatamente incubada em gelo por 30 minutos. Após esse tempo foi feito o choque térmico incubando-se a reação a 42°C por 2 minutos e

novamente em gelo por 30 segundos. Então, foi adicionado 1 ml de meio LB 1X (0,5% p/v de extrato de levedura; 0,1% p/v triptona; 0,5% p/v NaCl; pH ajustado para 7,5 com solução 2N de NaOH) sem antibióticos e incubado a 37°C por 60 minutos. As bactérias foram sedimentadas em microcentrífuga, e ressuspensas em 100µl de meio LB 1X e um volume de 10 e 90µl foi semeado em placas de Petri contendo LB ágar (LB 1X; 1,5%p/v ágar) acrescido de 100µg/ml de ampicilina. As placas foram incubadas em estufa 37°C por 16h. Em seguida o número de colônias foi contado e algumas colônias escolhidas, crescidas em 5ml de LB 1X a 37°C por 16h, quando o DNA plasmidial foi extraído e digerido com enzimas de restrição para confirmação do tamanho molecular esperado..

5.4 - EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

5.4.1 - Preparação em pequena escala

As bactérias transformadas com o plasmídio de interesse foram inoculadas em 6mL de meio LB 1x contendo 100ug/mL de ampicilina e incubado durante 16hs a 37°C sob agitação a 180 rpm.

Após incubação, 3 a 5 mL da cultura bacteriana foram centrifugados a 12000 rpm por 30 segundos a 4°C em microcentrífuga (Ependorf 5415C) e o sobrenadante devidamente descartado. O restante da cultura foi conservado a 4°C para eventuais necessidades. O sedimento bacteriano obtido após a centrifugação foi então utilizado para a extração do DNA plasmidial de acordo com o Kit “Wizard plus minipreps DNA purification system” (Promega, USA)

5.4.2 - Preparação em larga escala (BIRNBOIM & DOLY, 1979)

Para a preparação plasmidial em larga escala, foram inoculados 5mL de uma cultura de bactérias transformadas com o plasmídio de interesse em 500 mL de meio LB1x suplementado com 100ug/mL de ampicilina. Esta cultura foi incubada a 37°C sob a agitação de 200 rpm por 18h.

As bactérias foram sedimentadas por centrifugação durante 10 minutos a 3200g a 4°C em centrífuga Sorvall RC-5B (Rotor GS-3) e o precipitado ressuspenso em 20mL de tampão GTE contendo 0.1g (p/v) de lisozima e incubado à temperatura ambiente por 25 min. Foram então adicionados 40mL de solução contendo 0,2M NaOH e 1% (p/v) SDS, preparados no momento do uso, homogeneizado e incubado em banho de gelo durante 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 20mL de 3M acetato de potássio (KOAc), 5M ácido acético pH 4.8 gelado à solução, a qual foi homogeneizada, e novamente incubada em banho de gelo por 15 minutos.

A mistura foi, então, centrifugada a 3800g e 4°C por 10 minutos em centrífuga Sorvall RC-5B (Rotor GS-3) e, em seguida, filtrada em gaze hidrófila. Ao filtrado foi adicionado 0,7 volume de álcool isopropílico (Merck, Darmstadt, RFA), o tubo foi mantido à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugado a 3800g durante 20 minutos a 4°C em centrífuga Sorvall RC-5B (Rotor GS-3). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 10mL de TE pH 8,0 e transferido para tubo cônico com capacidade para 50mL contendo 8.6g de cloreto de cério (GIBCO BRL, USA).

Após a homogeneização, a solução foi transferida para tubos de ultracentrifugação com capacidade para 18,5mL (Sorvall-Komb, Wilmington, USA.), os quais foram acrescentados de 54 ug/mL de brometo de etídio. Os tubos foram equilibrados com solução de cloreto de cério (4,3g diluídos em 4.0 mL de ddH₂O), lacrados em aparelho selador (Crimper, Sorvall, Delaware, E.U.A.) e então centrifugados a 243000g por 18h em ultracentrífuga Sorvall (Rotor TV-865B).

O DNA do plasmídio, após o bandeamento isopícnico (em gradiente de CsCl), foi visualizado com luz ultravioleta manual (366 nm), coletado com auxílio de agulha 40x12 acoplada em seringa plástica descartável de 10mL e transferido para tubo cônico com capacidade de 15mL.

Ao DNA coletado foi adicionado 1/3 do volume de 2-butanol e após agitação, a solução foi centrifugada por 15 segundos a 500g, desprezando-se a fase superior contendo 2-butanol e brometo de etídio. Esta etapa foi realizada repetidamente até que a fase inferior ficasse isenta de brometo de etídio, quando foi coletada em tubo Corex com capacidade 30mL e o volume completado para 10 mL com ddH₂O estéril.

A precipitação do DNA foi realizada pela adição de 0,3 M de acetato de sódio pH 5,5 e 2 volumes (20mL) de álcool etílico absoluto seguida de homogeneização e incubação a -20°C por 1 hora. O DNA precipitado foi recuperado após centrifugação a 3300g durante 30 minutos a 4°C em centrífuga Sorvall RC-5B (Rotor GS-3).

O DNA precipitado foi solubilizado em 500ul de TE pH 8,0 e sua concentração foi determinada por espectrofotometria a A_{260nm} (espectrofotômetro Graphicord-Shimadzu), onde cada DO equivale a 50ug/mL de DNA dupla fita. (SAMBROOK *et al.*, 1989).

5.5 - SONDAS MOLECULARES

5.5.1 - 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, Tennessee, USA e foi utilizado como sonda nos experimentos de hibridização com RNA celular total (Transferência de “Northern”). Este plasmídeo foi amplificado, purificado e estocado, segundo técnicas anteriormente descritas (3.3 e 3.4)

5.5.2 - GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e Oligonucleotídeo 18S

Para controle da quantidade de RNA aplicada nas canaletas, durante os experimentos envolvendo transferência de “Northern”, além da prévia quantificação em espectrofotômetro, foi investigada também a expressão do RNA mensageiro correspondente a GAPDH ou do RNA ribossomal 18S. A sonda, correspondente ao cDNA (1,4 Kb) de GAPDH clonado no sítio Pst I do plasmídeo pGEM-3, foi gentilmente cedida pelo Dr Jan Vilcek, New York University Medical Center, New York, USA. O Oligonucleotídeo correspondente ao rRNA 18S humano, cuja sequência é complementar à sequência do gene na posição 1471 a 1550, foi sintetizado por Med Probe AS, (Suíça) e purificado através de eletroforese em gel de poliacrilamida.

5.5.3 - Oligonucleotídeo SRE

Conforme mencionado anteriormente o gene EGR contém em seu promotor sequências repetidas correspondentes ao SRE (RUPPRECHT *et al.*, 1994; CHRISTY e NATHANS, 1989), logo, utilizamos um oligonucleotídeo sintético que corresponde a este elemento regulatório em experimentos de retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA) em gel de poliacrilamida, podendo assim verificar eventuais ligações protéicas a esta sequência de DNA, influenciando a indução de EGR-1 após infecção celular com o vírus Vaccínia, ou tratamento com SFB 10%. O oligonucleotídeo correspondente ao DNA SRE (5' AATTCGGGATGTCCATATTAGGACATCTGCA3'), bem como sua sequência complementar, foram sintetizados pela GIBCO-BRL, USA.

5.5.4 - Oligonucleotídeo AP-1

Da mesma forma que SRE o gene EGR também contém em seu promotor a sequência que corresponde ao elemento AP-1 (RUPPRECHT *et al.*, 1994; CHRISTY e NATHANS, 1989), sendo assim, utilizamos um oligonucleotídeo sintético deste elemento em ensaios do retardamento da mobilidade eletroforética, o que nos permitiu analisar o seu envolvimento na indução de EGR-1 após a infecção pelo VV. O oligonucleotídeo correspondente ao DNA do elemento AP-1 (5' AAGCATGACTCACTCAGG 3') foi gentilmente cedido pelo Dr Frank Rausher III.

5.5.5 - Marcação isotópica das sondas moleculares

As sondas de EGR-1 e GAPDH foram marcadas radioativamente utilizando-se [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP (Amersham Pharmacia, USA) como radioisótopo, com atividade específica de 3000 Ci/mmol, de acordo com o Kit *Rediprime* (Random Primer Labelling), Amersham Life Science, UK. Resumidamente, 2,5 a 50 ng de DNA foram diluídos em 45 μl de ddH₂O autoclavada e desnaturado por 5 minutos à 96^o C, quando foi então adicionado à mistura de marcação contendo (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^o C. A reação foi interrompida pela adição de 5 μl de EDTA 0,2M ou 50 μl de T.E. pH 8,0 (25mM Tris-HCl pH8,0; 1mM EDTA).

As sondas após marcação foram purificadas através de cromatografia de filtração em coluna Sephadex G-50 (Sigma, USA) e eluídas em T.E pH 8,0. Uma alíquota

de 1µl da sonda foi utilizada para leitura da radioatividade incorporada em contador de cintilação líquida (Rack Beta 1214 LKB, EUA) e calculada a sua atividade específica (cpm/µg de DNA).

Os oligonucleotídeos SRE e AP-1 foram pareados, para então serem marcados isotopicamente. Resumidamente, 5µg do oligonucleotídeo em cada uma das orientações (5' ⇒ 3' e 3' ⇒ 5') foram acrescidos de 10µl 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 ddH₂O para 100µl, de forma que a concentração final de DNA seja de 100ng/µl. Utilizando-se termociclador (Perkin Elmer Cetus 4800), a reação foi submetida a 88°C por 2 minutos, 65°C por 10 minutos, 37°C por 10 minutos e, por fim, 5 minutos à temperatura ambiente. Após o pareamento os oligonucleotídeos foram estocados a 4°C.

A marcação isotópica foi realizada utilizando-se como nucleotídeo radioativo [γ ³²P] ATP 3000 Ci/mmol (Amersham Pharmacia Biotech, USA). Resumidamente, em um tubo de microcentrífuga de 1500µl adicionaram-se 2µl de oligonucleotídeo pareado (200ng), 1µl de polionucleotídeo quinase PNK 10u/µl (Promega, USA); 2µl de Tampão PNK 10X (Promega, USA) e 4µl de [γ ³²P] ATP. O volume da reação foi completado para 20 µl com ddH₂O, procedendo-se incubação a 37°C por 60 minutos. Após, o volume foi acrescido de 60 µl de água 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-25 (Pharmacia LKB, Suíça), e eluída em ddH₂O. Uma alíquota de 1 µl da sonda foi utilizada para leitura da radioatividade incorporada em contador de cintilação líquida (Rack Beta 1214 LKB, E.U.A.) 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. A reação de marcação foi feita com 5 pmoles de oligonucleotídeo (Med Probe AS, Suíça), 5µl de [γ ³²P] ATP 3000Ci/mmol (Amershan, Inglaterra), 2,5µl Tampão PNK 10X (Promega, USA), 1 µl de PNK 10u/µl (Promega, USA) e ddH₂O q.s.p. 25µl. A reação foi então incubada por uma hora à 37°C. A sonda foi purificada através de cromatografia de filtração em coluna Sephadex G-25, e eluída em ddH₂O sendo uma alíquota de 1 µl da sonda

utilizada para leitura da radioatividade incorporada em contador de cintilação líquida (Rack Beta 1214 LKB, E.U.A.) e calculada a sua atividade específica (cpm/ μ g de DNA), (SAMBROOK *et al*, 1989).

5.6 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE PRECOCE *EGR-1*.

5.6.1 - 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 0,5% de SFB por 36 horas, sendo então tratadas ou não com diferentes drogas e infectadas com o VV. Após diferentes tempos as células foram coletadas e processadas de acordo com o método de CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987) com algumas modificações. Resumidamente, as culturas foram lavadas duas vezes em PBS e adicionadas de 2 mL/garrafa (80cm² 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 homogeneizadas em seguida, utilizando-se pipetas de Pasteur, sendo os fluídos transferidos para tubos Eppendorfs previamente adicionados de 10% v/v de clorofórmio. A mistura foi então homogeneizada em vórtex, 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 por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (superior) foi então coletada e transferida para novo tubo Eppendorf. O RNA foi precipitado através da adição de igual volume de isopropanol, com incubação a -70°C por 45 minutos ou -20°C por 18 horas e centrifugação a 13.500 rpm por 30 minutos a 4°C. O sedimento (RNA) obtido foi lavado 2 vezes com etanol 75 %, seco à temperatura ambiente por aproximadamente 20 min e re-solubilizado em ddH₂O Depec (H₂O deionizada tratada com 0,005% de dietil pirocarbonato por 12 horas, a 4°C e autoclavado por 45 minutos para evaporar o depec). O RNA foi quantificado por espectrofotometria a 260nm, onde cada DO equivale a 40 μ g/mL, e estocado a -70°C.

5.6.2 - Fracionamento eletroforético dos RNAs (Sambrook et al, 1989)

15 µg de RNA total/amostra foram submetidos ao fracionamento eletroforético em gel desnaturante contendo 1,5% p/v de agarose (Gibco BRL); 2,2M de formaldeído a 37% (Merck) em tampão MOPS [40mM de ácido-morfolino-propano-sulfônico (Sigma), 10mM de acetato de sódio e 1mM de EDTA, pH 7,0]. Imediatamente antes da corrida, as amostras foram desnaturadas pela adição de 50% p/v de formamida (Gibco BRL); 15% v/v de formaldeído e 10% 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 60V durante 60 a 90 minutos. Em seguida, o gel contendo o RNA foi corado em solução aquosa de brometo de etídio (0,5µg/ml) por 5 minutos e fotografado sob iluminação ultravioleta (320nm). Confirmada a integridade do RNA, o excesso de formaldeído foi lavado, e o RNA transferido para a membrana de nylon

5.6.3 - Transferência de “Northern”

Logo após o fracionamento eletroforético dos RNAs, foram marcadas no gel as posições dos RNAs ribossomais 28S e 18S, procedendo-se então à transferência por capilaridade dos RNAs para membrana de nylon (Hybond N, Amersham, 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 24 h. Após a transferência, a fixação dos RNAs à membrana de nylon foi realizada pela exposição à luz UV (320 nm) por 4 minutos.

5.6.4 - Hibridizações

A diferentes hibridizações foram realizadas de acordo com método descrito por CHURCH & GILBERT (1984). As membranas foram colocadas em tubo de hibridização e pré-hibridizadas por 15 minutos à 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 foram desnaturadas por 5 minutos a

96°C, resfriadas em gelo por 5 min, (com exceção do oligonucleotídeo 18S, que não requer desnaturação), sendo então adicionadas (~10⁶ cpm/mL de solução) à solução contida no tubo (solução de pré-hibridização). O sistema foi incubado a 65°C por um mínimo de 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.

5.7 - INIBIDORES DE PROTEÍNAS QUINASES

Em nosso estudo utilizamos alguns inibidores químicos os quais foram empregados para estudar diferentes proteínas envolvidas nas diferentes vias transdutoras de sinais celulares, principalmente MAPquinases, nos possibilitando assim analisar estas vias e suas eventuais participações na indução de EGR-1 pelo VV.

5.7.1 - H7

O composto C₁₄H₁₇N₃O₂S[1-(5-ISOQUINOLONILSULFONIL)2-METIL-PIPERAZINA] OU H7 (Sigma, USA), foi utilizado como inibidor da cascata sinalizadora, da qual a proteína quinase C (PKC) é integrante (MOORE et al, 1993; XU et al, 1994; BEADLING et al, 1996).

5.7.2 - H89

{N-[2-((p-Bromociannamyl)amino)ethyl]-5isoquinolonesulfonamida 2HCl} ou H89 (Calbiochem-Novabiochem Corporation, USA) é um potente inibidor de proteína quinase A (PKA) Ki = 48nM. Inibe outras serinas/treoninas quinases somente em altas concentrações como por exemplo, caseína quinase > 38,3 µM; PKC > 31,7µM (KAWASAKI, 1998; deROOIJ, 1998; FINDIK, 1995; GEILEN, 1992; CHIJIWA, 1990; COMBEST, 1988).

5.7.3 - Tyrphostin AG-126

[α -Cyano-(3-hydroxy-4nitro) cinnamonitrile], (Calbiochem-Novabiochem Corporation, USA) é inibidor de ERK 1 e 2 (KAN, 1996; NOVOGRODSKY, 1994).

5.7.4 - PD 98059

2'-Amino-3'-methoxyflavone (Calbiochem-Novabiochem Corporation, USA) é um inibidor seletivo e celular permeável de MAP quinase quinase (MEK), age inibindo a ativação de MEK e subsequentemente a fosforilação de seus substratos como p38 e JNK e ERK 1/2 (KÜLTZ, 1998; DUDLEY, 1995; LANGLOIS, 1995; PANG, 1995; WATERS, 1995).

5.7.5 - Ro 31-8220

{3-[1-[3-(Amidionothio) propyl-1H-indol-3-yl]-3-(1-methyl-1H-indol-3-yl) maleimide, bisindolylmaleimide IX, methanesulfonato} (Calbiochem-Novabiochem Corporation, USA). Competitivo e seletivo inibidor de PKC (BELTMAN, 1996; KELLER, 1993; McKENNA e HANSON, 1993; DAVIS, 1992).

5.8 - ANÁLISE DAS INTERAÇÕES DNA/PROTEÍNAS

5.8.1 - Extratos protéicos celulares

Células A31 crescidas em garrafas de 100ml ($\sim 2 \times 10^7$ células) foram carenciadas por 36 horas em meio DMEM suplementado com 0,5% de SFB quando então foram infectadas com VV (m.o.i. 1,0), por diferentes tempos (15 minutos a 5 horas). Para controle positivo e negativo, respectivamente, uma amostra não infectada foi tratada com SFB 10% e outra não recebeu tratamento algum. 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, e 1mM PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto) e 5 μ g/ml aprotinina e 2,5 μ g/ml leupeptina] por 45 minutos no gelo. Os lisados foram clarificados por centrifugação à 4°C, quantificados por espectrofotometria através do “Kit Bio-Rad Assay” (Bio-Rad laboratories USA) e aliqüotados em tubos eppendorfs, (VIEIRA. *et.al.*,1996).

5.8.2 - Análise 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 a sequência que corresponde ao elemento regulatório SRE ou AP-1 existentes no promotor do gene EGR-1 e que responde à estimulação por SFB. O método se baseia na ligação das proteínas a estas sequências sofrendo as mesmas um retardamento na migração eletroforética (EMSA) em relação à sonda livre (não ligada), observando-se diferenças entre o complexos proteína-DNA formados nas células tratadas e aquelas não tratadas. Como controle da especificidade das interações foram feitos ensaios de competição com excesso molar de 50x do oligonucleotídeo específico não marcados (controle homólogo) e também competição com excesso 50x molar de um oligonucleotídeo não relacionado (controle heterólogo).

20µg de proteína total 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 dIdC (Pharmacia LKB, Suécia) (62,5U/ml) e incubado à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, adicionou-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. A mistura foi então deixada à temperatura ambiente por 20 min para interação DNA/proteína.

Nos ensaios de competição, foram adicionados juntamente com o tampão de ligação, excesso de oligonucleotídeos homólogos ou heterólogos não marcados 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.

Os complexos DNA-proteína formados foram resolvidos eletroforicamente em gel nativo de poliácridamida a 6 % [acrilamida/bisacrilamida na relação 29:1 em tampão TBE 0,5X (0,089M Tris-borato; 0.089M 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 revelados posteriormente, utilizando-se revelador e fixador indicados pelo fabricante.

6 - RESULTADOS

▪ *Expressão do gene EGR-1 em células A31 infectadas pelo VV*

Para melhor relacionarmos o efeito proliferativo causado pela infecção pelo VV, analisamos a indução do gene EGR-1 em células A31 infectadas. Este gene, sabidamente, está relacionados com efeitos proliferativos celulares (SUKHATME, 1988).

Células A31 carenciadas por 36 horas com 0,5 % de SFB foram infectadas com o VV WR e após diferentes tempos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 horas) as monocamadas celulares foram coletadas, e o RNA total extraído. O gene foi fortemente induzido pelo VV sendo evidente após 1 hora de infecção, embora sua indução já seja observada 30' pós infecção, e permanece elevado até o maior tempo analisado (9 horas). Claramente, EGR-1 é fortemente induzido e esta indução é prolongada pelo VV, ao contrário do que é observado para o SFB, onde a indução do gene é transiente (CHRISTY e NATHANS, 1989; SUKHATME, 1988; CHAVRIER *et al.*, 1989). (Figura 1).

▪ *Expressão do gene EGR-1 em células A31 infectadas pelo VV deficiente para VGF.*

Também analisamos a participação do fator de crescimento do VV (VGF) na indução da expressão do gene EGR-1. Células A31 carenciadas por 36 horas com 0,5 % de SFB foram infectadas com o VV VGF⁻ e após diferentes tempos (1, 3, 4, 5 e 7 horas) as monocamadas celulares foram coletadas, e o RNA celular total extraído. O gene EGR-1 é fortemente induzido pelo VV VGF⁻, indicando que o VGF não é necessário para a indução do gene EGR-1 pelo VV, ou sua participação é marginal. (Figura 2)

▪ *Efeito da multiplicidade de infecção (m.o.i.) na indução de EGR-1 em células A31 infectadas pelo VV*

A figura 3 mostra a indução de EGR-1 utilizando-se diferentes multiplicidades de infecção (m.o.i.). Células A31 carenciadas por 36 horas com 0,5% SFB foram infectadas com o VV empregando-se as m.o.i. de: 0,001; 0,01; 0,1; 1,0 e 10 UFP/células por 4 horas quando o RNA total foi então extraído.

A indução de EGR-1 foi dependente da multiplicidade de infecção sendo observada com a menor m.o.i. 0,01 e máxima nas multiplicidades de infecção 0,1 e 1,0. Quando utilizamos a multiplicidade de infecção 10,0, a análise da indução de EGR-1 foi comprometida pelo grande dano celular causado pelo VV.

▪ ***Expressão de EGR-1 em células A31 infectadas pelo VV inativado por UV***

Células A31 carenciadas por 36 horas com 0,5% SFB foram infectadas com o VV (m.o.i. 1,0), o qual havia sido previamente inativado por 10 minutos com luz ultra violeta. Após 4 horas de infecção o RNA celular total foi extraído.

Nestas condições a indução de EGR-1 foi totalmente anulada, indicando que a indução do gene EGR-1 é dependente da integridade do DNA viral e de seus genes precoces como podemos observar na figura 4.

▪ ***Influência do inibidor de síntese proteica cicloheximida na expressão de EGR-1 em células A31***

O tratamento prévio das células A31 por 20 minutos com o inibidor de síntese proteica cicloheximida nas concentrações 50 e 100mM foi capaz de inibir completamente a expressão do gene EGR-1 em células infectadas com o VV (Figura 5) ou re-estimuladas com SFB (dado não mostrado), demonstrando que para a indução de EGR-1 pelo VV é necessário síntese de proteínas virais e/ou celulares.

▪ ***Efeito do inibidor H7 na expressão de EGR-1 em células A31***

O tratamento prévio das células A31 por 15 minutos com o inibidor H7 nas concentrações de 10 e 20µM não apresentou alteração na indução do gene após infecção com o VV quando comparado à amostra apenas infectada pelo VV. Entretanto quando usamos 50µM observamos uma acentuada inibição na expressão do gene EGR-1 e quando pré-tratamos as células 15 minutos com 100µM observamos a completa inibição da expressão do gene em células infectadas com o VV (Figura 6) ou re-estimuladas com SFB (dado não mostrado).

▪ ***Efeito de diferentes inibidores proteicos na expressão de EGR-1 em células A31***

Estudos preliminares com diferentes inibidores proteicos, demonstraram que somente o inibidor PD 98059, isto é, inibidor de MEK, foi capaz de inibir significativamente a expressão de EGR-1 pelo VV. Os inibidores de PKA (H89) e de ERK 1 e 2 (AG-126), não apresentaram nenhuma diferença significativa na expressão de EGR-1 em resposta à infecção pelo VV. Entretanto o inibidor de PKC (Ro 318220) aparentemente aumentou o acúmulo de EGR-1.

▪ ***Análise das interações do elemento regulatório AP-1 com proteínas de células A31 infectadas pelo VV.***

Células A31 carenciadas por 36 horas com 0,5% SFB, foram infectadas com o VV. Após diferentes tempos (30, 60, 120, 180, 240 minutos), as proteínas totais foram extraídas e 20 µg de cada amostra foram utilizadas no ensaio do retardamento eletroforético, utilizando como DNA marcado a sequência correspondente a AP-1.

A ligação proteica à sequência AP-1 foi observada somente após 3-4 horas de infecção (Figura 8). Para analisarmos a possível ligação da proteína FOS ao elemento AP-1, utilizamos o anticorpo anti-fos, e verificamos que a proteína FOS participa do complexo DNA/proteína formado após infecção com o VV, uma vez que visualizamos uma banda, a qual foi “super-retardada” pela interação com o anticorpo, caracterizando assim a participação de FOS no complexo DNA-proteína induzido pelo vírus. (Figura 8, canaleta 10)

▪ ***Análise das interações do elemento SRE com proteínas de células A31 infectadas pelo VV.***

Células A31 carenciadas por 36 horas com 0,5% SFB, foram infectadas com o VV. Após diferentes tempos (60, 120, 150, 180, 270 minutos), as proteínas totais foram extraídas e 20 µg de cada amostra foram utilizadas no ensaio do retardamento eletroforético, utilizando-se como DNA marcado o elemento regulatório SRE do gene EGR-1.

A cinética de ligação proteica ao elemento SRE que observamos foi visualizada 120 minutos após a infecção, aumentando gradativamente até o maior tempo analisado, 270 minutos pós infecção. (Figura 9)

Para analisarmos a possível ligação da proteína SRF ao elemento SRE, utilizamos o anticorpo anti-SRF, e verificamos que a proteína SRF está presente no complexo DNA/proteína formado, uma vez que a pré incubação com o anticorpo reduz significativamente banda referente ao complexo DNA/proteína, (Figura 8, canaleta 9).

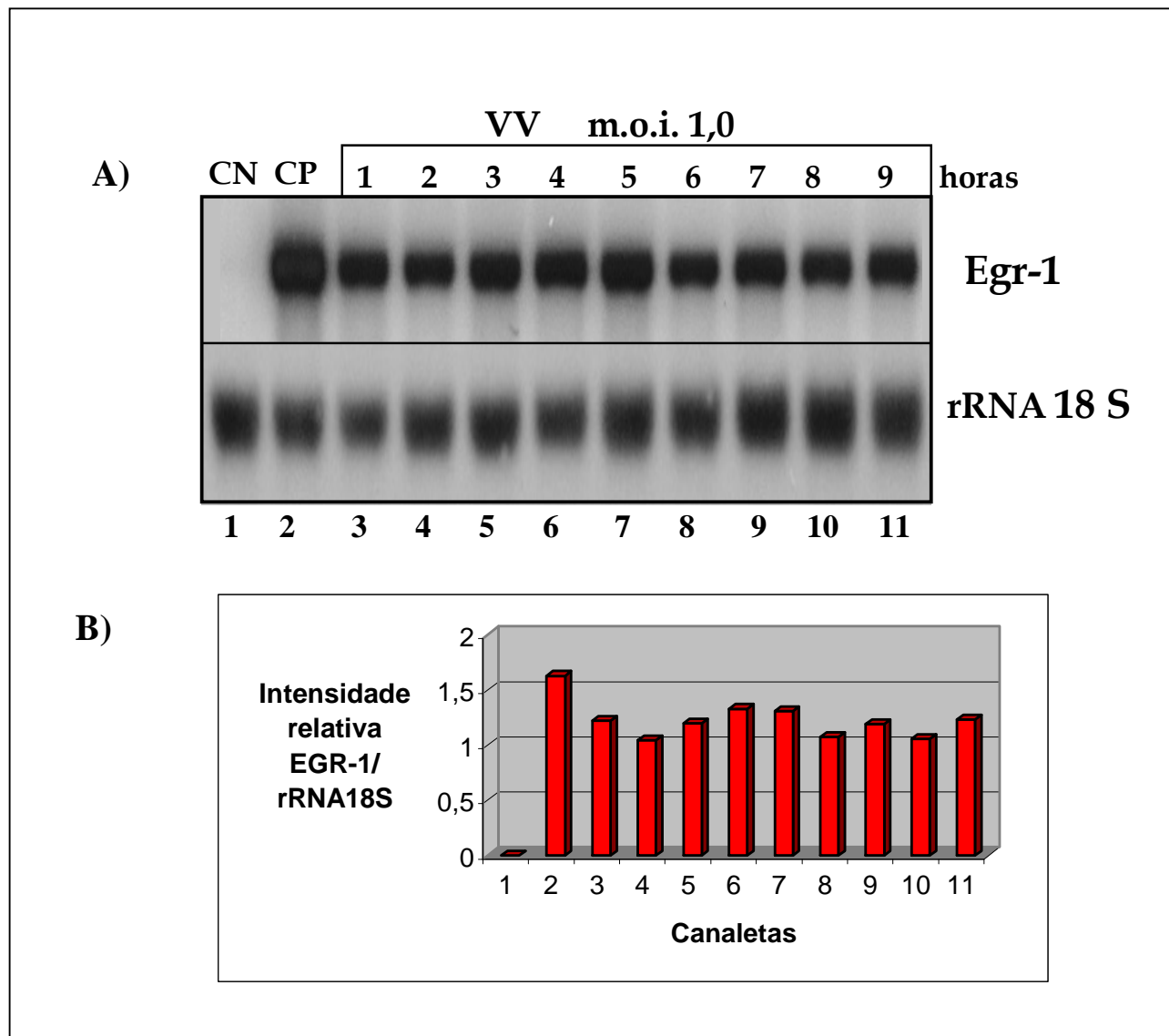


Figura 1: Expressão do gene EGR-1 em células A31 infectadas pelo VV. As células foram crescidas em DMEM suplementado com 10 % de SFB até atingirem 90 % de confluência quando foram carenciadas no mesmo meio contendo 0,5% de SFB por 36 horas. As células foram então infectadas com VV (m.o.i.: 1,0) pelos tempos indicados e coletadas para a extração do RNA total. (A) 15mg do 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 apenas carenciadas e células tratadas com 10% SFB por 30 minutos foram utilizadas como controles negativo (CN) e positivo (CP), respectivamente. O controle da quantidade de RNA nas diferentes canaletas, foi realizado utilizando-se sonda para o rRNA 18S. (B) Gráfico do traçado densitométrico dos mRNAs considerado como intensidade relativa pois, utilizou-se como parâmetro a razão entre as intensidades das bandas dos genes EGR-1 e 18S.

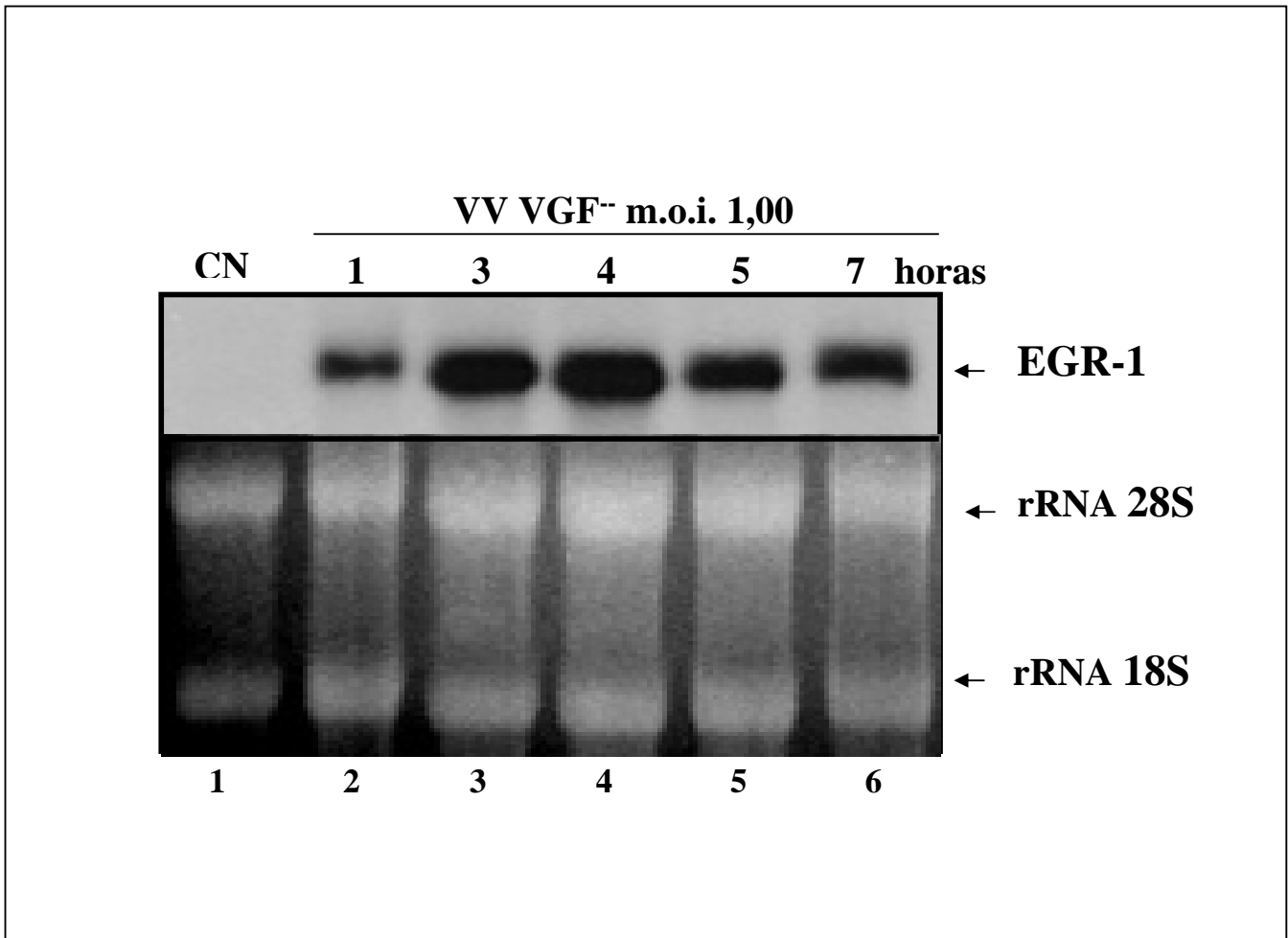


Figura 2: Expressão do gene EGR-1 em células A31 infectadas pelo VV VGF⁻. As células foram crescidas em DMEM suplementado com 10 % de SFB até atingirem 90 % de confluência quando foram carenciadas no mesmo meio contendo 0,5% de SFB por 36 horas. As células foram então infectadas com VV VGF⁻ (m.o.i.: 1,0) pelos tempos indicados e coletadas para a extração do RNA total. 15µg do 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). Células apenas carenciadas e células tratadas com 10% SFB por 30 minutos foram utilizadas como controles negativo (CN) e positivo (CP), respectivamente. O controle da quantidade de RNA nas diferentes canaletas, foi realizado utilizando como referência os rRNAs 18 e 28S, após o gel ser corado com Brometo de Etídio e fotografado.

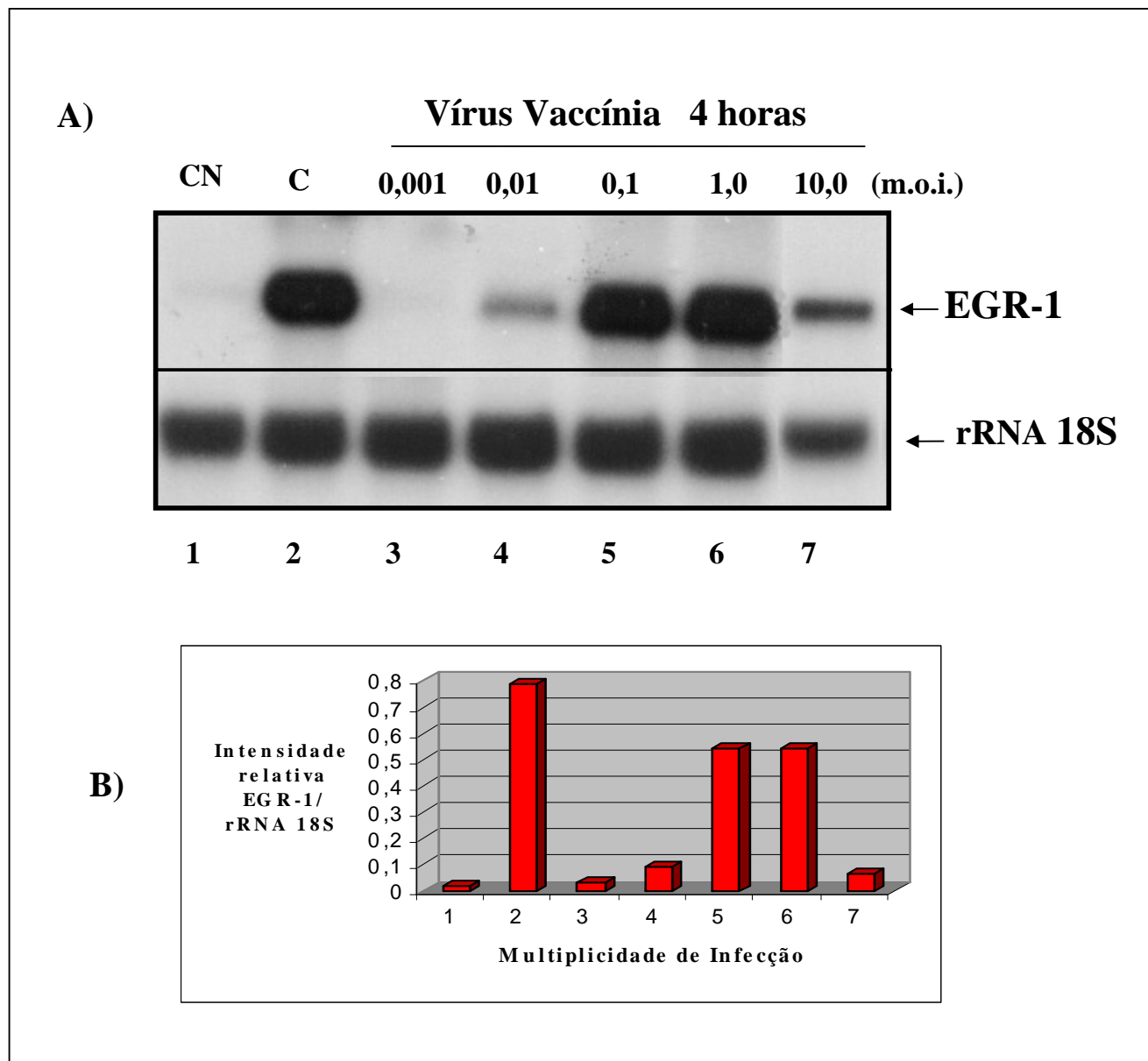


Figura 3: Efeito da multiplicidade de infecção na indução do gene EGR-1. As células foram crescidas em DMEM suplementado com 10 % de SFB até atingirem 90 % de confluência quando foram carenciadas no mesmo meio contendo 0,5% de SFB por 36 horas. As células foram então infectadas com VV com diferentes m.o.i. por 4 horas e coletadas para a extração do RNA total. (A) 15µg do 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). Células apenas carenciadas e células tratadas com 10% SFB por 30 minutos foram utilizadas como controles negativo (CN) e positivo (CP), respectivamente. O controle da quantidade de RNA nas diferentes canaletas, foi realizado utilizando-se sonda para o rRNA 18S. (B) Gráfico do traçado densitométrico dos mRNAs considerado como intensidade relativa pois, utilizou-se como parâmetro a razão entre as intensidades das bandas dos genes EGR-1 e 18S.

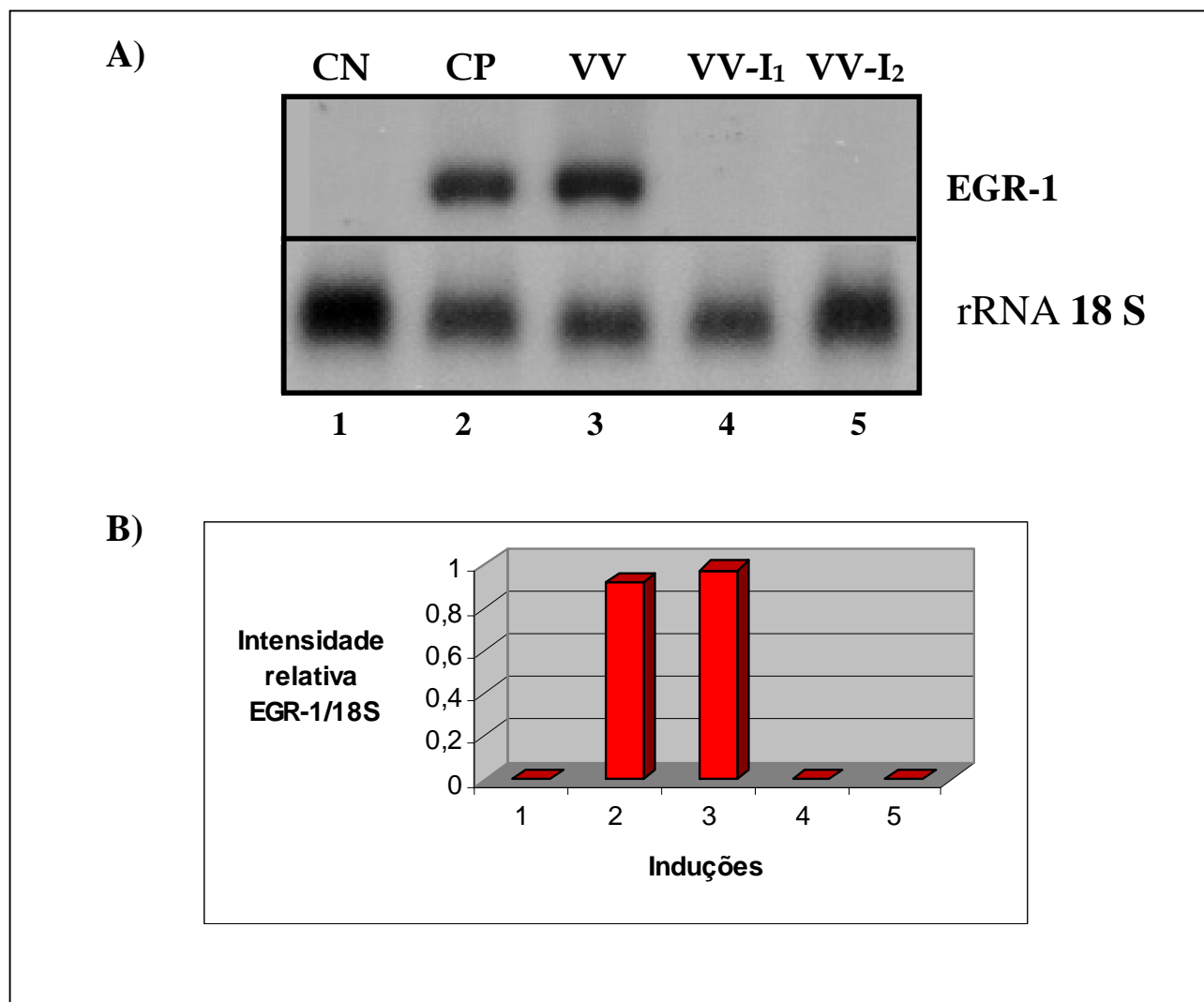


Figura 4: Expressão de EGR-1 em células A31 infectadas com VV inativado com luz U.V. As células foram crescidas em DMEM suplementado com 10 % de SFB até atingirem 90 % de confluência quando foram carenciadas no mesmo meio contendo 0,5% de SFB por 36 horas. As células foram então infectadas (m.o.i. 1,0) com VV selvagem ou inativado por 10 minutos com luz ultra violeta (VV-I₁ e VV-I₂) por 4 horas e coletadas para a extração do RNA total. (A) 15µg do 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). Células apenas carenciadas e células tratadas com 10% SFB por 30 minutos foram utilizadas como controles negativo (CN) e positivo (CP), respectivamente. O controle da quantidade de RNA nas diferentes canaletas, foi realizado utilizando-se sonda para o rRNA 18S. (B) Gráfico do traçado densitométrico dos mRNAs considerado como intensidade relativa pois, utilizou-se como parâmetro a razão entre as intensidades das bandas dos genes EGR-1 e 18S.

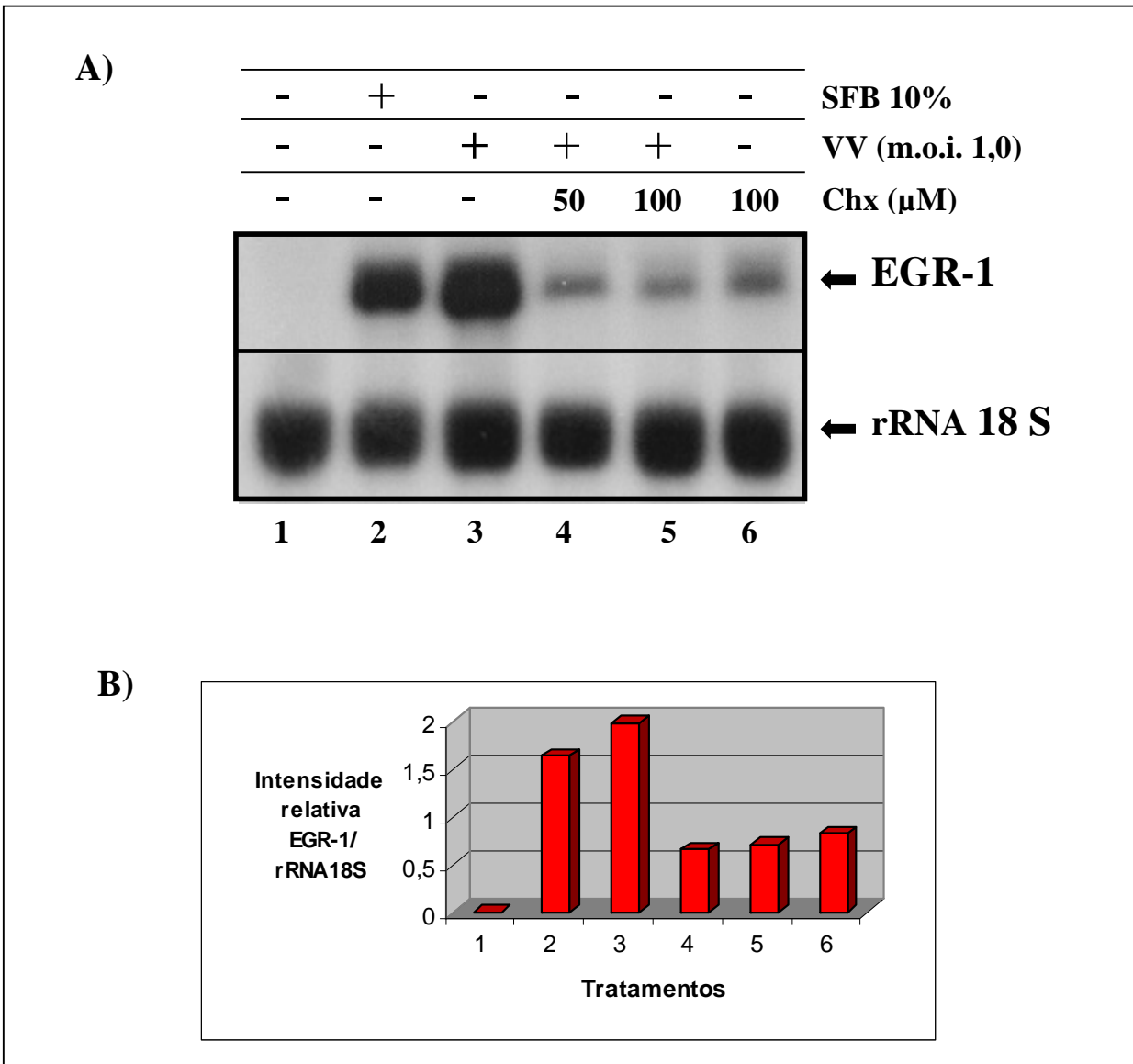


Figura 5: Efeito do inibidor de síntese proteica cicloheximida na indução da expressão do gene *EGR-1* pelo VV. As células foram crescidas em DMEM suplementado com 10 % de SFB até atingirem 90 % de confluência quando foram carenciadas no mesmo meio contendo 0,5% de SFB por 36 horas. As células foram então tratadas com cicloheximida (chx) 50 e 100 μ g/ml por 15' e depois infectadas com VV por 4 horas, quando foram coletadas para a extração do RNA total. (A) 15 μ g do 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). O controle da quantidade de RNA nas diferentes canaletas, foi realizado utilizando-se sonda para rRNA 18S. (B) Gráfico do traçado densitométrico dos mRNAs considerado como intensidade relativa pois, utilizou-se como parâmetro a razão entre as intensidades das bandas dos genes *EGR-1* e 18S.

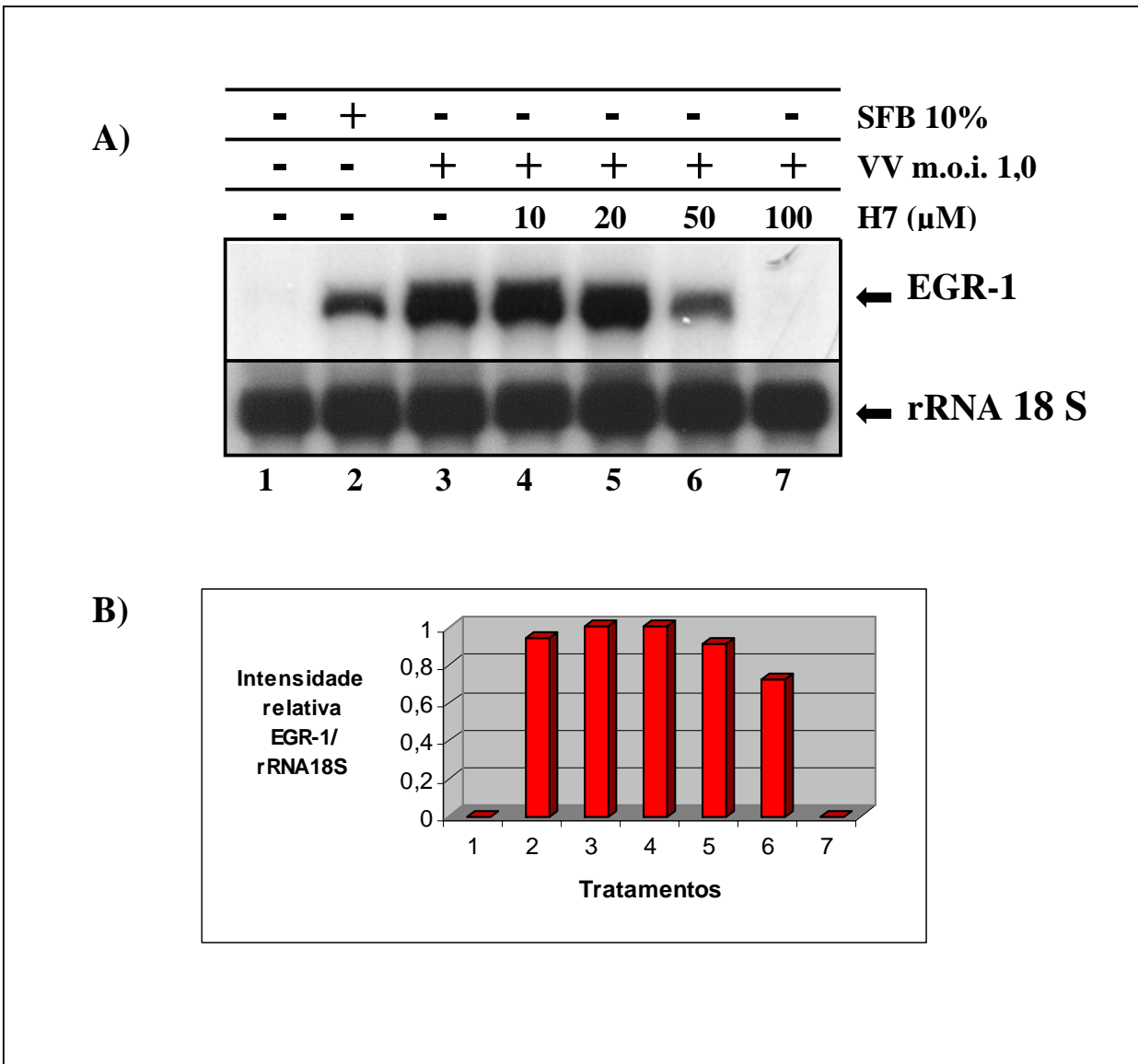


Figura 6: Influência do inibidor de proteína quinase H7 na indução do gene EGR-1 pelo VV. As células foram crescidas em DMEM suplementado com 10 % de SFB até atingirem 90 % de confluência quando foram carenciadas no mesmo meio contendo 0,5% de SFB por 36 horas. As células foram então tratadas com H7: 10, 20, 50 e 100 μ M por 20' e depois infectadas com VV por 4 horas, quando foram coletadas para a extração do RNA total. (A) 15 μ g do 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). O controle da quantidade de RNA nas diferentes canaletas, foi realizado utilizando-se sonda para rRNA 18S. (B) Gráfico do traçado densitométrico dos mRNAs considerando como intensidade relativa pois, utilizou-se como parâmetro a razão entre as intensidades das bandas dos genes EGR-1 e 18S.

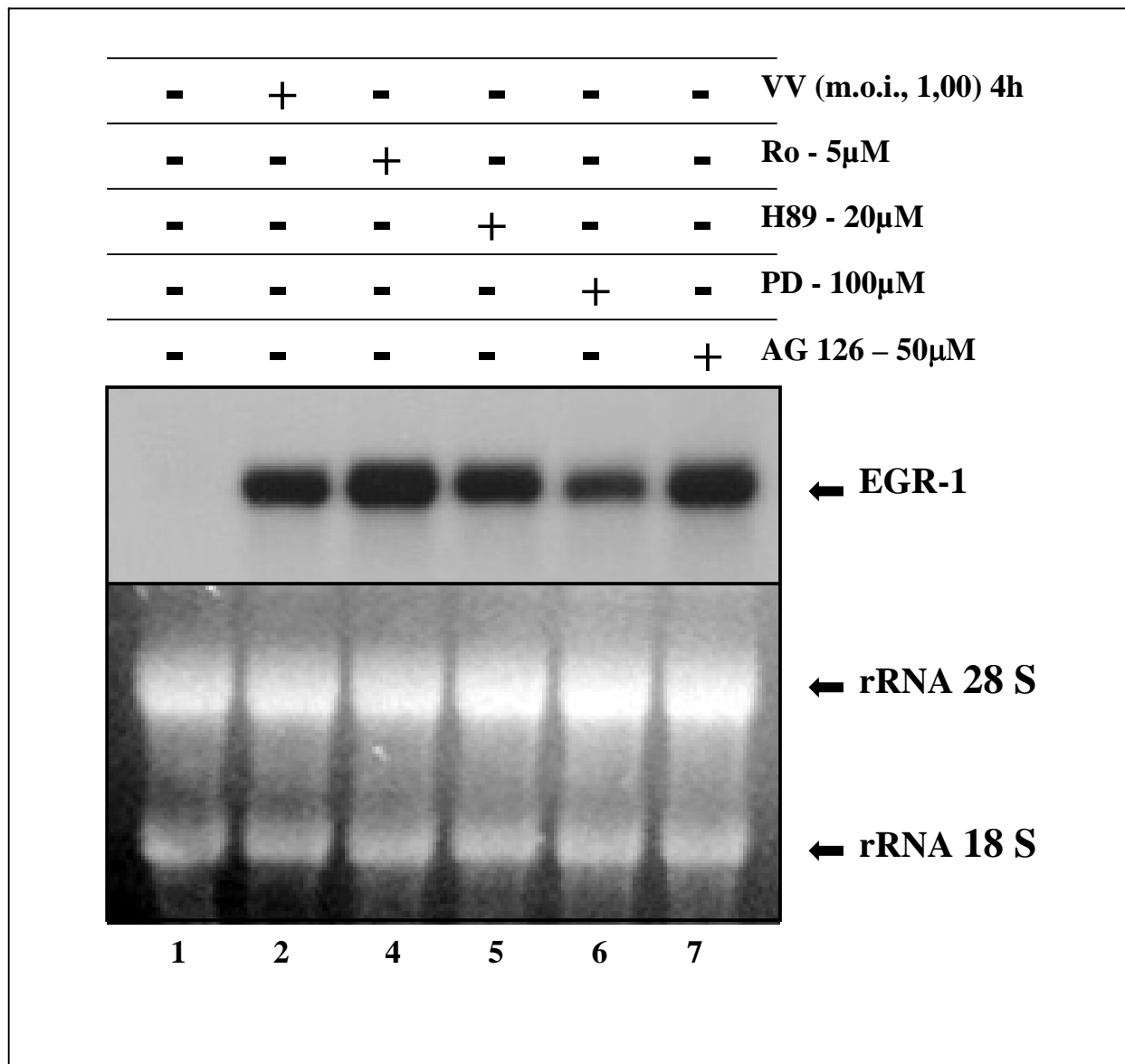


Figura 7: Efeito de diferentes inibidores de proteínas quinases na indução do gene EGR-1 pelo VV As células foram crescidas em DMEM suplementado com 10 % de SFB até atingirem 90 % de confluência quando foram carenciadas no mesmo meio contendo 0,5% de SFB por 36 horas. As células foram então tratadas com os diferentes inibidores de proteínas quinases nas concentrações representadas e depois infectadas com VV por 4 horas, quando foram coletadas para a extração do RNA celular total. 15 μ g do 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). O controle da quantidade de RNA nas diferentes canaletas, foi realizado utilizando como referência os rRNAs 18 e 28S, após o gel ser corado com Brometo de Etídio e fotografado.

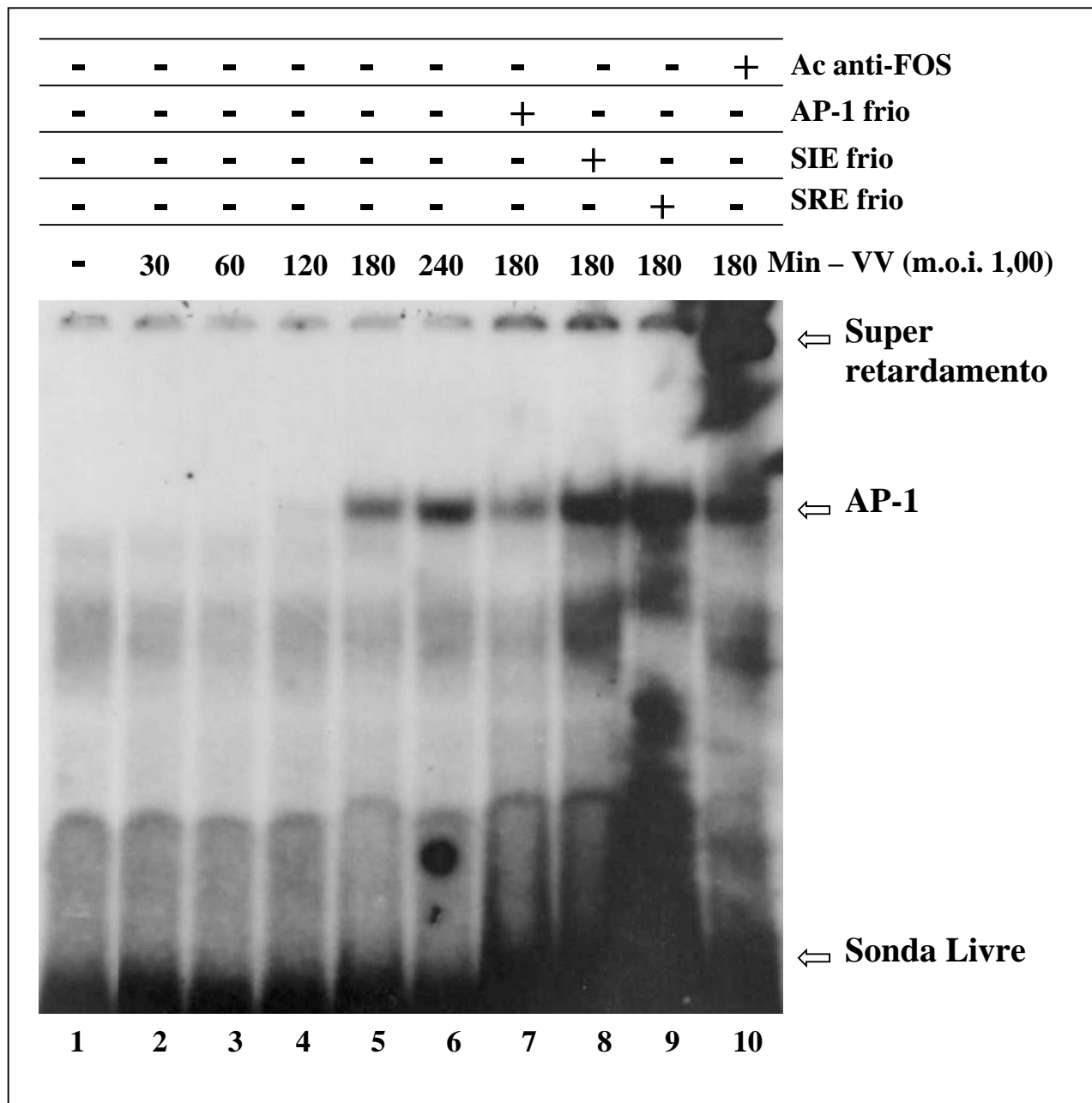


Figura 8: Análise das interações do elemento regulatório AP-1 com proteínas de células A31 infectadas pelo VV: As células foram crescidas em DMEM suplementado com 10 % de SFB até atingirem 90 % de confluência sendo então carenciadas no mesmo meio contendo 0,5% de SFB por 36 horas. Quando foram infectadas com VV a m.o.i. 1,0. Após diferentes tempos as proteínas totais celulares, foram extraídas e realizamos o EMSA. 20µg de proteínas foram adicionadas de 5×10^4 cpm/amostra da sonda AP-1 marcada com $^{32}\text{P}[\gamma\text{ATP}]$. Proteínas totais extraídas de células não tratadas foram utilizadas como controle negativo. Como controle da especificidade da reação foi realizado o ensaio de competição através da pré-incubação das proteínas com 50X excesso molar das sondas AP-1, SRE e SIE não marcadas. No super retardamento realizamos anticorpo anti-FOS, que foi pré-incubado com as proteínas por 1 hora a 4°C , antes da adição da sonda marcada.

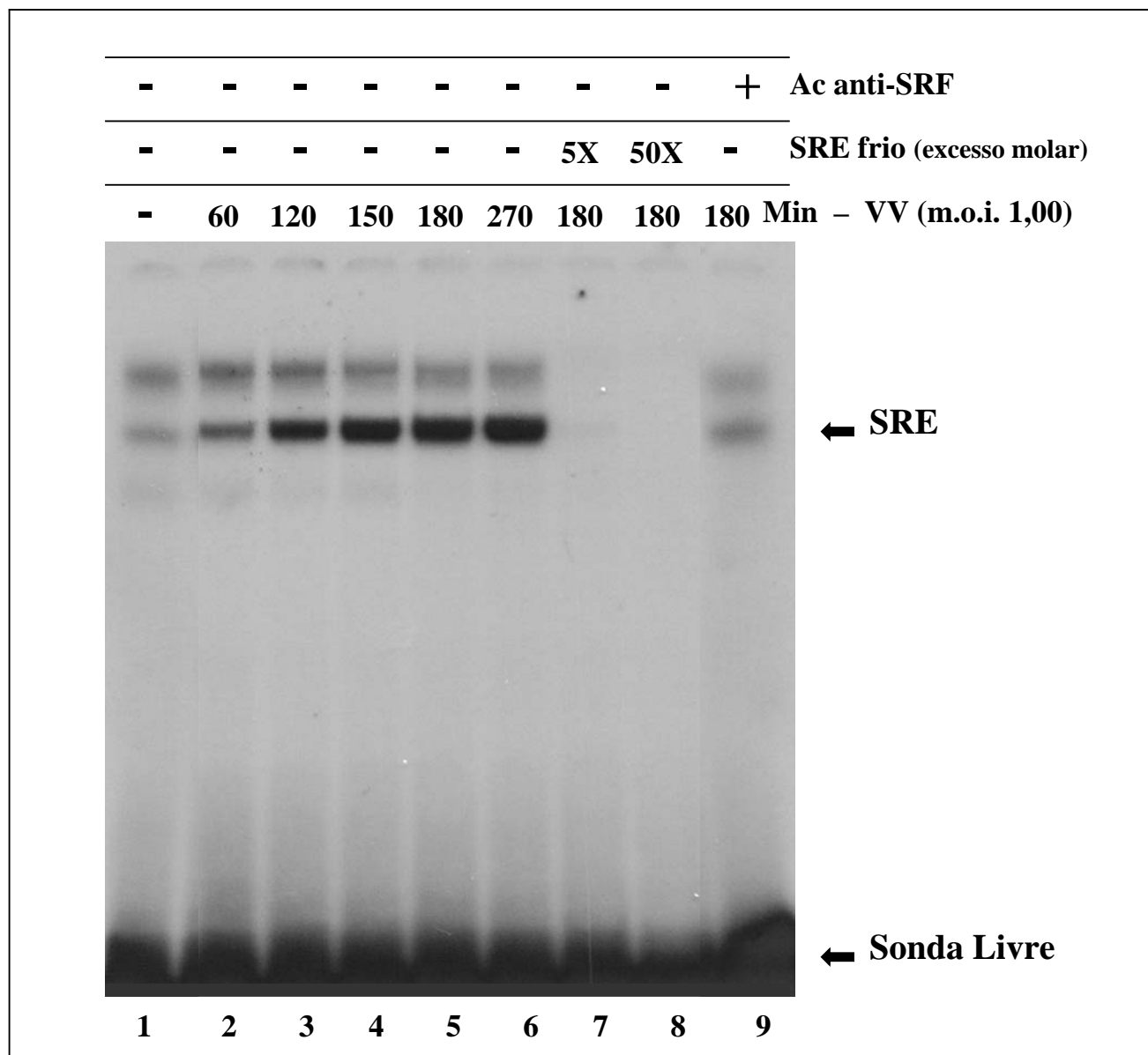


Figura 9: Análise das interações do elemento SRE com proteínas de células A31 infectadas pelo VV. As células foram crescidas em DMEM suplementado com 10 % de SFB até atingirem 90 % de confluência quando foram carenciadas no mesmo meio contendo 0,5% de SFB por 36 horas, sendo então infectadas com VV a m.o.i. 1,0. Após diferentes tempos as proteínas celulares totais foram extraídas e realizamos o EMSA. 20µg de proteínas foram adicionadas de 5×10^4 cpm/amostra da sonda SRE marcada com $^{32}\text{P}[\gamma\text{ATP}]$. Proteínas totais extraídas de células não tratadas foram utilizadas como controle negativo. Como controle da especificidade da reação foi realizado o ensaio de competição através da pré-incubação das proteínas com 5 ou 50X excesso molar da sonda não marcada. No super retardamento realizado utilizamos anticorpo anti-SRF (20µg), que foi pré incubado com as proteínas por 1 horas a 4 °C, antes da adição da sonda marcada.

7 - DISCUSSÃO

Durante a replicação dos poxvírus, um fenômeno de proliferação celular localizada pode ser observado, o qual têm sido associado à liberação de um fator de crescimento solúvel lançado no meio extracelular a partir das células infectadas. No caso do vírus Vaccínia 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 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.

Além dos poxvírus, a indução de eventos celulares relacionados à 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 SHIKU, 1995; FUJII *et al.*, 1995). Ainda podemos citar 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; DRON *et al.*, 1999).

A indução do gene *c-fos* pôde também ser associada à infecção pelo VV, a qual foi detectada 10 minutos após a infecção viral, alcançando o pico de expressão aos 30 minutos de infecção, declinando a partir de 60 minutos e voltando a níveis basais após duas horas de infecção, demonstrando que este gene é precocemente ativado durante a infecção viral, independente de nova síntese proteica. A cinética de indução do gene *c-fos*, devido a estimulação com SFB, foi semelhante à obtida na infecção viral. A estimulação de *c-fos* (mRNA) pelo VV se correlaciona com a ligação de proteínas, induzidas pelo VV, que se ligam ao promotor (SRE) do

gene *c-fos*, o que foi demonstrado por ensaios de interação de DNA-proteína (EMSA) (MAGALHÃES *et al.*, 2000).

Sendo assim, nos propusemos a investigar se outros genes também precoces e relacionados com mitogênese (*EGR* e *c-jun*) estariam sendo estimulados (expressos) em resposta à infecção pelo VV, o que poderia se constituir como um programa mitogênico que seria acionado pelo vírus como estratégia favorecedora da sua multiplicação

No presente estudo podemos verificar que o VV também induz fortemente a ativação do gene *EGR-1* (Figura 1), sendo esta prolongada em comparação à ativação observada em resposta ao SFB (SUKHATME *et al.*, 1988; OLIVEIRA *et al.*, 1997), ou mesmo em relação à expressão de *c-fos* induzida pelo VV (MAGALHÃES *et al.*, 2000). O gene *EGR* é ativado, *in vitro*, mesmo em resposta à infecção celular com o vírus Vaccínia deletado para o gene *VGF* (Figura 2), este dado é semelhante ao observado para *c-fos*, indicando 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*. TZAHAR e colaboradores (1998) demonstraram que os fatores de crescimento virais, embora possuam de 10 a 1000 vezes menos afinidade aos seus respectivos receptores celulares são, mitogenicamente, iguais ou mais potentes do que suas proteínas celulares equivalentes. 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.

Verificamos que a indução de *EGR-1* é dependente da multiplicidade de infecção utilizada (Figura 3), o que sugere a participação de um gene precoce viral na indução gênica, uma vez que a elevada expressão do gene coincide com a síntese de proteínas virais precoces. Entretanto, uma maior multiplicidade (m.o.i. 10) pode ter resultado em danos celulares que influenciaram negativamente na indução gênica. Este dado é ainda mais reforçado quando se observa que, a ativação de *EGR-1* é totalmente anulada quando infectamos as células com o VV que teve seu DNA inativado pela luz U.V. (Figura 4), e quando pré-tratamos as células com o inibidor de síntese proteica (cicloheximida), verificamos um decréscimo na indução de *EGR-1*, sendo que a maior concentração utilizada (100µM) foi capaz de inibir completamente a expressão gênica (Figura 5).

A transcrição do gene *c-fos* (protótipo dos genes imediatamente precoces) e outros como *c-jun* e *c-myc*, podem ocorrer através da utilização de diferentes vias

de sinalização celular, incluindo a via JAK/STAT ou àquela envolvendo MAP quinases (COOPER, 1995; KARIN e HUNTER, 1995). Dados obtidos pelo nosso grupo, através de ensaios utilizando-se células deficientes em componentes da via JAK/STATs, demonstram que o seu papel é apenas marginal na infecção pelo VV, uma vez que não constatamos diferença significativa na multiplicação do vírus nas diferentes células sendo elas parental; célula deficiente em JAK 1 e célula deficiente em STAT 1 (Dados da monografia que apresentei ao Departamento de Microbiologia - ICB/ UFMG, 1997). Sendo assim, nós investigamos o possível envolvimento da via MAP quinase na estimulação da expressão de EGR-1 desencadeada pela infecção com o VV. Primeiramente, usamos como ferramenta o inibidor de serina/treonina quinase H7, e observamos que este inibidor influenciou negativamente e de maneira dose dependente na indução da expressão de EGR-1, deixando clara a participação de proteínas serinas/treoninas na transcrição de sinal desencadeada em resposta à infecção pelo VV. Esta droga, na concentração de 100 μ M, também foi capaz de reduzir drasticamente a multiplicação do VV (92 %), o que sugere uma correlação entre a diminuição na expressão do gene EGR-1 induzida pelo VV e o reflexo em sua multiplicação viral. Este estudo foi realizado por José Carlos Magalhães em seu mestrado (Magalhães, 1997). Devemos salientar, que foi realizado um teste de viabilidade celular após o tratamento das mesmas com o H7, sendo que nas condições em que realizamos nossos experimentos as células apresentaram-se viáveis.

Resultados preliminares utilizando-se o inibidor Ro 31-8220, o qual apresenta maior especificidade para PKC, nos sugere que a ativação transcricional de EGR-1 em resposta à infecção pelo VV, pode ocorrer independentemente de proteína quinase C, uma vez que a inibição desta quinase promoveu, um aumento no acúmulo do mRNA de EGR-1, embora Ro também possa inibir outras quinases (CALVAN e COHEN, 1999). A ativação transcricional de EGR-1, aparentemente, também é independente de PKA e ERK 1/2, em nossos ensaios preliminares, usando inibidores para estas proteínas, respectivamente H89 e AG-126, nós não observamos diferença significativa na indução da expressão de EGR-1. Entretanto, quando utilizamos o inibidor PD 98059, específico para MEK, observamos significativa redução na indução da expressão do gene EGR-1 em resposta à infecção pelo VV, sugerindo que a ativação transcricional de EGR-1 ocorre via MEK. Entretanto, esses dados devem ser confirmados e novos estudos utilizando-se como ferramenta outros inibidores proteicos, como por exemplo o inibidor para p38^{MAPK} (SB 203580), são necessários para que

possamos caracterizar a via utilizada pelo VV, na ativação transcricional de EGR-1.

Desde que a infecção com o vírus Vaccinia foi capaz de induzir a transcrição do gene EGR-1, nós também investigamos quais as proteínas estariam envolvidas neste processo, analisando após a infecção com o VV, quais proteínas estariam se ligando às sequências regulatórias existentes na extremidade 5' do gene, através da análise do retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA).

A atividade de ligação ao sítio AP-1 em resposta à infecção pelo VV foi observada somente após 3-4 horas de infecção (Figura 8, canaletas 5 e 6). A interação proteica ao sítio AP-1 foi específica, uma vez que os complexos formados foram deslocados pela competição com 50 vezes excesso molar da sonda homóloga fria (Figura 8, canaleta 7), o mesmo não sendo observado nos ensaios de competição com 50 vezes excesso molar das sondas heterólogas SRE e SIE não marcadas (Figura 8, canaletas 8 e 9). Para analisarmos quais proteínas poderiam estar presentes no complexo formado, pré-incubamos o “mix” proteico com um anticorpo policlonal anti-FOS, o qual foi capaz de promover o super retardamento, demonstrando a presença de altos níveis da proteína FOS ligada ao sítio AP-1, sugerindo uma possível participação do fator de transcrição AP-1 (heterodímero FOS/JUN), se ligando ao elemento AP-1.

A infecção com o VV induziu também a atividade de ligação proteica ao sítio SRE 60 minutos após a infecção, a qual foi aumentando gradativamente até o maior tempo analisado, 270 minutos pós infecção (Figura 9, canaletas 2 a 6). A especificidade da interação para os complexos formados foi também demonstrada pela competição com 5 e 50 vezes excesso molar da sonda homóloga não marcada, a qual foi capaz de impedir a formação dos mesmos (Figura 9, canaletas 7 e 8). Além disso a utilização de um anticorpo anti-SRF, nos permitiu verificar a presença da proteína SRF no complexo formado, uma vez que quando pré incubamos o “mix” proteico com este anticorpo deixamos de observar a banda referente ao complexo proteico (Figura 9, canaleta 9). Este dado, sugere a participação do complexo ternário na ativação de EGR-1, através da sua ligação em SRE, dado este condizente com a literatura (COHEN *et al.*, 1996; CHRISTY e NATHANS, 1989; QURESHI *et al.*, 1991; ALEXANDROPOULOS, *et al.*, 1992; RUPPRECHT *et al.*, 1994; McMAHON e MONROE, 1995). Entretanto, nós observamos a expressão do gene EGR-1 30 minutos pós infecção com o VV, indicando que outros elementos regulatórios

presentes no promotor deste gene, como por exemplo, CRE e NF- κ B, estariam sendo ativados transcricionalmente. Este estudo será alvo do nosso trabalho no Doutorado.

Podemos então dizer que o VV é capaz de desencadear efeitos relacionados à indução de genes classicamente relacionados com proliferação celular, tais como o proto-oncogene *c-fos* e o gene de resposta precoce (EGR-1), nos momentos iniciais de sua infecção. A ativação/indução destes dois genes, após infecção com o VV, tem como consequência a ativação do complexo ativador transcricional AP-1. A progressão através das diferentes fases do ciclo de divisão celular (G0/G1, S, G2 e M) é controlada por uma família de proteínas que são altamente conservadas e regulam o ciclo celular de todos os eucariotos. Estas proteínas são compostas por uma subunidade catalítica que é uma serina/treonina quinase, chamada de quinase dependente de ciclina (CDK), e uma subunidade regulatória que é uma ciclina, a qual pode pertencer aos grupos A, B, C ou D, e que atua controlando a atividade quinase da CDK durante o ciclo celular (COOPER, 1995; ANDRADE *et al.*, 2000). BROWN e colaboradores (1998) demonstraram que o complexo AP-1 pode se ligar ao promotor do gene da ciclina D1 e promover a sua transcrição. De fato, a proteína EGR-1 também pode acentuar a transcrição do gene da ciclina D1, através da sua ligação a elementos ricos em G + C presentes no promotor da ciclina D1 (YAN *et al.*, 1997). Desse modo ambos os genes ativados pelo VV (*c-fos* e EGR-1) podem contribuir para a progressão do ciclo celular de G0/G1 para S, uma vez que seus produtos são potenciais reguladores positivos de ciclina D1. Além disso, resultados obtidos pelo Doutorando Anderson A. Andrade, em nosso laboratório, que demonstram a inibição da expressão de um gene com atividade anti-proliferativa, p21^{WAF1}, que atua regulando negativamente as CDKs, pelo VV em células previamente tratadas com o IFN γ , reforça nossa hipótese de que nos momentos iniciais de sua infecção o vírus Vaccínia, atua desencadeando um programa mitogênico celular, forçando a célula hospedeira a sair do repouso (G0) e entrar na fase S, criando assim um ambiente intracelular mais adequado à sua replicação.

8 - PERSPECTIVAS

Durante a realização deste trabalho, muitas questões não foram respondidas e novas perguntas foram surgindo, desta forma continuaremos explorando os efeitos mitogênicos desencadeados pela infecção com o vírus Vaccinia, para tentarmos estabelecer um programa mitogênico utilizado pelo VV, nos momentos iniciais de sua replicação. Abaixo estão enumerados alguns dos objetivos que pretendemos alcançar durante o Doutorado:

- Análise da proteína EGR-1, para que possamos verificar se os níveis de mensageiros acumulados se refletem na síntese da proteína na célula infectada pelo VV.
- Análise das interações DNA/proteína, nos sítios AP-1, SRE, CRE, NF-kB tanto no promotor de *c-fos* quanto de EGR-1, bem como análise das diferentes proteínas presentes nos complexos formados
- Análise do efeito de diferentes inibidores proteicos na interação DNA/proteínas nos sítios AP-1; SRE; CRE e NF-kB.
- Análise da indução de *c-fos* e EGR-1, em resposta à infecção por outros vírus da família *Poxviridae*

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHIM, R. Role of human papillomaviruses in the malignant transformation of keratinocytes. *Rom J Virol* v. 48: 71-83, 1997.
- ANDRADE, A. A. O controle de Expressão do Inibidor de Quinase-Dependente de Ciclina p21^{WAF1/CIP1} pelo Vírus Vaccinia Belo horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1999, 70p (Dissertação de Mestrado em Microbiologia).
- ALCAMI, A., SMITH, G. L. Vaccinia, cowpox, and camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity. *J Virol* v. 69 p. 4633-4639, 1995.
- ALEXANDROPOULOS, K., QURESHI, S.A., RIM M., SUKHATME, V.P., FOSTER, D.A. v-Fps-responsiveness in the EGR-1 promoter is mediated by serum response elements. *Nucleic Acids Research* v.20 p.2355-2359, 1992.
- BEADLING C, NG J, BABBAGE JW, CANTRELL DA. Interleukin-2 activation of STAT5 requires the convergent action of tyrosine kinases and a serine/threonine kinase pathway distinct from the Raf1/ERK2 MAP kinase pathway. *EMBO J* v. 15 p. 1902-1913, 1996.
- BEATTIE, E., TARTAGLIA, J., PAOLETTI, E. Vaccinia virus encoded eIF 2 alpha homolog abrogates the antiviral effect of interferon. *Virology* v.183 p.419-422, 1991.
- BELTMAN, J., MCCORMICK, F., COOK, S. J. The selective protein kinase C inhibitor, Ro-31-8220, inhibits mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression, induces c-Jun expression, and activates Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem.* v. 271 p. 27018-24, 1996.
- BENN, J., SCHNEIDER, R. J. Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 92 p. 11215-11219, 1995.
- BENN, J., SU, F., DORIA, M., SCHNEIDER, R. J. Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. *J. Virol.* v. 70 p. 4978-4985, 1996.

- BIRNBOIM, H. C., DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* v. 7 p. 1513-1523, 1979.
- 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 p. 105-117, 1997.
- BLASCO, R. MOSS, B. Role of cell-associated enveloped vaccine virus in cell-to-cell spread. *J. Virol.* v. 66 p. 4170-4179, 1992.
- BLASCO, R., MOSS, B. Extracellular Vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37,000 daltons outer envelope protein. *J. Virol.* v. 65 p. 5910-5920, 1991.
- BLOMQUIST, M. C., HUNT, L. T., BARKER, W. C. Vaccinia virus 19 Kilodaltons protein: Relationship to several mammalian proteins, including two growth of factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 81 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 p. 561-563, 1990.
- BONJARDIM, C. A. A mutant cell line partially responsive to both IFN α and IFN γ . *Braz. J. Med. Biol. Res.* v. 30, p. 41-50, 1997.
- BROWN, J. P., TWARDZIK, D. R., HARQUARDT, H., TODARO, G. J. Vaccinia virus encodes a polypeptide homologous to epidermal growth factor and transforming growth factor. *Nature* (London) v. 313 p. 49- 492, 1985.
- BROWN N. R., NOBLE M. E., LAWRIE A. M., MORRIS M. C., TUNNAH P., DIVITA G., JOHNSON L. N., ENDICOTT J. A. Effects of phosphorylation of threonine 160 on cyclin-dependent kinase 2 structure and activity. *J Biol Chem.* v. 274 p. 8746-56, 1999.

- BULLER, R. M. L., CHAKRABARTI, S., COOPER, J. A., TWARDZIK, D. R., MOOS, B. Deletion of the Vaccinia virus growth factor gene reduces virus virulence. *J. Virol* v. 62 p. 866-874, 1988a.
- BULLER, R. M. L., CHAKRABARTI, S., MOOS, B., FREDICKSON, T. N. Cell proliferative response to Vaccinia virus is mediated by VGF, *Virology* v.164 p.182-192, 1988b.
- BULLER, R. M. L., CHAKRABARTI, S., MOOS, B., FREDICKSON, T. N. Cell proliferative response to Vaccinia virus is mediated by VGF, *Virology* v.164 p.182-192, 1985.
- BULLER, R. M., PALUMBO, G. J. Poxvirus pathogenesis. *Microbiol Rev* v. 55 p. 80-122, 1991.
- CAHILL, M. A., JANKNECHT, R., NORDHEIN, A. Jack of all cascades. *Curr. Biol.* v. 6 p. 16-19, 1996.
- CAI, H., ERHARDT, P., TROPPEMAIR, J., DIAZ MECO, M. T., SITHANANDAM, G., RAPP, U. R., MOSCAT, J., COOPER, G. M. Hydrolysis of phosphatidylcholine couples Ras to activation of Raf protein kinase during mitogenic signal transduction. *Mol Cell Biol.* v.13 p. 7645-7651, 1993.
- CALOGERO, A., CUOMO, L., D'ONOFRIO M., de GRACIA, 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. *Oncogenes* v 13 p. 2105-2112, 1997
- 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., GUY, G. R., SUKHATME, V.P., TAN, Y.H. Regulation of the Egr-1 Gene by Tumor Necrosis Factor and Interferons in Primary Human Fibroblasts. *The Journal Biological Chemistry.* v.267 p. 134- 1349, 1992.

- CAO, X., 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. *Molecular and Cellular Biology* v. 10 p. 1931-1939, 1990.
- CARPENTER, G., WAHL, M. I. Peptide growth factors and their receptors, SPORN, M. D., ROBERTS, A. B. *Ed. Springer*, New York, p. 69-171, 1990.
- 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. 56- 577, 1986.
- CARROLL, M.W., MOSS, B. Poxviruses as expression vector. *Current Opinion in Biotechnology* v. 8 p. 573-577, 1997.
- CAVALLARO, K. F., ESPOSITO, J. J. Sequences of the raccoon poxvirus hemagglutinin protein. *Virology* v. 190 p. 434-439, 1992.
- CHANG, H. W., WATSON J. C., JACOBS B. L. The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* v. 89 p. 4825-4829, 1992.
- 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*. *Molecular and Cellular Biology* v. 9 p. 787-797, 1989.
- CHIJIWA T, MISHIMA A, HAGIWARA M, SANO M, HAYASHI K, INOUE T, NAITO K, TOSHIOKA T, HIDAKA H. Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J Biol Chem.* v. 265 p. 5267-5272, 1990.
- 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 p. 2335-2349, 1995.
- CHOMCZYNSKI, J. N., SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal. Biochem.* v. 162 p.152-159, 1987.
- CHRISTY, B., LAU, L.F., NATHANS, D. A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encode a protein with “zinc finger”sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA.* v. 85 p. 7857-7861, 1988.
- CHRISTY, B., NATHANS, D. DNA binding site of growth factor-inducible protein Zif268. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA.* v. 86 p. 8737-8741, 1989.
- CHRISTY, B., NATHANS, D. Functional Serum Response Elements Upstream of Growth Factor-Inducible Gene zif268. *Molecular and Cellular Biology* v. 9 p. 4889-4895, 1989.
- CHURCH, G. M., GILBERT, W. Genomic. sequenc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 81 p. 1991-1995, 1984.
- COHEN, D.A., GULLANS, S.R., CHIN, W.W. Urea Inducibility os egr-1 in Murine Inner Medullary Collecting Duct Cells Is Mediated by the Serum Response Element and Adjacent Ets Motifs. *The Journal of Biological Chemistry* v. 271 p.12903-1996.
- COLAMONICI, O. P., DOMANSKI, P., SWEITZER, S. M., LARNER, A., BULLER R. M. Vaccinia virus B18R gene encodes a type 1 interferon-binding protein that blocks interferon alpha transmembrane signalling. *J Biol Chem* v. 7 p. 15974-8, 1995.
- COMBEST WL, BLOOM TJ, GILBERT LI. Polyamines differentially inhibit cyclic AMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation in the brain of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J Neurochem.* v. 51 p. 1581-1591, 1988.
- COOPER, G. M. In “Oncogenes”: Pathways of Mitogenic Signals Transduction. 2nd edition. Jones and Bartlett Publishers, London, pp279-306, 1995.

- CURRAN, T., FRANZA, R.B.J. Fos and Jun: The Ap-1 Connection. *Cell* v. 55 p. 393-397, 1988.
- DALES, S., POGO, B. G. T. Biology of poxviruses. KINGSBURY, D. W., HAUSEN, H. Z. Eds. *Springer Verlag*, Vienna/ New York, pp. 54-64,1981.
- DALTON, S., TREISMAN, R. Characterization of SAP 1, a protein recruited by serum response factor to the c fos serum response element. *Cell* v. 68 p. 597-612, 1992.
- DARNELL, J. E. Jr., KERR, I. M., STARK, G. R. JAK STAT pathways and transcriptional activation in response to interferons and other extracellular signaling proteins. *Science* v. 264 p. 1415-1421, 1994.
- DAVIS, P. D., ELLIOTT, L. H., HARRIS, W., HILL, C. H., HURST, S. A., KEECH, E., KUMAR, M. K., LAWTON, G., NIXON, J. S., WILKINSON, S. E. Inhibitors of protein kinase C. 2. Substituted bisindolylmaleimides with improved potency and selectivity. *J Med Chem.* v. 35 p. 994-1001, 1992.
- DAWSON, C.W., ELIOPOULOS, A. G., DAWSON, J., YOUNG, L.S. *BHRF 1*, a viral homologue of the Bcl-2 oncogene, disturbs epithelial cell differentiation. *Oncogene* v. 10 p. 69-77, 1995
- DeFILIPPES, F., M. Restriction enzyme mapping of vaccinia virus DNA. *J Virol* v. 43 p. 136-149, 1982.
- DOMS, R. W., BLUMENTHAL, R., MOSS, B. Fusion of intra- and extracellular forms of vaccinia virus with the cell membrane. *J Virol* v. 64 p. 4884-4892, 1990.
- DOUGLASS, N. J., RICHARDSON, M., DUMBELL, K. R. Evidence for recent genetic variation in monkeypox viruses. *J Gen Virol.* v. 75 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 p. 19-28, 1999.

- DUBOCHET, J., ADRIAN, M., RICHTER, K., GARCES, J., WITTEK, R.
Structure of intracellular mature vaccinia virus observed by cryoelectron microscopy. *J Virol* v. 68 p. 1935-1941, 1994)
- DUDLEY, D. T., PANG, L., DECKER, S. J., BRIDGES, A. J., SALTIEL, A. R.
A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 92 p. 7686-7689, 1995.
- DULBECCO, R. in “Microbiology” Evolution of microbiology and microbes.
4th edition, eds J. B. Lippincott Company, Philadelphia, p. 769 -95, 1990.
- EPPSTEIN, D, A., MARSH, Y. V., SCHEREIBER, A. B. NEWMAN, S. R.,
TODARO, G. J., NESTOR, J. J. Epidermal growth factor receptor occupancy
inhibits Vaccinia virus infection. *Nature* (London) v.266 p. 550-552, 1985.
- ESPOSITO, J.J., PALMER, E. L., BORDEN, E. C., HARRISON, A. K.,
OBIJESKI, J. F., MURPHY, F. A., Studies on the Poxvirus Cortia. *J. Gen
Virol* v. 47 p. 37-46, 1979.
- ESPOSITO, J. J., KNIGHT, J. C. Orthopoxvirus DNA: a comparison of
restriction profiles and maps. *Virology* v. 143 p. 230 251, 1985.
- FENNER, F., WITTEK, R., DUMBELL, K. R. The orthopoxviruses. *Academic
Press Inc.* San Diego, California, p.29-84, 1989.
- FINDIK D, SONG Q, HIDAKA H, LAVIN M. Protein kinase A inhibitors
enhance radiation-induced apoptosis. *J Cell Biochem* v. 57 p. 12-21, 1995.
- 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 p. 4549-
4552, 1990.
- FONSECA, F.G. Caracterização molecular dos Poxvírus Cotia e BeAn 58058
isolados do Brasil. Belo horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da
UFMG, 1996, 111p (Dissertação de Mestrado em Microbiologia)
- FONSECA, F.G., LANNA, M. C. S., CAMPOS, M. A. S., KITAJIMA, E.W.,
PERES, J. N., GOLGHER, R. R., FERREIRA, P.C.P., KROON, E.G.

- Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. *Arch Virol.* V. 69 p. 35-47, 1988.
- FRIDOVICH-KEIL, J. L., HANSEN, L. J., KEYOMARSI, K., PARDEE, A. B. Progression through the cell cycle: an overview. *Am Rev Respir Dis* v. 142 p. 53-6, 1990.
- FU, X. Y., AND ZHANG, J. J. Transcriptional factor p91 interacts with the epidermal growth factor receptor and mediates activation of the c-fos promoter. *Cell* v. 74 p. 1135-1145, 1993.
- FUJII, M., CHUHJO, T., MINAMINO, T., MASAOKI, N., MIYAMOTO, K., AND 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: 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 p. 15-20, 1995.
- 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 p. 4863-4867, 1978
- GEILEN CC, WIEPRECHT M, WIEDER T, REUTTER W. A selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-bromocinnamyl (amino) ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), inhibits phosphatidylcholine biosynthesis in HeLa cells. *FEBS Lett.* v. 309 p. 381-384, 1992.
- 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 p. 247-266, 1990.
- HAZZALIN C. A., CANO E., CUENDA A., BARRATT M. J., COHEN P., MAHADEVAN L. C. p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient. *Curr Biol.* v. 6 p. 1028-31, 1996.
- HILES, I. D., OTSU, M., VOLINIA, S., FRY, M. J., GOUT, I., DHAND, R., PANAYOTOU, G., RUIZ-LARREA, F., THOMPSON, A., TOTTY, N. F.

- Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell* v.70 p. 419-429, 1992.
- 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 p. 5037-5047, 1995.
- HILLER, G., WEBER, K. Golgi-derived membranes that contain an acylated viral polypeptide are used for Vaccinia virus envelopment. *J. Virol* v. 55 p. 651-659, 1985.
- HIPSKIND, R. A., NORDHEIM, A. Functional dissection *in vitro* of the human c-fos promoter. *J. Biol. Chem.* v. 266 p. 19583-19592, 1991.
- HODGE, C., LIAO, J., STOFEGA, M., GUAN, K., CARTER-SU, C., SCHWARTZ, J. Growth Hormone Stimulates Phosphorylation and Activation of ELK-1 and Expression of c-fos, egr-1, and junB through Activation of Extracellular Signal-regulated Kinases 1 and 2. *The journal of Biological Chemistry* v. 273 p. 31327-31336, 1998.
- HOWE, L. R., LEEVERS, S. J., GOMEZ, N., NAKIELNY, S., COHEN, P., MARSHALL, C. J. Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* v. 71 p. 335-342, 1992.
- HUANG RP, DARLAND T, OKAMURA D, MERCOLA D, ADAMSON ED. Suppression of v-sis-dependent transformation by the transcription factor, Egr-1. *Oncogene*.v. 9 p. 1367-77, 1994.
- HUGIN, A. W., HAUSER, C. The epidermal growth factor receptor is not a receptor for Vaccinia virus. *J. Virol.* v. 68 p. 8409-8412, 1994.
- ICHIHASHI, Y., MATSUMOTO, S., DALES, S. Biogenesis of Poxviruses: Role of A-type inclusions and host cell membranes in virus dissemination. *Virology* v. 46 p. 507-532, 1971.
- JOKLIK, W, K. The purification of four strains of poxvirus. *Virology* v. 18 p. 9-18, 1962.
- JOKLIK, W. K. The poxviruses. *Bacteriol. Rev.* v. 30 p. 33-36, 1966.

- KAN, H., RUAN, Y., MALIK, K. U. Involvement of mitogen-activated protein kinase and translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope in acetylcholine-induced prostacyclin synthesis in rabbit coronary endothelial cells. *Mol Pharmacol.* v. 50 p. 1139-1147, 1996.
- KARIN, M., HUNTER, T. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol* v. 5 p. 747-757, 1995.
- 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 :857-67, 1998.
- KAWASAKI, H., SPRINGETT, G. M., MOCHIZUKI, N., TOKI, S., NAKAYA, M., MATSUDA, M., HOUSMAN, D. E., GRAYBIEL, A. M. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science.* v.282 p.2275-2279, 1998.
- KELLER, H. U., NIGGLI, V. The PKC-inhibitor Ro 31-8220 selectively suppresses PMA- and diacylglycerol-induced fluid pinocytosis and actin polymerization in PMNs. *Biochem Biophys Res Commun.* v. 194 p. 1111-1116, 1993.
- 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 p. 603-610, 1983
- KIM, H. S., LEE, Y. H., MIN, D. S., CHANG, J. S., RYU, S. H., AHN, B. Y., SUH, P. G. Tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 by vaccinia virus growth factor. *Virology* v. 1, p: 21-28, 1995.
- KOVACS, G. R., ROSALES, R., KECK, J. C., MOSS, B.J. Modification of the cascade model for regulation of vaccinia virus gene expression: purification of a prereplicative, late-stage-specific transcription factor. *Virology* v. 68 p. 3443-3447, 1994
- KNIPE, D. M. in "Virology" - Virus-host-cell interactions. B.N. Fieldes and D.M. Knipe eds. Raven Press - New York. pp 293-316, 1990.

- KULTZ, D., MADHANY, S., BURG, M. B. Hyperosmolality causes growth arrest of murine kidney cells. Induction of GADD45 and GADD153 by osmosensing via stress-activated protein kinase 2. *J Biol Chem.* v. 273 p. 13645-13651, 1998.
- LANGLOIS, W. J., SASAOKA, T., SALTIEL, A. R., OLEFSKY, J. M. Negative feedback regulation and desensitization of insulin- and epidermal growth factor-stimulated p21ras activation. *J Biol Chem.* v. 270 p. 25320-25323, 1995.
- LANNA, M.C. Propriedades Biológicas dos Poxvírus Silvestres Cotia e BeAn 58058 Isolados no Brasil. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1980. 104p. (Dissertação de Mestrado em Microbiologia)
- LEAMAN, D. W., PISHARODY, S., FLICKINGER, T. W., COMMANE, M. A., SCHLESSINGER, J., KERR, I. M., LEVY, D. E., STARK, G. R. Roles of JAKs in activation of STATs and stimulation of c fos gene expression by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* v. 16 p. 369-375, 1996.
- LEWIS, J. J., HOUGHTON, A. N. Definition of tumor antigens suitable for vaccine construction. *Semin Cancer Biol* v. 6 p. 321-327, 1995.
- LIM, C.P., JAIN, N., CAO, X. Stress-induced immediate-early gene, egr-1, involves activation of p38/JNK-1. *Oncogene* v. 16 p. 2915-2926, 1998.
- 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: 186-93 1999.
- LOPAREV, V. N., PARSONS, J. M., KNIGHT, J. C., PANUS, J. F., RAY, C. A., BULLER, R. M., PICKUP, D. J., ESPOSITO, J. J. A third distinct tumor necrosis factor receptor of orthopoxviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 95 p. 3786-91, 1998.
- LOWENSTEIN, E. J., DALY, R. J., BATZER, A. G., LI, W., MARGOLIS, B., LAMMERS, R., ULLRICH, A., SKOLNIK, E. Y., BAR SAGI, D., SCHLESSINGER, J. The SH2 and SH3 domain containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* v. 70 p. 431-442, 1992.

- MCKENNA, J. P., HANSON, P. J. Inhibition by Ro 31-8220 of acid secretory activity induced by carbachol indicates a stimulatory role for protein kinase C in the action of muscarinic agonists on isolated rat parietal cells. *Biochem Pharmacol.* v. 46 p.583-588, 1993.
- MACNAB, J. C., DAVISON, M. D., McNAB, D. The cell-coded polypeptide U90 increased by herpes simplex virus type 2 infection induces Fos and DNA synthesis. *J Gen Virol.* v. 76 p. 3131-3136, 1995.
- 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 p. 511-528, 1993.
- FONSECA, F.G. Caracterização molecular dos Poxvírus Cotia e BeAn 58058 isolados do Brasil. Belo horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1996, 111p (Dissertação de Mestrado em Microbiologia)
- MAGALHÃES, J.C. Sinais Mitogênicos Desencadeados Precocemente na Infecção pelo Vírus Vaccinia Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1997, 129p (Dissertação de Mestrado em Microbiologia).
- MAGALHÃES, J. C, ANDRADE, A. A., SILVA, P. N. G., ROPERT, C., GAZZINELLI, R. T., FERREIRA, P. C. P., KROOM, E. G., BONJARDIM, C. A. A mitogenic Signal Triggered at an Early Stage of Vaccinia Infection: Implication of MAPK/ERK, PKC d PKA in Virus Mutiplication. (Fase final de preparação).
- McMAHON, S.B., MONROE, J.G. Role of primary response genes in generating cellular responses to growth factors. *FASEB*, v 6 p. 2707-2715, 1992.
- McMAHON, S.B., MONROE, J.G. A Ternary Complex Factor-Dependent mechanism mediates induction of *egr -1* through seletive Serum Response Elements following antigen receptor cross-linking in B Lymphocytes. *Mol. Cel. Biol.* v. 15 p. 1086-1093, 1995

- MEYER, H, OSTERRIEDER, N., CZERNY, C. P. Identification of binding sites for neutralizing monoclonal antibodies on the 14-kDa fusion protein of orthopox viruses. *Virology* v. 200 p. 778-783, 1994.
- MIGLICCIO, E., MELE, S., SALCINI, A. E., PELICCI, G., LAI, K. M. SUPERTI-FURGA, G., PAWSON, T., DI FIORE, P. P., LANFRANCOME, L., PELICCI P.G. Opposite effects of the p52^{shc} /p46^{shc} and p66^{shc} splincing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway. *EMBO* v. 17 p. 706-716, 1997.
- MOODIE, S. A., WILLUMSEN, B. M., WEBER, M. J., WOLFMAN. A. Complexes of Ras. GTP with Raf 1 and mitogen activated protein kinase. *Science* v. 260 p. 1658, 1993.
- MOORE AC, HERWALDT BL, CRAUN GF, CALDERON RL, HIGHSMITH AK, JURANEK DD. Surveillance for waterborne disease outbreaks--United States, 1991-1992. *Mor Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ.* v. 19 p. 1-22, 1993
- MORGAN, C. The Vaccinia virus reexamined: development and release. *Virology* v. 73 p. 43-58, 1976.
- MOSS, B., ROSENBLUM, E. N. Protein cleavage and poxvirus morphogenesis: triptic peptide analysis of core precursor accumulated by blocking assembly with rifampicin. *J. Mol. Biol.* v. 81 p. 267-269, 1973.
- MOSS, B. Poxviridae and their replication. FIELDS, B, N. KNIPE, D. M. Ed. *Raven Press, LTD, New York.* p. 2079-2111, 1990.
- MOSS, B. Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development. *Science* 81: 1280-1284, 1991.
- MOSS, B. Poxviridae: the viruses and their replication. (FIELDS, B, N. KNIPE, D. M. HOWLEY, P. M. Ed.) *Lippincot-Raven Press Publishers Philadelphia* 1996.
- MOSSMAN, K., UPTON, C., BULLER, R. M., MCFADDEN, G. Species specificity of ectromelia virus and vaccinia virus interferon gamma binding proteins. *Virology* v. 208 p. 762-769, 1995.

- MÜLLER, H. K., WITTEK, R., SCHAFFNER, W., SCHUMPERLI, D., MENNA, A., WYLER, R. Comparison of five poxvirus genomes with endonucleases Hind III, Bam HI and Eco RI. *J. Gen. Virol.* v. 43 p. 135-147, 1977.
- MULLER, R., BRAVO, R., BURCKHARDT, J. CURRAN, T. Induction of *c fos* gene and protein by growth factor precedes activation of *c myc*. *Nature* v. 312 p. 716-720, 1984.
- MULLER, R., WAGNER, E. F. Differentiation of F9 teratocarcinoma strain cells after transfer of *c fos* proto oncogenes. *Nature* v. 312 p. 716-720, 1984.
- MULLER, U., STEINHOFF, U., REIS, L. F., HEMMI, S., PAVLOVIC, J., ZINKERNAGEL, R. M. AGUET, M. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* v. 264 p. 1918-1921, 1994.
- NATOLI, G., AVANTAGGIATI, M. L., CHIRILLO, P., DE MARZIO, E., COLLEPARDO, D., FALCO, M., BALSANO, C. AND LEVRERO, M. Modulation of intracellular signal transduction pathways by the hepatitis B virus transactivator pX. *J Hepatol* v. 22, p. 14-20, 1995.
- NGUYEN M, BRANTON PE, ROY S, NICHOLSON DW, ALNEMRI ES, YEH WC, MAK TW, SHORE GC. E1A-induced processing of procaspase-8 can occur independently of FADD and is inhibited by Bcl-2. *J Biol Chem.* v. 273 p. 33099-102, 1998.
- NOVOGRODSKY, A., VANICHKIN, A., PATYA, M., GAZIT, A., OSHEROV, N., LEVITZKI, A. Prevention of lipopolysaccharide-induced lethal toxicity by tyrosine kinase inhibitors. *Science.* v. 264 p. 1319-1322, 1994.
- 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 p. 163-168, 1997.
- 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 p. 155-168, 1994.

- PALUMBO, G. J., BULLER, R. M., GLASGOW, W. C. Multigenic evasion of inflammation by poxviruses. *J Virol* v. 68 p. 1737-1749, 1994.
- PANG, L., SAWADA, T., DECKER, S. J., SALTIEL, A. R. Inhibition of MAP kinase blocks the differentiation of PC-12 cells induced by nerve growth factor. *J Biol Chem*. v. 270 p. 13585-13588, 1995.
- PAYNE, L. G. Polypeptide composition of extracellular enveloped Vaccinia virus. *J. Virol.* v. 27 p. 28-37, 1978.
- PAYNE, L. G., KRISTENSSON, K. Extracellular release of enveloped Vaccinia virus from mouse nasal epithelial cells *in vivo*. *J. Gen. Virol.* v. 66 p. 643-646, 1985.
- PRICE, M. A., HILL, C., TREISMAN, R. Integration of growth factor signals at the c fos serum response element. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* v. 351 p. 551-559, 1996.
- PRICE, M. A., ROGERS, A. E., TREISMAN, R. Comparative analysis of the ternary complex factors Elk 1, SAP 1a and SAP 2 (ERP/NET). *EMBO J* v. 14 p. 2589-2601, 1995.
- 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. 81:793-8, 1999.
- QURESHI, S.A., CAO, X., SUKHATME, V.P., FOSTER, D.A. v-Src Activates Mitogen-responsive Transcription Factor EGR-1 via Serum Response Elements. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 266 p.10802-10806, 1991.
- REISNER, A. H. Similarity between the Vaccinia virus 19k early protein and epidermal growth factor. *Nature* (London) v. 313 p. 801-803, 1985.
- ROBINSON, M. J., COBB, M. H. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol.* v.9 p. 180-186, 1997.
- ROSALES, R., SUTTER, G., MOSS, B. A cellular factor is required for transcription of vaccinia viral intermediate-stage genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 91 p. 3794-3798, 1994.

- DE ROOIJ J, ZWARTKRUIS FJ, VERHEIJEN MH, COOL RH, NIJMAN SM, WITTINGHOFER A, BOS JL. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* v. 396 p. 474-477, 1998
- RUFF JAMISON, S., CHEN, K., COHEN S. Induction by EGF and interferon γ of tyrosine phosphorylated dna binding proteins in mouse liver nuclei. *Science* v. 261 p. 1733-1736, 1993.
- 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. Cellular physiology* v 159 p. 311-323, 1994.
- SADOWISKI, H. D., SHUAI, K., DARNEL, J. E. Jr., GILMAN, M. Z. A common nuclear signal transduction pathway activated by growth factor and cytokine receptors. *Science* v. 261 p. 1739-1744, 1993.
- SAKAMOTO, K. M., NIMER, S. D., ROSENBLATT, J. D., GASSON, J. C. HTLV-I and HTLV-II tax trans-activate the human EGR-I promoter through different cis-acting sequences. *Oncogenes*. v.7 p. 2125-2130, 1992.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATS, T. Molecular cloning A laboratory manual 2nd Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, books 1 and 2.
- SCHMELZ, M., SODEIK, B., ERICSSON, M., WOLFFE, E., SHIDA, J. H., HILLER, G., GRIFFITHS, G. Assembly of Vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. *J Virol* v. 68 p. 130-47, 1994.
- SCHREIBER, M., McFADDEN, G. The myxoma virus TNF-receptor homologue (T2) inhibits tumor necrosis factor-alpha in a species-specific fashion. *Virology* v. 204 p. 692-705, 1994.
- SMITH, G. L. Vaccinia virus glycoproteins and immune evasion. The sixteenth Fleming Lecture *J. Gen. Virol.* v. 74 p. 1725-1740, 1993.

- 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 p. 521-541, 1993.
- SILVENNOINEN, O., SCHINDLER, C., SCHLESSINGER, J. LEVY, D. E. Ras independent growth factor signaling by transcription factor tyrosine phosphorylation. *Science*, v.261 p. 1736-1739, 1993.
- SPRIGGS, M. K., HRUBY, D. E., MALISZEWSKI, C. R., PICKUP, D. J., SIMS, J. E., BULLER, R. M., VANSLYKE, J. Vaccinia and cowpox viruses encode a novel secreted interleukin-1-binding protein. *Cell* v. 71 p. 145-152, 1992.
- STARK G.R., KERR I. M., WILLIAMS B. R., SILVERMAN R. H., SCHREIBER R. D. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem.* v. 67 p. 227-64, 1998.
- STROOBANT, P., RICE, A. P., GULLICK, W. J., CHENG, D. J., KERR, I. M., WATERFIELD, M. D. Purification and characterization of Vaccinia virus growth factor. *Cell* v. 42 p. 383-393, 1985.
- SYMONS, J. A., ALCAMI, A., SMITH, G. L. Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity. *Cell* v. 81 p. 551-560, 1995.
- SU, Z. Z., YEMUL, S., STEIN, C.A., AND FISHER, P. B. c-fos is a positive regulator of carcinogen enhancement of adenovirus transformation. *Oncogene* v. 10 p. 2037-2049, 1995.
- SUKHATME V. P. Early transcriptional events in cell growth: the Egr family. *J Am Soc Nephrol.* v. 1 p. 859-866, 1990.
- SUKHATME, V.P., CAO, X., CHANG, L.C., TSAI-MORRIS, CH., STAMENKOVICH, D., FERREIRA, P.C.P., COHEN, D.R., EDWARDS, S.^a, SHOWS, T.B., CURRAN, T., BEAU, M.M.L., ADAMSON, E.D. A Zinc Finger-Encoding Gene Coregulated with c-fos during Growth and Differentiation, and after Cellular Depolarization. *Cell* v. 53 p. 37-43, 1988.

- 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 p. 212-224, 1997.
- TREISMAN, R. The serum response element. *TIBS.* v. 17 p. 423-426, 1992.
- 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. 26 p. 8835-46, 1988.
- TWARDZIK, D. R., BROWN, J.P., RANCHALIS, J.E., TODARO, G.J., MOSS, B. Vaccinia virus infected cells release a novel polypeptide functionally related to transforming and epidermal growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* v 82 p. 5300-5304, 1985.
- UEDA, Y., MORIKAWA, S., WATANABE, K. Unclassified Poxvirus: characterization and Physical Mapping of Cotia Virus DNA and Location of Sequence Capable of Encoding a Thymidine Kinase. *Virology* v. 210 p. 67-72, 1995.
- UPTON, C., MOSSMAN, K., MCFADDEN, G. Encoding of a homolog of the IFN-gamma receptor by myxoma virus. *Science* v. 258 p. 1369-1372, 1992.
- VANSLYKE, J. K., HRUBY, D. E. Immunolocalization of vaccinia virus structural proteins during virion formation. *Virology* V. 198 p. 624-635, 1994.
- VIEIRA, K. B. L., GOLDSTEIN, D. J., VILLA, L. L. Tumor Necrosis Factor α interfere with the cell cycle of normal and Papillomavirus-immortalized human keratinocytes. *Cancer Research* v 56 p. 2452-2457, 1996.
- VENKATESAN, S., GERSHOWITZ, A., MOSS, B. J. Complete nucleotide sequences of two adjacent early vaccinia virus genes located within the inverted terminal repetition. *Virol.* v. 44 p. 637-646, 1982.
- WATERS, S. B., HOLT, K. H., ROSS, S. E., SYU, L. J., GUAN, K. L., SALTIEL, ^a R., KORETZKY, G. A., PESSIN, J. E. Desensitization of Ras

- activation by a feedback disassociation of the SOS-Grb2 complex. *J Biol Chem.* v 270 p. 20883-20886, 1995.
- WHITMARSH, A. J., YANG, S.H., SU, M. S., SHARROCKS, A.D., DAVIS, R. J. Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. *Mol Cell Biol* v. 17 p. 2360-2371, 1997.
- XU J, ROCKOW S, KIM S, XIONG W, LI W. Interferons block protein kinase C-dependent but not-independent activation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinases and mitogenesis in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol.*v.14 p. 8018-8027, 1994.
- YAN Y. X., NAKAGAWA H., LEE M. H., RUSTGI A. K. Transforming growth factor-alpha enhances cyclin D1 transcription through the binding of early growth response protein to a cis-regulatory element in the cyclin D1 promoter. *J Biol Chem.* v. 272 p. 33181-90, 1997.
- 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 beta 1 gene through an Egr-1 binding site. *J.Virol.* v 70 p. 7062-7070, 1996
- 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 p. 388-395, 1996.
- ZHANG, Y., AHN, B. Y., MOSS, B. J. Targeting of a multicomponent transcription apparatus into assembling vaccinia virus particles requires RAP94, an RNA polymerase-associated protein. *Virol* v. 68 p. 1360-1370, 1994.