
KÁTIA SILENE DE BRITO

**CONSTRUÇÃO DE HÍBRIDOS DOS
INTERFERONS HUMANOS β E α_2 : PAPEL DAS
 α -HELICES E ALÇAS NA ATIVIDADE
BIOLÓGICA**

**ORIENTADOR: PROF. PAULO CÉSAR PEREGRINO FERREIRA
CO-ORIENTADORA: PROF. ERNA GEESIEN KROON**

TESE APRESENTADA NO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.

Belo Horizonte
2005

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

**À DEUS,
Pelo seu infinito amor;
Fonte de toda sabedoria;
Presença contínua em minha vida!**

MÃE,

Presença constante em minha vida...

**Quem me ensinou os primeiros passos, as primeiras
palavras...**

Amor sublime, Amor eterno, Amor sem dimensão...

**Amor em todo momento, nos atos de cada capítulo de
minha vida não ensaiados, mas vividos em cada emoção...**

À você, mãezinha, que me inspira a caminhar,

Meu eterno agradecimento!

Ao MEU AMOR,

**Que está ao meu lado e que me faz feliz;
Que compartilha comigo meu sonho e que acredita
em minha vitória;
Que faz parte desta conquista;
Que faz parte da minha vida!**

Obrigada, pelo seu amor!

AGRADECIMENTOS

O meu sincero muito obrigada:

Ao professor Dr. Paulo César Peregrino Ferreira pela orientação, amizade, apoio e incentivo que foram essenciais no meu aprendizado e na minha vida acadêmica. Por acreditar em mim e por me fazer entender que sou uma profissional valiosa...

À professora Dra. Erna Geessien Kroon, por ter me acolhido quando ainda era só uma “Menininha”, que tinha muitos sonhos e que conseguiu tornar um destes sonhos, em realidade! Obrigada pela oportunidade me dada, de participar de uma equipe maravilhosa, que muito me ensinou.

Ao professor Dr. Cláudio Antônio Bonjardim, pelos auxílios prestados e por fazer parte desta equipe de professores, que contribuíram para meu crescimento.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Microbiologia, que sem dúvida alguma, contribuíram imensamente em minha formação.

Aos professores de outros departamentos (bioquímica, parasitologia, genética) que também me ensinaram e contribuíram para minha formação.

Aos professores Marcelo Santoro e Oscar, pela presteza e pelas dicas importantes, que contribuíram para o andamento de meu trabalho.

À saudosa Bernadete, pelos primeiros ensinamentos obtidos neste laboratório. Ensinamentos científicos e ensinamentos de vida! Ensinamentos que nos ajudam a ver a vida, através de lentes do amor, da amizade e do respeito. À você Berná, minha eterna gratidão e saudade...

À “tia Ângela”, sempre prestativa, sempre disposta a nos ajudar. Obrigada tia Ângela, por ser nossa tão eficiente secretária... Obrigada por ser nossa TIA ANGELA!

À Cida e Ildinha, por todos estes anos de trabalho, pela convivência de dez anos e por sempre facilitar nossos experimentos, lavando, embalando, montando, autoclavando... nossos materiais. Obrigada, meninas, pela enorme contribuição.

Ao “velhinho” Jonh, pela sabedoria que nos passa. Pela forma de nos ensinar. Pelo seu jeito especial de ser e por se fazer a cada dia uma pessoa mais especial! Obrigada, Jonh, porque você esteve comigo desde o início. Porque você me ensinou que se quero alguma coisa, tenho que correr atrás. Obrigada, por tudo.

Ao Alex, por ser uma pessoa maravilhosa, que me ensinou a dar os primeiros passos no laboratório de vírus. Que dividiu comigo o que sabia e me ajudou a crescer.

À Cíntia, minha maninha, minha companheira de vida, minha companheira de trabalho. Que me ajudou muito nos momentos finais de minha tese, tanto me auxiliando nos experimentos, como também me dando apoio e incentivo. Que se mostra a cada dia uma pessoa maravilhosa. Obrigada, Cíntia, por ser minha irmã e amiga. Você também é uma vencedora!

Ao Zezinho, meu cunhadinho, que está presente em minha vida como família, fazendo minha irmã feliz, e como companheiro de trabalho. Obrigada por tudo!

À Jaque, pela amizade, carinho e afeto. Pela presteza e pela oportunidade de vê-la crescer profissionalmente e de saber que fiz parte da sua jornada. Você é uma pessoa especial para mim. Você é uma pessoa que acredita nos seus sonhos e que vai atrás deles. Você é uma vencedora!

À Landinha, Paty, Chris e Leozinha. Não poderia fazer este agradecimento separado. Não poderia, porque vocês não se separam dentro do meu coração. Não poderia, porque cada uma de vocês é parte de um conjunto. Conjunto que se resume em amor, companherismo, amizade, respeito, dedicação, luta, união, dor, saudade, tristeza, alegria e todos os outros sentimentos que nos tornaram grandes amigas! Obrigada, minhas amigas, porque sempre pude contar com vocês! Obrigada, porque juntas, nos tornamos vencedoras, juntas mostramos ao mundo do que somos capazes!!! Nunca esquecerei de vocês!!!

À todos os amigos do laboratório:

Breno, Lina, Filipis, Ana Paula, Gustavo, Daniel, Marcelão, Gabriel, Flavinha, Leandra, Bruninho, Bruno cachaceiro, Isabel, Ana Maria, Ana Paula 2, Gracie, Luciana, Amanda, Thiago, Luís e Fabiano. Obrigada pela convivência diária. Pela ajuda em diversos experimentos. Pelas contribuições dentro e fora do laboratório. Por fazerem parte desta jornada e porque hoje posso dizer: Fiz muitos amigos!!!

À Jamária, Renata e Juju, porque além de amigas, são pessoas muito prestativas. Jamas, sempre pronta pra auxiliar no computador. Re, sempre pronta a me ouvir e me aconselhar. Juju, com seu jeitinho de ser, sempre pronta a tudo! Obrigada, meninas!

À Betânia, sempre pronta pro que der e vier. “Sequenciadora de minhas sequências”. Beth, você é uma espécie de “coisa do outro mundo”. Onde você chega, você conquista. Onde você chega, você faz muitos amigos... Sabe por que? Porque você é boa, prestativa, alegre, inteligente, de poucas palavras, mas de muitos gestos! Obrigada, Beth!

Ao Danilo, anjo bom que caiu do céu! Que me ajudou muito nos experimentos finais, não só na prática, mas me dando incentivo, me falando sempre: “Fica calma Katinha, vai dar tudo certo!” Você é uma pessoa muito sábia. Tenho certeza que Deus preparou algo muito especial pra você. À você, meu sincero muito obrigada.

À todos os colegas e amigos que já passaram pelo laboratório. Não vou citar todos os nomes, pois são muitos, mas no fundo do meu coração, sou grata á todos vocês! Marco, Anderson, Isabela, Jaqueline, Maurício, Flavinho, Alexandre, Waleska, Monique, Alzira, Giliane, João Marques, Daniela, Olga, Valéria, Ricardo, Marcinha, Daniela, Sarinha e muitos outros...

Às meninas do LVC, por me socorrer em vários momentos quando precisei de várias coisas... Pelas alegrias compartilhadas nos congressos... Enfim, obrigada pela convivência.

Aos meus amigos fora do laboratório, por dividirem comigo minhas alegrias, minhas angústias, minha ansiedade em terminar meu trabalho. Por me ouvirem quando precisei.

Por acreditarem em mim. Não vou citar seus nomes, porque, graças a DEUS, são muitos os meus amigos...

À “super poderosa Florzinha”, amiga de longos anos, amiga das gandaias, amiga de todos os momentos...

À minha sogrinha, por ser tão dedicada e atenciosa e por ter me ensinado que na vida os obstáculos são muitos, mas nossa vontade de vencer é muito maior. Você é um exemplo de conquista! Agradeço a Deus por sua existência e agradeço por ter colocado você no meu caminho!

Ao meu pai, por estar em minha vida, às vezes um pouco distante, mas sempre presente através do seu amor.

Ao meu irmão, por torcer por mim e estar presente em minha vida.

À minha família, alicerce de tudo que construí! Não poderia citar os nomes de todos, afinal são muitos, mas posso dizer que vocês são a base de tudo em minha vida.

Aos meus queridos avós, Vó Néia, Vô Grimaldo, Vó Maria e ao saudoso Vô Humberto. Obrigada por que vocês um dia se encontram e por isso hoje estou aqui. Meu sucesso é fruto do amor que vocês sempre tiveram com nossa família. Obrigada!

Aos meus ex-alunos da UFOP, que me fizeram entender que ser professor não é só saber ensinar, mas é aprender mais a cada dia!

À todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para este trabalho, que por ventura me esqueci de citar, meu sincero **MUITO OBRIGADA!!!**

ÍNDICE

	Página
1 – INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 – Os interferons	5
2.2 – Classificação e nomenclatura	5
2.2.1 – Produção dos Interferons	8
2.3 – Genes e estrutura	12
2.3.1 – O IFN- α	12
2.3.2 - O IFN- β	13
2.3.3 – O IFN- ω	14
2.3.4 - O IFN- λ	14
2.3.5 - O IFN- κ	14
2.3.6 - Os IFN- γ	15
2.4 – A estrutura tridimensional	15
2.5 – Receptores celulares e transdução de sinal	22
2.6 – Atividades biológicas dos interferons	27
2.6.1 – Atividade antiviral	27
2.6.2 – Atividade antiproliferativa	28
2.7 – Uso clínico dos IFN	28
2.8 – Relação entre estrutura e função	29
2.9 – Os interferons híbridos	34
2.9.1 – Híbridos de IFN- α	34
2.9.2 - Híbridos entre espécies de IFN- α	37
2.9.3 - Híbridos de IFN- β/α	37
3 – OBJETIVOS	40
3.1 – Objetivo geral	41
3.2 - Objetivos específicos	41
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 – Construção dos híbridos	43
4.1.1 – Os iniciadores	43
4.1.2 – Amplificação por PCR	45
4.1.3 - Fracionamento eletroforético e purificação do produto de PCR	46
4.2 – Clonagem	47
4.2.1 – Ligação dos produtos de PCR	47
4.2.2 – Preparo das bactérias competentes	47
4.2.3 – Transformação bacteriana	48
4.2.4 - Identificação dos clones	48
4.3 - Extração do DNA plasmidial	49
4.3.1 - Preparação em pequena escala	49
4.3.2 - Preparação em larga escala	49
4.4 – Sequenciamento	50
	51

4.5 – Produção e purificação dos interferons recombinantes	51
4.5.1 – Purificação das proteínas recombinantes	53
4.5.2 – Caracterização das proteínas em gel de SDS-PAGE	54
4.6 – Ensaio biológicos	54
4.6.1 – Células	55
4.6.2 – Os vírus	56
4.7 - Medida da atividade biológica	56
4.7.1 – IFN padrão e anticorpos utilizados	56
4.7.2 – Medida da atividade antiviral	57
4.7.3 - Neutralização da atividade antiviral	57
4.8 – Genes induzidos em células: obtenção do RNA total e hibridização	57
4.8.1 – Extração do RNA celular total	57
4.8.2 – Fracionamento eletroforético dos RNA	58
4.8.3 – Transferência de “Northern”	59
4.8.4 – Sondas moleculares	59
4.8.5 – Marcação isotópica das sondas moleculares	60
4.8.6 – Hibridização	60
4.9 – Análise dos interferons por “western Blot”	61
4.9.1 – Fracionamento eletroforético e transferência das proteínas	61
4.9.2 – Reação com anticorpos e revelação	61
5 – RESULTADOS	62
5.1 – Construção dos IFN recombinantes e híbridos	63
5.1.1 – Amplificação dos fragmentos dos genes que codificam para os Interferons	63
5.1.2 – Cadeia de aminoácidos dos híbridos construídos	66
5.2 - Clonagem dos interferons recombinantes híbridos em vetor pGEM-T	68
5.3 – Transferência dos interferons recombinantes e híbridos para vetor de expressão	70
5.4 – Produção dos interferons	72
5.5 - Análise da expressão dos genes dos interferons recombinantes híbridos em bactérias <i>E. coli</i> M15	78
5.6 – Análise da produção do interferon híbrido rHuIFN- α 44 β 106 α , por ensaio de western blot	80
5.7 - Purificação dos interferons	82
5.8 – Atividades Biológicas	92
5.8.1 – Efeito do β -mercaptoetanol e do tampão de amostra na multiplicação do vírus EMC, em células Vero	96
5.8.2 – Atividade antiviral em diferentes sistemas celulares	98
5.9 - Neutralização da atividade antiviral dos interferons recombinantes e híbridos em células Vero, por anticorpo anti- α	106
5.10 – Análise dos níveis da acumulação de mRNA dos genes induzidos pelos interferons recombinantes e híbridos	108
6 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	113
6.1 – Construção e clonagem dos interferons humanos e híbridos	114
6.2 – Produção e purificação dos interferons	114
6.3 – Atividades biológicas	117
6.3.1 – Atividade antiviral dos IFN recombinantes e híbridos - rHuIFN- β ,	119

rHuIFN- β 97, rHuIFN- α 94, rHuIFN- β 97 α e rHuIFN- α 44 β 106 α	
6.3.2 – Relação entre estrutura e função das α -hélices e alças dos IFN recombinantes e híbridos, nos diferentes sistemas celulares	123
6.4 - Neutralização da atividade antiviral	127
6.5 - Genes induzidos pelos interferons recombinantes e híbridos	128
6.6 – Considerações finais e perspectivas	131
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
FIGURA 1 – Via de sinalização celular envolvida na produção do IFN- β	10
FIGURA 2 - Modelo estrutural do rHuIFN- α_{2a}	19
FIGURA 3 – Sobreposição da estrutura conformacional dos rHuIFN- α_{2b} e MuIFN- β .	21
FIGURA 4 - Transdução de sinal induzida pelos IFN α/β , IFN- λ e o IFN- γ .	26
FIGURA 5 – Pareamento dos aminoácidos inferidos da seqüência de nucleotídeos dos interferons beta murino (Mu β), beta humano (Hu β) e alfa 2 humano (Hu α).	31
FIGURA 6 - Principais regiões do sítio de clonagem do plasmídeo pDS ₅₆ .	52
FIGURA 7 – Amplificação por PCR dos fragmentos clonados dos nucleotídeos que codificam para os HuIFN- α_{2b} e HuIFN- β , para inserção do sítio da enzima Mlu I.	65
FIGURA 8 – Representação da seqüência de aminoácidos dos IFN híbridos	67
FIGURA 9 – Seleção dos interferons recombinantes híbridos inseridos em pGEM-T.	69
FIGURA 10 – Transferência dos interferons recombinantes e híbridos para vetor de expressão.	71
FIGURA 11 – Produção dos híbridos rHuIFN- $\alpha_{44}\beta_{106\alpha}$, em <i>E.coli</i> M15.	73
FIGURA 12 – Produção dos IFN recombinantes híbridos, em <i>E.coli</i> M15.	75
FIGURA 13 – Produção do IFN híbrido rHuIFN- $\alpha_{94}\beta$, em <i>E. coli</i> M15	77
FIGURA 14 - Análise do mRNA dos interferons recombinantes híbridos após 5 horas de indução das bactérias M15.	79
FIGURA 15 – Análise da produção do interferon híbrido rHuIFN $\alpha_{44}\beta_{106\alpha}$, por ensaio de Western Blot.	81
FIGURA 16 – Purificação do interferon recombinante rHuIFN- α_{94} .	83
FIGURA 17 - Purificação do interferon rHuIFN- $\beta_{97\alpha}$.	85
FIGURA 18 – Purificação do interferon recombinante rHuIFN- β_{97} .	87

FIGURA 19 - Purificação do interferon recombinante rHuIFN- β .	89
FIGURA 20 - Purificação do interferon híbrido rHuIFN- α 44 β 106 α .	91
FIGURA 21 - Título dos interferons recombinantes híbridos, em células Vero.	93
FIGURA 22 – Título dos interferons recombinantes híbridos purificados, em células Vero	95
FIGURA 23 – Efeito do β mercaptoetanol e do tampão de amostra na multiplicação do vírus EMC, em células Vero	97
FIGURA 24 - Atividade antiviral dos interferons recombinantes em células VERO.	101
FIGURA 25 - Atividade antiviral dos interferons recombinantes em células Wish.	102
FIGURA 26 - Atividade antiviral dos interferons recombinantes em células MDBK, desafiadas com o vírus EMC.	103
FIGURA 27 - Atividade antiviral dos interferons recombinantes em células MDBK, desafiadas com o BHV-1.	104
FIGURA 28 - Comparação da atividade antiviral dos interferons recombinantes, nos diferentes sistemas celulares.	105
FIGURA 29 - Neutralização da atividade antiviral dos interferons recombinantes em células Vero, por anticorpo Anti- α .	107
FIGURA 30 - Acumulação dos mRNA dos genes 2'5'OAS e 6-16, induzidos pelos interferons recombinantes e híbridos, em células Wish.	110
FIGURA 31 - Acumulação do mRNA do gene MxA, induzido pelos interferons recombinantes e híbridos, em células Wish.	111
FIGURA 32 - Acumulação do mRNA do gene GBP, induzido pelos interferons recombinantes e híbridos, em células L-929.	112
TABELA 1 – Nomenclatura dos subtipos de IFN- α	
TABELA 2 - Título dos interferons (U/ml) obtidos em células VERO, WISH e L-929 desafiadas com o vírus EMC	7
TABELA 3 - Título dos interferons (U/ml) obtidos em células MDBK desafiadas com os vírus EMC e BHV-1.	100
	100

ABREVIATURAS

AE – Atividade específica
BSA - Albumina bovina sérica
cDNA - DNA complementar ao mRNA
CHO - Células de ovário de hamster chinês
CML - Leucemia mielogênica crônica
CpG DNA – DNA dupla fita não metilado
DNA - Ácido desoxiribonucléico
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) - Deoxinucleotídeos
D.O - Densidade óptica
ECP - Efeito citopático
g - força gravitacional
G-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos
GH – Hormônio do crescimento
HuIFN – Interferon humano
IFN - Interferon
IFNAR-1 e IFNAR-2 - Receptores celulares para IFN tipo I
IFN γ R-1 e IFN γ R-2 – Receptores celulares para IFN tipo II
IFN λ R-1 e IL10R-2 - Receptores celulares para IFN- λ
IL - Interleucinas
IPTG - Isopropil β -D-Tiogalactopiranosídeo
kb - Quilobases
kDa – Quilodaltons
LPS - Lipopolissacarídeo
mAbs - Anticorpos monoclonais
MEM - Meio essencial mínimo
mg - miligramas
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade
ml – Mililitro
MM – Massa Molecular
mM - Milimolar
MuIFN - Interferon murino
 μ l - Microlitro
NK - células “natural killer”
 η g - nanograma
NI-NTA – Níquel-Ácido nitrilo triacético
pb - pares de base do DNA
P/V - Peso por volume
PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAGE/SDS - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
PBS - Solução salina tamponada contendo fosfato
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PHA - Fitohemaglutinina
 μ M – Picomoles
RIG-I – Gene induzido por ácido retinóico
RNA - Ácido ribonucléico
rpm - Rotações por minuto
SBF - Soro fetal bovino
SDS - Duodecil sulfato de sódio

TCID₅₀ - Dose infectiva para 50% das culturas de células

TLR – Receptores “Toll-Like”

U - Unidades

v/v - Volume por volume

Aminoácidos:

A – Alanina

R – Arginina

N – Asparagina

D – Ácido aspártico

C – Cisteína

E – Ácido glutâmico

Q – Glutamina

G – Glicina

H – Histidina

I – Isoleucina

L – Leucina

K – Lisina

M – Metionina

F – Fenilalanina

P – Prolina

S – Serina

T – Treonina

W – Triptofano

Y – Tirosina

V – Valina

SUMÁRIO

Os interferons (IFN) são proteínas envolvidas em processos de defesa do organismo, derivadas da resposta celular a microorganismos, tumores e antígenos e são classificados em tipo I, compreendendo os IFN- α , IFN- β , IFN- ω , IFN- ι , IFN- κ e IFN- ε , tipo II (IFN- γ) e uma nova família descrita como IFN- λ -1, IFN- λ -2 e IFN- λ -3. Estas proteínas uma vez produzidas interagem com receptores específicos das células, ativando sinais citoplasmáticos que, por sua vez, são dirigidos ao núcleo para estimularem genes que codificam proteínas responsáveis pelos mecanismos de defesa celular. Os receptores da superfície celular descritos são de três tipos: um receptor que interage com os IFN tipo I, um que reage com IFN- ω e um terceiro que reage com os IFN- λ . Apesar do avanço alcançado na elucidação ou compreensão dessas interações, entre os interferons tipo I com seus receptores celulares, estes mecanismos não foram ainda satisfatoriamente esclarecidos.

Em relação a sua estrutura, os interferons fazem parte da família de citocinas helicoidais, apresentando uma estrutura tridimensional em α -hélices. A molécula é constituída por 5 α -hélices (**A**, **B**, **C**, **D** e **E**), ligadas entre si por alças (**ab**, **bc**, **cd** e **de**). A estrutura tridimensional dos IFN humanos tipo I já foi descrita e mostra uma semelhança significativa entre os HuIFN- α_2 e HuIFN- β . Essa semelhança é de extrema importância no entendimento das interações das moléculas com seus receptores celulares e permitem o mapeamento de regiões envolvidas neste processo, assim como um melhor entendimento dos mecanismos desencadeados, após interação com seus receptores celulares. Estudos realizados no laboratório de vírus com os IFN humanos tipo I (HuIFN- α_2 e HuIFN- β) mostram significativas mudanças na sua atividade quando seus aminoácidos são modificados ou substituídos, o que pode causar uma diminuição substancial na atividade e ligação ao seu receptor, como demonstrado em células bovinas.

Neste trabalho foi utilizado como estratégia a introdução de sítios de restrição entre 5 α -hélices e alças dos IFN humanos tipo I (HuIFN- α_2 e HuIFN- β), de modo a substituir as α -hélices **B**, **C**, **D**, **E** e alças **bc**, **cd** e **de**, cujas participações têm sido sugeridas em

funções biológicas das moléculas entre os interferons tipo I. Desta forma, a estrutura básica funcional do rHuIFN- β e do rHuIFN- α foram mantidas, permitindo o estudo do papel das α -hélices e alças nas diferentes atividades biológicas destes IFN, particularmente na sua espécie especificidade.

As construções mostraram diferenças na produção e purificação da proteína, na atividade antiviral em células Vero, Wish, MDBK e L929, indicativo da modificação da espécie especificidade quando comparadas àquela dos rHuIFN- α_{2b} e rHuIFN- β . Os híbridos rHuIFN- $\beta_{97\alpha}$ e rHuIFN- $\alpha_{44\beta}106\alpha$ apresentaram menor atividade antiviral em células Vero, quando comparado ao rHuIFN- β , não modificado. Entretanto, a atividade antiviral observada em células MDBK não foi alterada, como também não foi observada atividade antiviral em células L-929.

Os IFN construídos foram capazes de estimular os genes (6-16, 2'5'OAS e MxA) já descritos como induzidos por IFN. Em células Wish foi observado o acúmulo dos mRNA de todos os genes testados, com algumas variações nos níveis de acumulação destes mRNA. Em células L-929, o acúmulo do mRNA do gene induzido por IFN, GBP, não foi observado para nenhum dos IFN testados, o que está de acordo com a ausência da atividade antiviral nestas células.

SUMMARY

Interferons are proteins involved in the organism defense processes, derived from cellular responses to microorganisms, tumors and antigens and are classified in type I, comprehending the IFN- α , IFN- β , IFN- ω , IFN- ι , IFN- κ and IFN- ε , type II (IFN- γ) and a new family described as IFN- λ -1, IFN- λ -2 and IFN- λ -3. These proteins bind to specific cells receptors, activating cytoplasmatic signals that are directed to the nucleus to stimulate genes that codifies proteins responsible by the cellular defense mechanism. The described cellular surface receptors are three types: a receptor that interacts with IFN type I, one with IFN- γ and another with IFN- λ . Despite all the research and knowledge about these interactions, between interferons type I with your or yours receptors, these mechanisms have not been clarified satisfactorily.

In relation to its structure, the interferons are part of the helicoidally cytokines family, presenting a three-dimensional structure in α -helixes. The molecule is constituted by 5 α -helixes (**A**, **B**, **C**, **D** and **E**), joined to each other by grips (**ab**, **bc**, **cd** and **de**). The three-dimensional structure of the human IFN type 1 has been described and presents a significant similarity between the HuIFN- α_2 and HuIFN- β . This similarity is of extreme importance in the understanding of the interactions of the molecules with their cellular receptor and allows the mapping of regions involved in this process, as a better understanding in the triggered mechanisms, after interaction with their cellular receptors. Studies with the humans IFN (HuIFN- α_2 and HuIFN- β) shows significant changes in their activity when their aminoacids are modified or deleted, what can cause a substantial reduction in the activity and binding to their receptor, as demonstrated in bovine cells.

The strategy used in this work was the introduction of restrictions sites between the 5 alfa-helixes and grips of the humans IFN type I ($-\alpha_2$ and $-\beta$), in order to substitute the α -helixes **B**, **C**, **D**, **E** and grips **bc**, **cd** e **de**, whose participations has been sugested in biological functions of the IFN type I. Therefore, the basical functional structure of the rHuIFN- β and rHuIFN- α were kept, allowing the study of the roles of the α -helixes and grips in the diferent biological function of these IFN, particularly in their specie specificity.

The constructions presented differences in the production and purification of the protein. The modifications done in the structure of the HuIFN- α and HuIFN- β , showed alterations in the antiviral and specie specificity in Vero, Wish, MDBK and L929 cells when compared to those of the rHuIFN- α_{2b} . Two hybrids that were constructed (rHuIFN- $\beta_{97\alpha}$ and rHuIFN- $\alpha_{44\beta_{106\alpha}}$) presented lower antiviral activity in Vero cells, when compared the controls rHuIFN- β and rHuIFN- β_{97} ; however, the antiviral activity observed in MDBK cells were equal to those observed with the controls. Furthermore, neither of the constructed IFN presented antiviral activity in L-929 cells.

Todos os IFN construídos foram efetivos nas induções de genes já descritos como induzidos por IFN. O acúmulo dos mRNA de todos os genes testados em células Wish (6-16, 2'5'OAS e MxA) foi observado, com algumas variações nos níveis de acumulação destes mRNA. Entretanto, em L-929, o acúmulo do mRNA do gene induzido por IFN, GBP, não foi observado para nenhum dos IFN testados. Essa ausência de acúmulo deste mRNA pode ser explicada em parte, uma vez que estes IFN também não mostraram atividade antiviral nestas células.

All the constructed IFN were efficient in the induction of genes already reported as induced by IFN. The accumulation of mRNA of all the genes (6-16, 2'5'OAS e MxA) assayed in Wish cells were observed, with some accumulation level variations of these mRNA. Although, in L-929 cells, the mRNA accumulation of the GBP gene, induced by IFN, was not observed for neither of the tested IFN. One explanation for this absence of mRNA accumulation can be the fact that these IFN did not show antiviral activity in these cells.

This study brought contributions for a better understanding of the structures and function of the humans IFN type I (HuIFN- α_2 and HuIFN- β), as also rised other questions related to these molecules, what leads to perspectives for future studies with these cytokines.

1 - INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Desde a descoberta dos interferons como potentes agentes antivirais, muitos estudos estão sendo feitos com o objetivo de entender mais a respeito das diversas atividades biológicas desencadeadas por estas citocinas, nas diversas células onde são sintetizadas. Todos os estudos obtidos com estas citocinas reforçam cada vez mais a importância destas, no desenvolvimento de uma resposta imune eficaz, contra vários patógenos e substâncias mitogênicas. A eficiência em estimular o sistema imune do hospedeiro, assim como em induzir uma grande variedade de genes que codificam para enzimas regulatórias do ciclo celular ou estão envolvidas em processos de defesa contra agentes virais, é cada vez mais notória e estas descobertas vêm aumentando a possibilidade do uso destas citocinas como potentes agentes antivirais e antitumorais.

Atualmente, os IFN tipo I (α/β) estão sendo amplamente utilizados para o tratamento de diversas doenças. O uso dos HuIFN- α já foi aprovado pelo FDA, para o tratamento de várias doenças virais, dentre elas hepatites crônicas, causadas pelos vírus (HBV e HCV), doenças herpéticas (HSV) e no tratamento de várias doenças tumorais, como Sarcoma de Kaposi (KS) em pacientes com AIDS, linfoma folicular, leucemia de células cabeludas, condiloma acuminado, leucemia mielogênica crônica e outras. O HuIFN- β , já foi aprovado para o tratamento da esclerose múltipla.

Entretanto, os usos terapêuticos com estes IFN, também trazem vários problemas aos pacientes, por causa da grande quantidade de efeitos colaterais desencadeados. Vários destes efeitos podem ser citados, desde os mais brandos, como febres, mialgias, mal estar e fadiga, assim como efeitos mais severos, relacionados a toxicidades neurológicas, que podem levar a distúrbios como depressão, sonolência, confusão mental e vários outros. Sendo assim, faz-se necessário o melhor entendimento das interações destas citocinas com as células, assim como os mecanismos desencadeados nos processos de defesa celular estimulados por elas.

Esforços extensivos, particularmente com IFN humanos e murinos, têm sido feitos na elucidação da relação entre estrutura e função nos subtipos de HuIFN- α e do HuIFN- β , através de mutagênese sítio dirigida e a construção de moléculas híbridas. Apesar do avanço alcançado na compreensão das interações entre os interferons tipo I e seus receptores, estes mecanismos não foram ainda satisfatoriamente esclarecidos. Entretanto, a descrição da estrutura tridimensional da molécula do interferon MuIFN- β , do

HuIFN- α_2 e do HuIFN- β , abriu novas perspectivas e aponta para a associação das metodologias de mutações sítio-dirigidas e recombinantes híbridos, já empregadas isoladamente na compreensão das interações dos IFN com seus receptores e seu papel funcional.

O conhecimento da estrutura tridimensional permite manter a estrutura da molécula, no processo de construção de híbridos ou moléculas com modificações de domínios conservados, pela metodologia da engenharia genética. A importância da não alteração da estrutura tridimensional original da molécula é reforçada pelos testes de estabilidade, que mostram a dependência da estrutura conformacional da molécula à atividade antiviral. A existência das 5 α -hélices observadas tanto nos IFN- α quanto nos IFN- β e a estrutura conformacional similar dessas moléculas, permite um estudo mais detalhado na relação entre uma determinada α -hélice e o seu papel na atividade biológica na célula hospedeira. Para isso, a utilização da técnica de PCR, permite introduzir sítios para enzimas de restrição ao longo da sequência de nucleotídeos, de modo a substituir não apenas um, ou alguns aminoácidos, mas as α -hélices e alças. Esta abordagem permite mapear os domínios protéicos, cuja participação tem sido sugerida em funções biológicas da molécula entre os IFN tipo I.

Neste sentido o objetivo deste trabalho foi estudar a relação das α -hélices e alças nas atividades biológicas dos HuIFN- α/β , usando como estratégia a inserção de sítios de enzimas de restrição que permitem a substituição e troca destas estruturas pela correspondente do HuIFN- α ou HuIFN- β . Assim, mantendo a estrutura básica conformacional da molécula, foi possível o estudo do papel das α -hélices e alças na sua atividade biológica, bem como pressupor suas interações com o receptor ou receptores celulares.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- OS INTERFERONS

O interferon (IFN) foi descrito pela primeira vez por ISAACS E LINDENMAN em 1957, quando estes pesquisadores observaram que o sobrenadante proveniente de cultivos infectados com vírus da influenza inativado, era capaz de induzir a resistência a uma infecção posterior com vírus Influenza A, em células tratadas com este sobrenadante. A este fator solúvel, liberado no meio, foi dado o nome de Interferon, porque os autores estudavam o mecanismo de interferência viral e acreditaram ter descoberto a proteína responsável pelo fenômeno.

O IFN pertence à família das citocinas, que modulam a expressão de genes celulares, que após indução, são responsáveis pelas atividades biológicas, entre as quais o estabelecimento do estado antiviral, a inibição da multiplicação celular, o estímulo da atividade citotóxica de linfócitos, células NK e macrófagos, dos antígenos de MHC classe I e modulação do sistema imune. A atividade antiviral dos IFN foi, durante muitos anos, descrita como a sua única atividade biológica e se constitui na atividade que os distingue das demais citocinas celulares (JOKLIK, 1990; revisado por STARK, 1998).

2.2- CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA

Os IFN foram classificados inicialmente de acordo com as células que os produziam, como por exemplo, IFN de fibroblastos (IFN- β), que produziam uma forma resistente a pH 2,0 ou os de linfócitos, que além de produzirem um IFN resistente a pH 2,0 (IFN- α) produzem outro sensível (IFN- γ).

Atualmente, os IFN humanos são classificados em tipo I (α , β , ω , τ , κ e ε), tipo II (γ) e IFN- λ , sendo estes produzidos em resposta a uma grande variedade de estímulos. Os IFN- λ , recentemente descritos, foram classificados como membros da família de citocinas de classe II, e apresentam semelhança estrutural com os IFN tipo I e interleucina 10, sendo denominados IFN- λ -1, IFN- λ -2 e IFN- λ -3 (KOTENKO *et al.*, 2003) ou IL-28A, IL28B e IL29 (SHEPARD *et al.*, 2003). Apesar de similares aos IFN tipo I, estas citocinas ligam-se a receptores diferentes daqueles dos IFN tipo I, e são vistas como membros de uma família distinta (KOTENKO, *et al.*, 2003).

O IFN também é identificado por um prefixo, de acordo com a espécie animal de origem. Por exemplo, o IFN humano é designado HuIFN, o murino MuIFN, o bovino BoIFN e o ovino OvIFN. Além disso, os IFN recombinantes são designados rec ou r, como exemplo, o interferon recombinante humano rHuIFN. A denominação dos IFN- α é bastante confusa, podendo ser encontrada na literatura como alfabética ou numérica, em virtude de terem sido isolados e descritos por diferentes pesquisadores, utilizando vários sistemas de nomenclatura. A designação numérica, aprovada pelo Comitê de Nomenclatura da Sociedade Internacional para Pesquisa do Interferon, é a mais utilizada (DIAZ *et al.*, 1993), e está representada na TABELA 1 (HORISBERGER & DI MARCO, 1995). Os IFN- α consistem numa família de moléculas com cerca de 80 a 85% de similaridade na cadeia de aminoácidos. De acordo com as diferenças encontradas entre os aminoácidos das diferentes moléculas, estes são classificados em subtipos denominados IFN- α_1 , IFN- α_2 , IFN- α_8 e assim sucessivamente (DIAZ *et al.*, 1993). Como podemos observar na TABELA 1, a diferença entre os subtipos dos IFN pode estar relacionada com a mudança de apenas um aminoácido, como por exemplo, os IFN- α_{2a} e IFN- α_{2b} . A diferença entre estes dois subtipos é apenas no aminoácido da posição 23, sendo nesta posição no IFN- α_{2a} encontrado uma Lisina (K), e no IFN- α_{2b} , encontrada uma Arginina (R).

TABELA 1 - Nomenclatura dos subtipos de IFN- α .

Alfabética	Numérica
IFN- α A	[Lys ²³]IFN- α_2
IFN- α B	[Val ⁹⁸ , Leu ⁹⁹ , Cys ¹⁰⁰ , Asp ¹⁰¹] IFN- α_8
IFN- α B ₂	IFN- α_8
IFN- α C	IFN- α_{10}
IFN- α D	IFN- α_1
IFN- α F	IFN- α_{21}
IFN- α I	IFN- α_{17}
IFN- α I'	[His ₁₄] IFN- α_{17}
IFN- α J	[Met ⁶⁰] IFN- α_7
IFN- α J'	[Met ⁶⁰ , Glu ⁵⁹ , Arg ¹⁶¹] IFN- α_7

FONTE: HORISBERGER & DI MARCO (1995)

2.2.1- PRODUÇÃO DOS INTERFERONS

Os IFN são produzidos por vários tipos celulares, em resposta a diversos agentes indutores, tais como vírus, RNA de fita dupla, endotoxinas e exotoxinas bacterianas, micoplasmas, rickettsias e a indutores sintéticos como polinucleotídeos. Estes indutores da produção dos IFN são denominados PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos). O IFN- γ é produzido por linfócitos T e células NK (JOKLIK, 1990). O HuIFN- ω é produzido por leucócitos após estímulo viral e representa 15% da população dos HuIFN leucocitários (ADOLF, 1987), sendo também descritos em bovinos, eqüinos e ovinos (ADOLF *et al.*, 1991). O IFN- κ é produzido por queratinócitos após infecção viral, RNA de dupla fita ou mesmo após tratamento com IFN- γ ou IFN- β (LAFLEUR *et al.*, 2001). Os IFN- λ são produzidos por várias linhagens celulares, hematopoiéticas ou não, sendo também induzidos pela infecção viral e por RNA fita dupla. Os IFN- α/β são produzidos principalmente por leucócitos e fibroblastos, respectivamente.

O mecanismo pelo qual ocorre a indução da produção destas citocinas nas diferentes células, pelos diversos agentes indutores, até pouco tempo atrás era desconhecido. Atualmente, vários estudos têm sido importantes na elucidação dos processos relacionados à indução da expressão dos IFN. Os genes que codificam para os IFN- α/β são regulados por proteínas conhecidas como Fatores Reguladores de Interferons (IRF). Dois membros desta família de proteínas (IRF3 e IRF7) são absolutamente requeridos para a transcrição dos genes destes IFN (MATSUMOTO *et al.*, 2002; LEVY *et al.*, 2002). IRF3 é constitutivamente expresso na maioria dos tipos celulares, e juntamente com o fator de transcrição nuclear NF- κ B e a proteína ativadora AP-1, IRF3 regula a transcrição do gene do IFN- β . O IFN- β uma vez produzido, ativa a transcrição dos genes de IRF7, e as novas proteínas sintetizadas, regulam a transcrição de outros genes dos IFN tipo I (SATO *et al.*, 2000; KADOWAKI *et al.*, 2001). Um dos mecanismos de ativação de IRF3 é através de duas proteínas quinases denominadas TBK-1 e IKK ϵ . Estas quinases por sua vez, são ativadas por proteínas denominadas TANK, as quais participam da via de sinalização desencadeada pelos receptores denominados "Toll Like Receptors" TLR (FITZGERALD *et al.*, 2003). A descoberta destes receptores celulares trouxe inúmeras contribuições para o conhecimento do mecanismo de produção dos IFN tipo I. Estes receptores reconhecem uma variedade de componentes microbianos (PAMPs) e ativam

NF- κ B, assim como outras vias de sinalizações (FEARON, 1997; MEDZHITOV *et al.*, 1997; IMLER & HOFFMANN, 2001). Vários membros desta família de TLR (TLR1-11) já foram identificados em humanos (ADEREM & ULEVITCH, 2000; ROCK *et al.*, 1998; AKIRA *et al.*, 2001).

Muitos trabalhos demonstram a participação destes TLR na indução dos IFN- α/β , assim como na indução do IFN- λ . TLR3 e TLR4 foram mostrados como mediadores da resposta imune induzida por dsRNA, levando a ativação de NF- κ B e a produção do IFN- β , independentes da via de sinalização utilizada por estes receptores, descrita como MyD88 (MATSUMOTO *et al.*, 2002; KAWAI *et al.*, 2001; OSHIUMI *et al.*, 2003). MyD88 é uma proteína adaptadora, envolvida na via de sinalização de quase todos os membros da família de TLR (AKIRA *et al.*, 2001; HEMMI *et al.*, 2000; HAYASHI *et al.*, 2001; HEMMI *et al.*, 2002). OSHIUMI *et al.* (2003) mostraram uma nova molécula adaptadora denominada TICAM-I, a qual liga-se ao domínio TIR (domínio presente nos receptores “Toll-Like” e interleucina I), que participa na via de sinalização desencadeada por TLR3, na indução de IFN- β . A via de sinalização celular envolvida na produção do IFN- β , induzida pela ligação de dsRNA ao TLR3 e dos vírus aos receptores celulares, é mostrada na FIGURA 1. Após a ligação destes indutores aos receptores celulares, uma série de proteínas citoplasmáticas são ativadas, levando à fosforilação de IRF3 e NF κ B, os quais migram para o núcleo, ligando-se à regiões promotoras no DNA, levando à produção do IFN- β (FITZGERALD K., *et al.*, 2003).

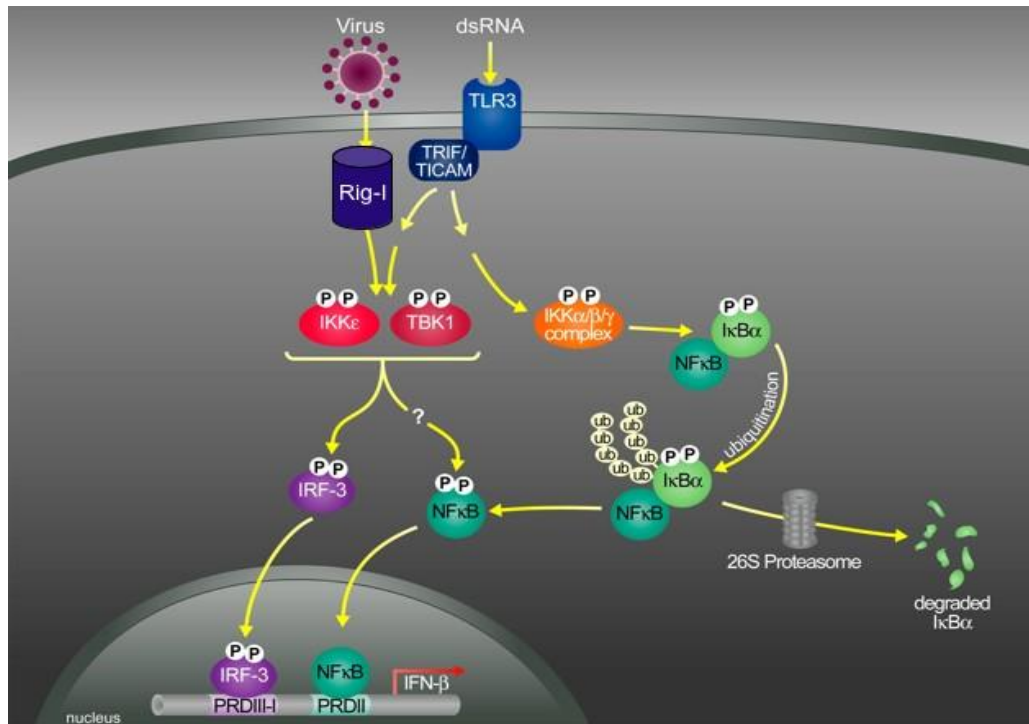


FIGURA 1: Via de sinalização celular envolvida na produção do IFN-β. Após a ligação dos vírus e dsRNA aos receptores da superfície celular, ocorre indução de uma série de proteínas citoplasmáticas, as quais são responsáveis pela fosforilação de IRF3 e NFκB. Uma vez fosforilados, IRF3 e NFκB migram ao núcleo, ligando-se à regiões promotoras no DNA, desencadeando assim, a transcrição do gene que codifica para o IFN-β e conseqüentemente, a produção desta citocina. Fonte: FITZGERALD K. *et al*, 2003.

A produção dos IFN- α , β , ω ou λ , em diferentes tipos celulares, foi demonstrada recentemente. Além disso, a indução destas citocinas está relacionada com os diferentes tipos de TLR. COCCIA *et al.* (2004) mostraram a expressão dos subtipos dos IFN- α , - β , - ω e - λ , em células dendríticas plasmocitóides (pDC) e células dendríticas derivadas de monócitos (MDDC), quando estas células foram infectadas com o vírus Influenza. Além disso, estes pesquisadores mostraram que, a indução da transcrição dos genes destes subtipos de IFN, foi relacionada com específicos TLR. A estimulação de TLR9 por CpG DNA, induziu a expressão de todos os subtipos de IFN em plasmócitos (pDC), enquanto que a estimulação de TLR3, por poli C, ou TLR4, por LPS, induziu somente a expressão dos genes de IFN- β e IFN- λ , em células dendríticas derivadas de monócitos (MDDC). A via completa de sinalização desencadeada pelos TLR, envolvendo a indução dos diferentes IFN ainda não está totalmente esclarecida, mas muitos estudos têm sido feitos, no sentido de elucidar este mecanismo.

2.3- GENES E ESTRUTURA

Os IFN são uma família de múltiplos genes de citocinas induzidas, possuindo diversas atividades biológicas (DIAZ *et al.*, 1993; STARK *et al.*, 1998). Os genes dos interferons humanos tipo I encontram-se no cromossomo 9 (DIAZ *et al.*, 1993). Os genes que codificam para os subtipos de IFN- α são constituídos de 567 pares de base (pb), incluindo a região do peptídeo sinal (69 pb). Os genes desta família são estreitamente relacionados antigênicamente e estruturalmente, em todas as espécies de mamíferos estudadas (VILCEK & SEN, 1996). O IFN- β é codificado por um único gene (TANIGUCHI *et al.*, 1980), composto de 561 pb, incluindo também a região do peptídeo sinal (63 pb). Outros genes que codificam para os IFN- ω , IFN- κ e IFN- ε foram também descritos (PESTKA, 1997; ORITANI *et al.*, 2001; LAFLEUR *et al.*, 2001; CONKLIN *et al.*, 2002). Todos os genes dos interferons tipo I estão agrupados, na espécie humana, no braço curto do cromossomo 9 e acredita-se que todos estes genes tenham evoluído a partir de um mesmo gene ancestral (VILCEK & SEN, 1996). Os genes dos interferons tipo I não possuem introns, com exceção dos genes dos IFN- κ , que possuem um intron (LAFLEUR *et al.*, 2001).

Os genes que codificam para os interferons HuIFN- λ , possuem 588 a 615 pb, sendo a região de peptídeo sinal de 66 pb. Estes genes encontram-se no braço curto do cromossomo 19, de forma semelhante aos membros da família IL-10 das citocinas e possuem introns (KOTENKO *et al.*, 2003).

O gene do IFN- γ possui 558 pb, sendo a região de peptídeo sinal de 60 pb. Este gene contém 3 introns e localiza-se no cromossomo 12. Não há homologia estrutural significativa entre os IFN do tipo I e do tipo II (IJZERMANS & MARQUET, 1989).

2.3.1- O IFN- α

Os IFN- α são codificados por 14 genes não alélicos e 4 pseudogenes, apresentando uma similaridade dos aminoácidos entre si de 80 a 85%. Dentre os 14 subtipos de HuIFN- α , somente dois (HuIFN- α_2 e HuIFN- α_{14}), são glicosilados (NYMAN *et al.*, 1998). A tradução primária dos IFN- α é composta de 188 ou 189 aminoácidos, dos quais 23 são removidos

por modificação pós-traducional, originando uma proteína madura de 165 a 172 aminoácidos. Em todos os IFN- α , 4 cisteínas (C) são altamente conservadas nas posições 1; 29; 98, 99 ou 100; 138 ou 139, e responsáveis pela ligação intramolecular (através das ligações S-S) na molécula (RADHAKRISHAN *et al.*, 1996). Estas ligações são consideradas importantes na estabilização da estrutura da molécula do IFN- α (WETZEL *et al.*, 1981) e imprescindíveis para a atividade biológica (SENDA *et al.*, 1992).

Embora o número de aminoácidos entre os sub-tipos de IFN- α seja muito similar, o fracionamento de cerca de 25 proteínas em SDS-PAGE, mostrou que essas proteínas migram com uma mobilidade relativa entre de 16 a 27 kDa, sugerindo diferenças nas influências estruturais, na sua migração em SDS-PAGE (ZOON *et al.* 1992).

2.3.2- O IFN- β

O HuIFN- β é codificado por um único gene (TANIGUCHI *et al.*, 1980), embora já tenha sido descrito a existência de 5 genes codificadores do IFN- β em ungulados (SEN, 2001). Este IFN consiste em uma proteína madura de 166 aminoácidos, com 50% de identidade em relação ao IFN- β murino (MuIFN- β) e 35% da seqüência consenso do IFN- α (SEN, 2001).

O HuIFN- β possui uma massa molecular entre 22-23 kDa, com uma ramificação de cadeias de açúcares nas quais estão ligados vários resíduos de N-lactosamina à asparagina. A galactosamina encontrada em sistema de expressão em eucariotos não é encontrada no HuIFN- β natural, o que indica que diferentes padrões de glicosilação ocorrem dependendo das células nas quais o IFN é produzido (KAGAWA *et al.*, 1988). A massa molecular do IFN- β não glicosilado é em torno de 19 kDa (FERREIRA *et al.*, 1979).

Em relação ao HuIFN- α , o HuIFN- β tem de 25 a 30 % de homologia na seqüência de aminoácidos e 45% na seqüência de nucleotídeos. Existe também grande homologia entre as regiões regulatórias 5' dos genes destes IFN o que é indicativo de que eles são geralmente coordenadamente regulados (VILCEK & SEN, 1996).

2.3.3- O HuIFN- ω

O HuIFN- ω é estruturalmente relacionado aos HuIFN- α (ADOLF, 1987), mostrando uma similaridade de 60% na sequência de aminoácidos. IFN semelhantes aos IFN- ω também foram observados em células de trofoblasto durante a pré-implantação dos embriões de ovinos e bovinos, tendo sido denominado IFN de trofoblasto ovino (IMAKAWA *et al.*, 1987) e IFN de trofoblasto bovino (ROBERTS *et al.*, 1990). O IFN de trofoblasto é secretado durante as fases iniciais da gravidez, tendo a função de promover o reconhecimento materno-fetal (CROSS e ROBERTS, 1991).

O IFN de trofoblasto humano induzido por vírus (TÓTH *et al.*, 1990) ou dsRNA é constituído por uma população heterogênea de IFN da qual 75% corresponde ao HuIFN- β e o restante corresponde aos HuIFN- α e HuIFN- ω (ABOAGYE-MATHIESEN *et al.*, 1990).

2.3.4- O IFN- λ

O IFN- λ é estruturalmente relacionado aos IFN tipo I, mas também relacionado à família das citocinas IL-10. Apresentam uma identidade de 15 a 19% na seqüência de aminoácidos com os HuIFN- α , porém seus genes estão localizados no cromossomo humano 19 (na região q13.13), ao contrario dos demais genes dos IFN do tipo I que se localizam no cromossomo 9, ou do IFN- γ que se localizam no cromossomo 12. Este IFN representa uma evolução interessante, mostrando uma interseção entre os IFN e a citocina da família das IL-10 (SHEPPARD *et al.*, 2003; KOTENKO *et al.*, 2003; VILCEK, 2003).

2.3.5- O IFN- κ

Os HuIFN- κ são proteínas de 207 aminoácidos, incluindo uma seqüência peptídeo sinal de 27 aminoácidos, sendo essa seqüência clivada num processo pós-traducional na Serina 27 (Ser²⁷) ou Leucina 28 (Leu²⁸). A proteína modificada (Leu²⁸-Lys²⁰⁷), com 180 aminoácidos, possui uma massa molecular de 25,2 kDa. Essa seqüência apresenta

30-32 % de similaridade com os IFN tipo I, assim como apresentam também uma série de cisteínas conservadas. A diferença estrutural mais significativa entre os HuIFN- κ e os IFN tipo I, é o tamanho maior da alça **cd**, que no HuIFN- κ tem uma inserção de 12 aminoácidos (LAFLEUR *et al.*, 2001).

2.3.6 – O IFN- γ

O HuIFN- γ consiste em uma proteína madura de 166 aminoácidos, com uma identidade de 95% a 99% com o IFN- γ de símios e de 56% com o IFN- γ bovino (BovIFN- γ), sem homologia significativa aos HuIFN- α_{2b} ou HuIFN- β . A proteína possui uma mobilidade relativa aproximada de 20 a 25 kDa e um peptídeo sinal de 20 a 25 aminoácidos (IJZERMANS & MARQUET, 1989).

O gene do IFN- γ de várias espécie já foi clonado, como por exemplo o de porco (DIJKMANS *et al.* 1990) e o de ovinos (MCINNES *et al.*,1993), mostrando diferentes identidades com o HuIFN- γ (75% e 59%, respectivamente). As identidades mostradas entre as diferentes espécies variam e também dependem das espécies comparadas. Assim, o gene do OvIFN- γ possui 96% de homologia com o BoIFN- γ e 80% com o HuIFN- γ (MCINNES *et al.*, 1993), enquanto o gene do IFN- γ canino (ZUCKER *et al.*, 1992) possui homologia de 83%, 83%, 81%, 78%, 66% e 68%, com os genes dos BoIFN- γ , OvIFN- γ , PoIFN- γ , HuIFN- γ , ratIFN- γ e o MuIFN- γ , respectivamente.

2.4- A ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL

Em relação a sua estrutura, os interferons fazem parte da família de citocinas helicoidais, também conhecida como família dos fatores de crescimento hematopoiético (SPRANG & BAZAN, 1993). Além dos inteferons, a família inclui o hormônio do crescimento (GH), várias interleucinas (IL), o fator estimulante do crescimento de granulócitos (G-CSF), o fator estimulante do crescimento de macrófagos (MCSF), o fator neurotrófico ciliar (CNTF) e o fator inibidor de leucemia (LIF) (WALTER & NAGABHUSHAN, 1995).

O primeiro IFN- β cristalizado foi o rMuIFN- β (MITSUI, *et al.*, 1993), sendo a estrutura tridimensional da molécula estabelecida por estudos de difração de raios-X, evidenciando uma estrutura tridimensional muito semelhante àquela determinada para o rHuIFN- α_{2b} (RADHAKRISHNAN, *et al.*, 1996) e HuIFN- β (KARPUSAS, *et al.*, 1997). Ainda, estudos de ressonância magnética nuclear (NMR) mostraram semelhança entre a estrutura do rMuIFN- β e o rHuIFN- α_{2a} (KLAUS, *et al.*, 1997). Os IFN tipo I são proteínas estruturalmente relacionadas, formada por moléculas protéicas com 5 α -hélices denominadas **A**, **B**, **C**, **D** e **E**, ligadas entre si por alças **ab**, **bc**, **cd** e **de** (FIG. 2).

A estrutura do rMuIFN- β (MITSUI, *et al.*, 1993) serviu para criar os modelos da estrutura tridimensional do HuIFN- α_{2b} (MURGOLO *et al.*, 1993), do HuIFN- α_6 (MIERTUS *et al.*, 1997) e do IFN- τ ovino (SENDA *et al.*, 1995a). Apesar da estrutura geral dos modelos com o rMuIFN- β ter sido muito semelhante, a baixa homologia da cadeia polipeptídica (< 30%) e a significativa deleção nas seqüências das alças, que são de grande importância biológica, levaram a determinação das coordenadas de diversos aminoácidos destes modelos, de forma imprecisa (WALTER, 1997).

A análise da estrutura tridimensional do HuIFN- β mostra que diversos aminoácidos hidrofóbicos, tais como as F70 e F154, W79 e W143, estão envolvidos em interações hidrofóbicas e estabilizam o núcleo da molécula. Assim também alguns aminoácidos polares, tais como as G10 e G94, S118 e T58 estabilizam as α -hélices através de ligações por pontes de hidrogênio (KARPUSAS *et al.*, 1997).

Na FIGURA 2, podemos visualizar a estrutura conformacional descrita para o rHuIFN- α_{2a} (KLAUS *et al.*, 1997). Nesta figura, são mostradas as cinco α -hélices **A**(4-21), **B**(51-67), **C**(79-93), **D**(115-134), e **E**(138-158), além da α -hélice **B'**, que é responsável por uma mudança na direção da α -hélice **B**. A ligação entre a α -hélice **A** e **B** é feita por uma longa alça **ab** e uma segunda alça denominada **cd** faz a ligação entre a α -hélice **C** e a α -hélice **D**. As α -hélices **D** e **E** estão interligadas por 3 aminoácidos (YST) dos quais a estrutura do Y, permite a mudança de direção da α -hélice. No HuIFN- β o aminoácido Y situa-se isoladamente entre as α -hélice **D** e **E**, sendo observada a mesma mudança de direção das α -hélices. A alça **ab** é dividida em três segmentos: **ab1**, **ab2** e **ab3**, sendo que os segmentos das alças **ab2** e **ab3** correm em sentido perpendicular à alça **ab1**. No final da

alça **ab1** existe uma ponte S-S entre as C29 e C138 e uma segunda observada entre as C1 e C98. O segmento **ab1** possui duas hélices, sendo que nesta alça está localizada a C31 ligada a C141, através de pontes S-S. As interações de pontes de hidrogênio, entre a Y132 (alça **de**) e D34 e entre a R147 (α -hélice **E**) e L24, ajudam a estabilizar o segmento **ab1** da alça **ab**. Nas vizinhanças do sítio de glicosilação localizado na N80 (hélice **C**) existem diversos aminoácidos hidrofóbicos expostos.

O interior da molécula é formado por aminoácidos hidrofóbicos, com exceção de alguns aminoácidos polares (S11, S72, S150 e S154; T14 e T155; Q91 e Q158; Y122; R144 e E141 e E146), que ligam as α -hélices entre si através de pontes de hidrogênio. A α -hélice **D** e alça **ab** também estão ligadas ao interior da molécula através de interações hidrofóbicas dos aminoácidos L, I e V na hélice **D** e F na alça **ab**. A alça **ab** se interliga à α -hélice **E** através de uma ligação S-S entre as C29 e C138. A pequena α -hélice **B'** (aminoácidos 69-75) observada no sentido da α -hélice **B**, é uma característica particular do rHuIFN- α_2 (SENDA *et al.*, 1992; RADHAKRISHNAN, *et al.*, 1996; KARPUSAS, *et al.*, 1997).

Embora semelhantes, a comparação da estrutura do rHuIFN- α_{2b} com o HuIFN- β (KARPUSAS *et al.*, 1997) mostra algumas diferenças estruturais básicas, como a α -hélice **B'** adicional, que acarreta uma mudança de 70° no sentido da α -hélice **B**. No rMuIFN- β , o segmento **ab1** da alça **ab** é menor em 3 aminoácidos e o segmento **ab2** não possui a ligação S-S, bem como as hélices presentes no segmento **ab1** e **ab2** da alça **ab**, dos rHuIFN- α_{2b} e HuIFN- β . Apesar dos interferons rHuIFN- α_{2b} e MuIFN- β (KLAUS *et al.*, 1997, MITSUI, *et al.*, 1993) mostrarem algumas variações, como, por exemplo, o tamanho da α -hélice A (19 aminoácidos mais longa no MuIFN- β) e a ausência das pontes de dissulfeto no MuIFN- β , a sobreposição das duas moléculas, mostram estruturas bastante similares.

O HuIFN- β também foi observado formando dímero através da interação com um átomo de zinco o qual é coordenado pela histidina 121 de uma molécula e a histidina 93 e 97 de outra molécula. Além disso, existem contatos adicionais, polar e hidrofóbico, entre as α -hélices **A** e **C** de uma molécula e a α -hélice **D** e alça **ab** de outra molécula. A dimerização do HuIFN- β é de grande interesse porque essa característica têm sido observada em outras citocinas com estrutura em α -hélice e em alguns casos têm sido correlacionadas

com a atividade do receptor (KARPUSAS *et al.*, 1997). Entretanto, RUNKEL *et al.* (2000) descreveram dois HulFN- β mutantes (H93/H97 e H121) nos quais foram substituídas as histidinas (H) por argininas (R). Nesse estudo, ambos os mutantes apresentaram atividade antiviral semelhante ao do HulFN- β natural, assim como apresentaram mesma ligação ao receptor de superfície celular. Esses dados sugerem, que os dímeros observados na estrutura cristalizado do HulFN- β , podem representar um artefato no processo de cristalização e que não é relevante para sua função biológica.

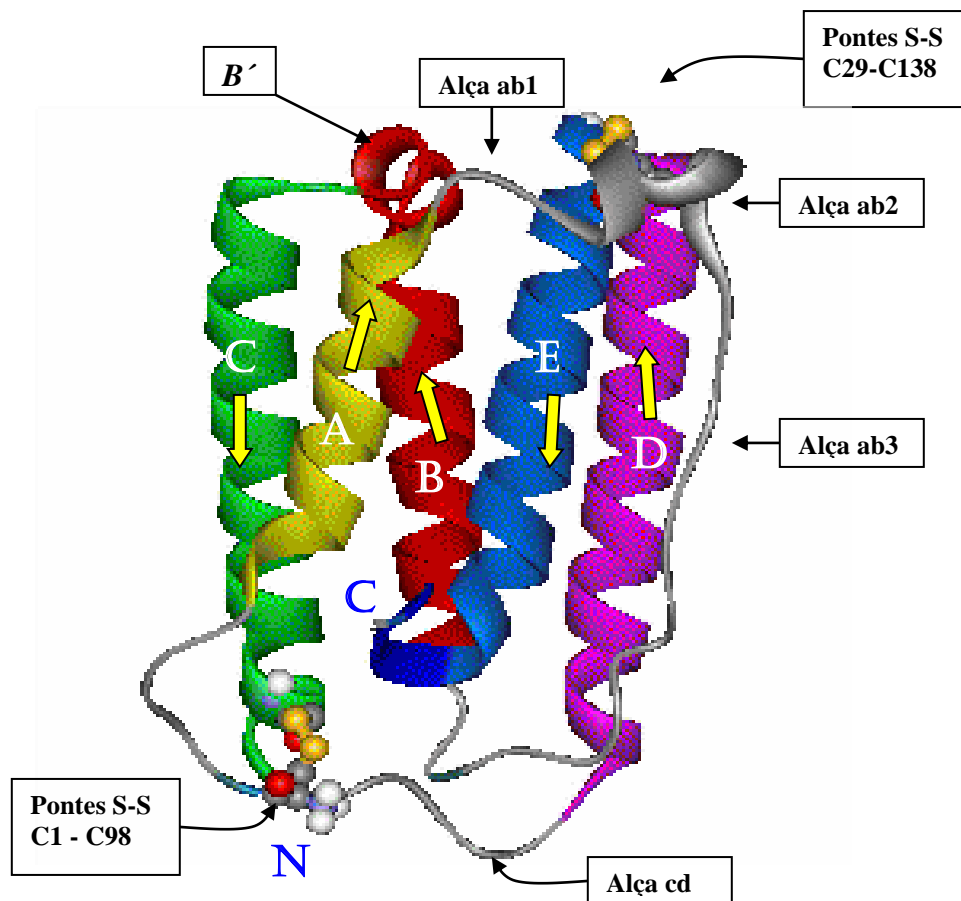


FIGURA 2: Modelo estrutural do rHuIFN- α_{2a} . As α -hélices **A**, **B**, **C**, **D** e **E** são mostradas, bem como o sentido de direção das α -hélices, indicado por setas e a ligação com as suas respectivas alças. A α -hélice **B'** se encontra no final da α -hélice **B** e só observada nos HuIFN- α_2 . A ligação entre a α -hélice **A** e **B** é feita por uma longa alça **ab**, dividida em três segmentos, **ab1**, **ab2** e **ab3**. Uma segunda alça denominada **cd** aparece como ligação entre a α -hélice **C** e a α -hélice **D**. As pontes S-S (C29 e C138; C1 e C98) estão indicadas. As regiões **N** e **C**-terminais foram designadas (**N** e **C**). Fonte: KLAUS *et al.*, 1997.

Apesar das estruturas conformacionais dos rHuIFN- α_{2b} e HuIFN- β serem muito semelhantes, isto não reflete uma identidade de aminoácidos, pelo contrário, a identidade é menor do que 35%. Os estudos comparativos entre o HuIFN- β e o HuIFN- α_1 demonstraram que estas duas proteínas são estruturalmente relacionadas, sendo que dos 166 aminoácidos, 48 (29%) estão localizados nas mesmas posições. Além disso, existem duas regiões onde a similaridade é maior: a primeira entre os aminoácidos 28 e 80 (41% de similaridade) e a segunda entre as posições 115 e 151 (54% de similaridade). O triptofano, fenilalanina, arginina, cisteína e tirosina são os aminoácidos mais conservados entre moléculas estruturalmente relacionadas (TANIGUCHI *et al.*, 1980).

Na FIGURA 3, observamos a sobreposição da estrutura do rHuIFN- α_{2b} , obtida por NMR (KLAUS *et al.*, 1997) e da estrutura do HuIFN- β , obtida por difração em R-X (MITSUI, *et al.*, 1993), evidenciando a similaridade conformacional destas moléculas.

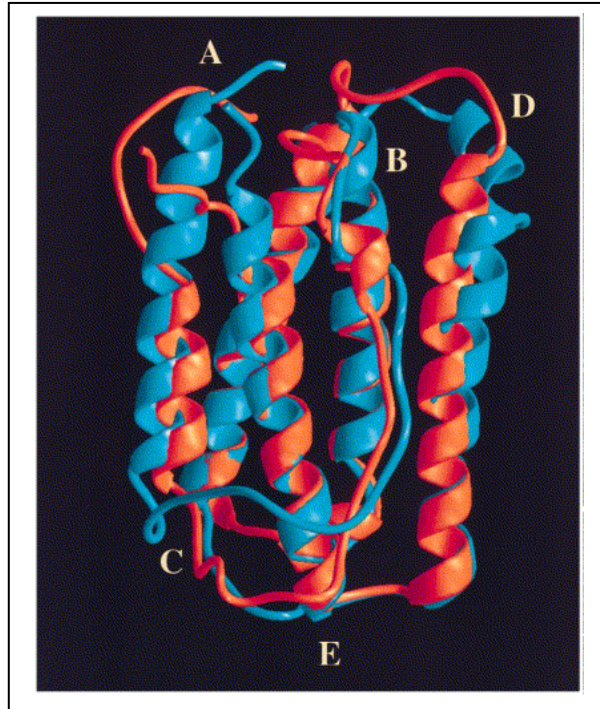


FIGURA 3: Sobreposição da estrutura conformacional dos IFN rHuIFN- α_{2b} e MuIFN- β . A estrutura do rHuIFN- α_{2b} (em laranja) obtida por NMR (KLAUS *et al.*, 1997) e a estrutura do MuIFN- β (em azul), obtida por difração em R-X (MITSUI, *et al.*, 1993) foram sobrepostas. As α -hélices foram marcadas de **A** a **E**. Fonte: KLAUS *et al.*, 1997.

2.5- RECEPTORES CELULARES E TRANSDUÇÃO DE SINAL

Os IFN tipo I competem pelo mesmo receptor celular, enquanto que o IFN- λ e o IFN- γ se ligam a receptores diferentes (BRANCA, 1981; FLORES, 1991; LI, 1994; KOTENKO, *et al*, 2003). As cadeias dos receptores de IFN tipo I, tipo II e IFN- λ , foram classificadas como receptores de citocina de classe II, tendo como base o alinhamento das sequências e elementos estruturais conservados (BAZAN, 1990; UZÉ *et al.*, 1995 e KOTENKO, *et al*, 2003).

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

A cadeia β do receptor do HuIFN tipo I é composta de três formas: uma forma solúvel, uma forma curta e outra longa, ligadas à membrana celular (DOMANSKY & COLAMONICI, 1996; PESTKA, 1997). A forma solúvel do IFNAR-2 foi detectada na urina através de anticorpos monoclonais anti-IFNAR-2 (NOVICK, 1992) e identificada como uma nova cadeia de receptor de IFN tipo I (NOVICK, 1994). O cDNA deste novo receptor, obtido a partir de uma biblioteca de cDNA de células de linhagem monocítica (NOVICK *et al.*, 1994), mostrou dois mRNAs de 1,5 e 4,5 kb. Outros autores (DOMANSKY *et al.*, 1995; LUTFALLA *et al.*, 1995) também clonaram dois cDNA correspondentes às formas longa e curta do IFNAR-2 e mostraram que todas as três formas do receptor, resultam de um processamento alternativo do mesmo gene. PIEHLER *et al.* (1999) e ARDUINI *et al.* (1999), mostraram que a forma solúvel do domínio extracelular da cadeia IFNAR-2 é responsável pela ligação aos IFN tipo I.

A forma curta do IFNAR-2 possui 331 e a longa, 515 aminoácidos, apresentando ambas as formas um domínio extracelular e transmembrana iguais, porém um domínio intracelular diferente. A forma longa contém motivos comuns a todos receptores membros da superfamília das citocinas, que são os resíduos de cisteínas conservados e numerosos domínios ácidos no citoplasma (DOMANSKY & COLAMONICI, 1996). A forma curta do IFNAR-2 parece não ser funcional, contudo a maioria das células expressa esta forma do receptor na proporção de uma para 20 cadeias da longa (DOMANSKY *et al.*, 1995). Por

isso, a sua função parece estar ligada à regulação da resposta celular ao IFN (DOMANSKY & COLAMONICI, 1996) ou ao controle da sua expressão.

Após a sua interação com o IFN, estas duas cadeias contribuem de diferentes formas para as suas diferentes atividades. A cadeia IFNAR-2 liga aos HuIFN com moderada afinidade (COHEN *et al.*, 1995; CUTRONE *et al.*, 1997) e a cadeia IFNAR-1 parece ser um mediador das diversas respostas das células, aos diferentes tipos de IFN tipo I (CLEARY *et al.*, 1994; COOK *et al.*, 1996). Além disso, a cadeia IFNAR-1 é responsável pela formação de um receptor com alta afinidade (DOMANSKY, 1995; LUTFALLA, 1995; PESTKA, 1997). Recentemente, estudos de mutagênese sítio dirigida nos três domínios diferentes (SD1, SD2 e SD3) da cadeia IFNAR-1, mostraram a importância dos peptídeos 62 a 70 (FSSLKLVVY) no SD1 e do triptofano (W129) no SD2, com relação a sinalização celular e ao estabelecimento da atividade biológica, após a ligação aos IFN tipo I. Além disso, neste mesmo estudo, foi demonstrado que os aminoácidos 278 a 280, LRV, no SD3 desta cadeia, são críticos para a atividade biológica do HuIFN- α , mas não tem nenhum papel na ligação deste IFN ao receptor (CAJEAN-FEROLDI *et al.*, 2004).

Após a interação dos IFN tipo I com seus receptores, ocorre fosforilação das proteínas quinases (TIK2/JAK1), as quais estão constitutivamente associadas com as subunidades destes receptores IFNAR-1 e IFNAR-2. Estas proteínas fosforiladas servem como sítios para proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STAT). As formas fosforiladas e ativadas das STAT-1 e STAT-2 formam complexos heterodiméricos, os quais se associam com o fator regulatório dos interferons (IRF-9), formando o complexo conhecido como fator estimulatório dos genes dos interferons (ISGF3). O complexo ISGF3 formado desloca-se para o núcleo e liga-se a seqüências específicas no DNA, conhecidas como ISG (genes estimulados por interferon). Além da indução da formação do heterodímero STAT-1:STAT-2, os IFN- α/β também induzem a formação de outros homodímeros e heterodímeros, tais como STAT-1:STAT-1, STAT-3:STAT-3, STAT-5:STAT-5 e STAT-1:STAT-3. Estes complexos ligam-se à seqüências palindrômicas denominadas seqüências ativadas por gama (GAS), localizadas na região promotora de diferentes ISG, incluindo IRF1 e *c-fos*. A formação de outro heterodímero STAT-2:STAT-6, foi também observada em células B tratadas com HuIFN- α , sendo que este dímero também se liga à IRF-9, formando o complexo tipo ISGF3 (Revisado por BRIERLEY & FISH, 2002).

Estudos recentes utilizando híbridos de IRF-9-STAT-2 mostram que IRF-9 é essencial para a ligação ao DNA, como componente do ISGF3. A atividade transcricional desta proteína localiza-se na região C-terminal, região que foi previamente determinada como sítio de ligação do complexo heterodímero (STAT-1 e STAT-2) (KRAUS *et al.*, 2003). Ainda neste estudo, KRAUS *et al.*,(2003), mostraram que a região C-terminal da STAT-2, juntamente com IRF-9, é importante para a ativação transcricional dos ISG.

A via de sinalização celular JAK/STAT é uma via essencial para a sinalização da transcrição de vários ISG, cujos produtos protéicos desempenham papéis importantes nas diversas atividades biológicas dos IFN. Tais atividades incluem a síntese de proteínas quinases ativadas por RNA dupla fita (PKR), 2'5' Oligoadenilato sintetase (2'5' OAS), MxA e proteína que se liga a guanilato (GBP) (BRIERLEY & FISH, 2002). Seqüências regulatórias específicas são encontradas em regiões dos ISG, onde se ligam fatores de transcrição. Os genes que são induzidos em resposta aos IFN tipo I, possuem uma seqüência de elemento de resposta ao estímulo por IFN- α/β (ISRE), enquanto que os genes induzidos em resposta ao estímulo por IFN- γ , possuem um sítio de ativação de IFN- γ (GAS). A seqüência do ISRE é composta por AGTTT_NTTCC onde N é qualquer nucleotídeo. A seqüência de GAS é composta por TTCN₃GAA, e localiza-se em regiões promotoras de diferentes ISG, incluindo IRF-1 e *c-fos* (BRIERLEY & FISH, 2002). A seqüência ISRE existe na maioria dos genes indutíveis pelos IFN tipo I, em qualquer orientação, algumas vezes em múltiplas cópias, sendo que foram encontradas pequenas variações nesta seqüência (HAQUE & WILLIAMS, 1998).

Os IFN- λ recém caracterizados ligam-se a um receptor heterodimérico, formado por uma subunidade classificada como receptor de citocinas de classe II (IL-28R α) e outra subunidade correspondente, a cadeia do receptor para interleucina-10 (IL-10R β) (SHEPPARD *et al.*, 2003). Após interação com seus receptores celulares, estes ativam a via de sinalização intracelular, que por sua vez, desencadeia a fosforilação das STATs, como ocorre com os IFN tipo I, levando a sua atividade biológica (KOTENKO *et al.*, 2003). As atividades antiviral e antiproliferativa desencadeadas após ligação dos HuIFN- λ ao receptor celular, estão principalmente relacionadas com a interação destas moléculas com a cadeia IL-28R α do receptor e ativação das STAT, principalmente a STAT-2. Estudos de mutações de ponto em resíduos de tirosina nesta cadeia resultaram em perda da atividade antiviral e antiproliferativa destes IFN, quando tirosinas 343 e 517 foram

substituídas por fenilalanina. Este estudo demonstrou que a mutação destas tirosinas não está relacionada com a ativação de STAT-4, mas sim com a ativação das STAT-1, 2, 3 e 5 (DUMOUTIER *et al.*, 2004).

A via completa de sinalização celular desencadeada pelos HuIFN- λ , após interação com seus receptores celulares, ainda não foi totalmente esclarecida, entretanto VILCEK (2003) propôs uma via de sinalização parecida com a dos IFN tipo I, baseado nos estudos de SHEPPARD *et al.* (2003) e KOTENKO *et al.* (2003). A FIGURA 4 ilustra um esquema representativo desta via de sinalização, mostrando o envolvimento das STATs na ativação dos genes de resposta aos IFN. As proteínas envolvidas na fosforilação destas STATs ainda não foram descritas.

Algumas evidências mostram que o mecanismo da transdução de sinal envolve modos alternativos de interação dos receptores com o IFN, que resultam numa via de sinalização alternativa (ABRAMOVITCH *et al.*, 1995; MOGENSEN *et al.*, 1999). Centenas de novos ISG são descritas. Alguns deles, relacionados com o efeito antiviral dos IFN, e outros, relacionados com o efeito anti-tumoral. LEAMAN *et al.* (2003) descreveram 910 genes induzidos por HuIFN- β , em melanomas, utilizando a técnica de “micro array”. Desses 910 genes, 260 foram descritos como novos genes identificados e desses 260, 104 foram relacionados a funções regulatórias do crescimento celular.

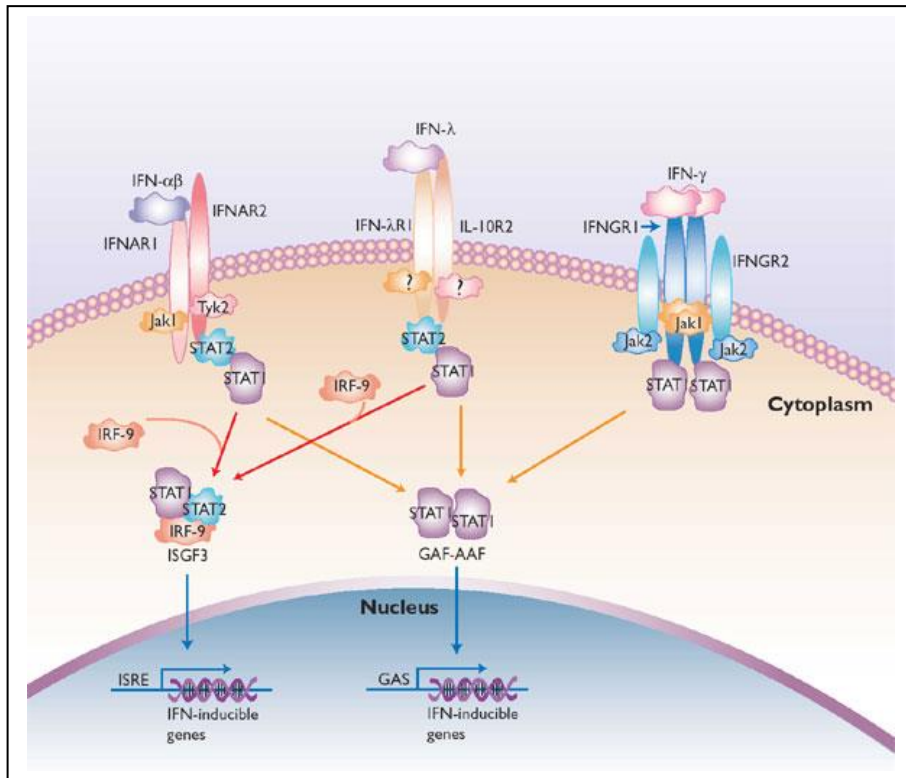


FIGURA 4: Transdução de sinal induzida pelos IFN α/β , IFN- λ e o IFN- γ . Os IFN ligam-se aos receptores celulares (IFNAR1/IFNAR2; IFN λ R1/IL10R2 e IFNGR1/IFNGR2) específicos. Os IFN α/β ligam-se ao receptor e ativam Jak-1 e Tyk-2, seguido da fosforilação das STAT-1 e STAT-2. Estas proteínas combinam-se com o IRF-9 (IFN-regulatory factor 9) para formar um complexo proteico trimérico (ISGF-3), que após translocação para o núcleo, liga-se ao elemento cis ISRE (IFN-stimulated response element), encontrado na maioria dos genes induzidos por IFN- α/β . Os IFN- γ ligam-se ao receptor (IFNGR1/2) e ativam Jak-1 e Jak-2, seguido da fosforilação da STAT-1. O complexo homodímero fosforilado, formado por duas STAT-1 (GAF-AAF), após translocação para o núcleo, liga-se ao elemento GAS (IFN- γ activation site) encontrado na maioria dos genes induzidos por IFN- γ . Os IFN- λ , ligam-se a um receptor heterodímero constituído pelos receptores IFN- λ R1 ou IL-28R α e IL10R2 que por sua vez ativam STAT, de forma ainda desconhecida. Fonte: VILCEK *et al.*, 2003.

2.6- ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS INTERFERONS

2.6.1- ATIVIDADE ANTIVIRAL

A atividade antiviral desencadeada pelos interferons em seus sistemas celulares permanece ainda pouco esclarecida, uma vez que muitos genes são induzidos por essas moléculas e os produtos desses genes são proteínas cujas funções ainda não foram claramente elucidadas (STARK *et al.*, 1998). Dentre as proteínas conhecidas como induzidas pelos interferons, estão as enzimas 2'5' oligoadenilato sintetase (2'5'OAS), as quais polimerizam ATP em oligoadenilatos de vários tamanhos. Este processo ocorre em presença de um cofator, que são os dsRNA, os quais são necessários para o processo de ativação de uma ribonuclease latente (RNase L), pela 2'5'OAS, presentes em todas as células animais. A RNase L ativa, por sua vez, degrada fita simples de RNA (ssRNA) tanto viral, quanto celular, inibindo assim a síntese protéica (STARK *et al.*, 1998).

Além das enzimas 2'5'OAS, os interferons induzem também a síntese de enzimas conhecidas como PKR. Esta enzima está diretamente envolvida com inibição da tradução de proteínas. As PKR são ativadas quando em presença de dsRNA ou vírus, sendo então auto fosforiladas e portanto, capazes de fosforilar a subunidade menor do fator de iniciação da síntese protéica em eucariotos "2 α " (eIF-2 α), inibindo assim a síntese de proteínas celulares (STARK *et al.*, 1998). O tratamento das células pelos IFN induz a produção de outras proteínas como as Mx, indoleamina 2,3-dioxigenase, IRF1 (ISGF2), TNF, interleucina 1 e 2, classe I MHC, classe II MHC, IP10, C56, GBP dentre outras (DAVID, 1995). As proteínas Mx são GTPases induzidas por IFN que interferem com alguns vírus RNA de fita negativa (ARNHEITER *et al.*, 1996).

Em estudos com camundongos deletados para o gene da RNase L ("knockout"), foi observado que os camundongos tratados e não tratados com IFN, morrem mais rapidamente do que animais normais (não deletados), quando infectados com o vírus da encefalomiocardite de camundongos (EMC). Entretanto existe um considerável efeito antiviral (anti-EMC) do IFN nos camundongos tratados. Da mesma forma, foi observado que em fibroblastos embrionários de camundongo deficientes em RNase L, PKR ou ambas as proteínas, ainda persiste uma atividade antiviral residual contra o EMC e o vírus da estomatite vesicular (VSV), após o tratamento com IFN. Estes dados evidenciam a

existência de outros mecanismos da via da imunidade inata, contras as infecções virais (ZHOU *et al.*, 1997).

2.6.2- ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

Além do estado antiviral desencadeado pelos IFN, estes também exercem atividades antiproliferativas e antitumorais, atividades estas que podem estar ligadas à supressão de tumores e controle de infecções (STARK *et al*, 1998). Foram descritos por estes mesmos autores, que os IFN- α tem efeitos sobre componentes específicos do aparato de controle do crescimento celular, como c-myc, pBR e ciclina D3. A enzima PKR pode estar envolvida nesta ação do IFN, uma vez que em células expressando uma PKR dominante negativa, estes não apresentam atividade antiproliferativa.

Algumas proteínas envolvidas no ciclo celular e apoptose foram identificadas como sendo induzidas por IFN tipo I. Galectina 9, uma galactosidase que se liga a lectina, está envolvida em processos de apoptose, e foi demonstrado que a indução do gene que codifica para essa proteína, foi significativamente elevada, quando células de melanomas foram tratadas com HuIFN- β . A expressão do gene que codifica para outra proteína relacionada ao controle do crescimento celular, a K12, também conhecida como SECTM1, foi também elevada, quando essas células foram tratadas pelo mesmo IFN. Outros vários genes relacionados com apoptose ou controle do ciclo celular foram observados como altamente induzidos pelos IFN- α/β (LEAMAN *et al.*, 2003).

2.7- USO CLÍNICO DOS IFN

Desde a década de 1960, a partir da descoberta dos interferons como potentes agentes antivirais, muito estudo tem sido feito no sentido de um melhor entendimento da interação destas citocinas com seus receptores celulares, assim como o desencadeamento de sinais citoplasmáticos, os quais são responsáveis pela indução de diversos genes, relacionados com a atividade biológica dos diferentes tipos de IFN. O conhecimento desta ampla variedade de atividades biológicas, incluindo suas ações antivírica, antiproliferativa,

antitumoral, imunomodulatória e anti-fibrótica, foi um grande incentivo na busca do uso dos IFN como agentes terapêuticos.

Após muita pesquisa, os IFNs tipo I (α e β) e tipo II (γ), foram aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento de diversas infecções por vírus, cânceres e doenças degenerativas do SNC e do tecido conjuntivo (JONASCH & HALUSKA, 2001). Entre os tratamentos já aprovados podemos citar o uso do IFN- α no tratamento de hepatite crônica causada pelos vírus da hepatite C ou B, de verrugas genitais, da tricoleucemia, condiloma acuminado, sarcoma de Kaposi (em pacientes com AIDS), do melanoma maligno e da leucemia mielóide crônica. O emprego do IFN- β foi aprovado para o tratamento da esclerose múltipla e o emprego do IFN- γ foi aprovado para o tratamento da doença granulomatosa crônica, mostrando ótimos resultados (JONASCH & HALUSKA, 2001).

Um dos maiores problemas no uso clínico dos IFN é o efeito colateral. O tratamento prolongado com estas citocinas pode causar um impacto na qualidade de vida e na habilidade física dos pacientes. Dentre os principais efeitos colaterais, podemos citar: fadiga; toxicidade do sistema nervoso central, incluindo sonolência, confusão, letargia, tonteados e vertigens; depressão; disfunções de glândulas, levando à super produção ou diminuição de hormônios. Portanto, para minimizar estes efeitos e em alguns casos, prolongar a vida do paciente, os IFN tem sido utilizados em alguns casos, associado com outro medicamento, como no caso do tratamento de Sarcoma de Kaposi, em pacientes aids. Nestes pacientes, o uso terapêutico com o IFN- α é combinado com o uso de AZT (zidovudina). Outro exemplo é o uso de citarabina (ara-C), associado ao IFN- α , no tratamento da leucemia mielogênica crônica (JONASCH & HALUSKA, 2001).

2.8- RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA E FUNÇÃO

O estudo relacionando estrutura e função dos IFN, se iniciou através do uso da técnica de mutagênese sítio dirigida, o que possibilita a substituição de um ou mais aminoácidos na molécula. Como mostrado na FIGURA 5, através do pareamento da seqüência dos aminoácidos dos diferentes IFN descritos (MuIFN- β , HuIFN- β e HuIFN- α), é possível analisar os aminoácidos mais conservados entre os diferentes tipos, assim como analisar

o tamanho de cada α -hélice e alças, no sentido de minimizar os problemas que podem ser gerados, na construção dos IFN recombinantes e híbridos.

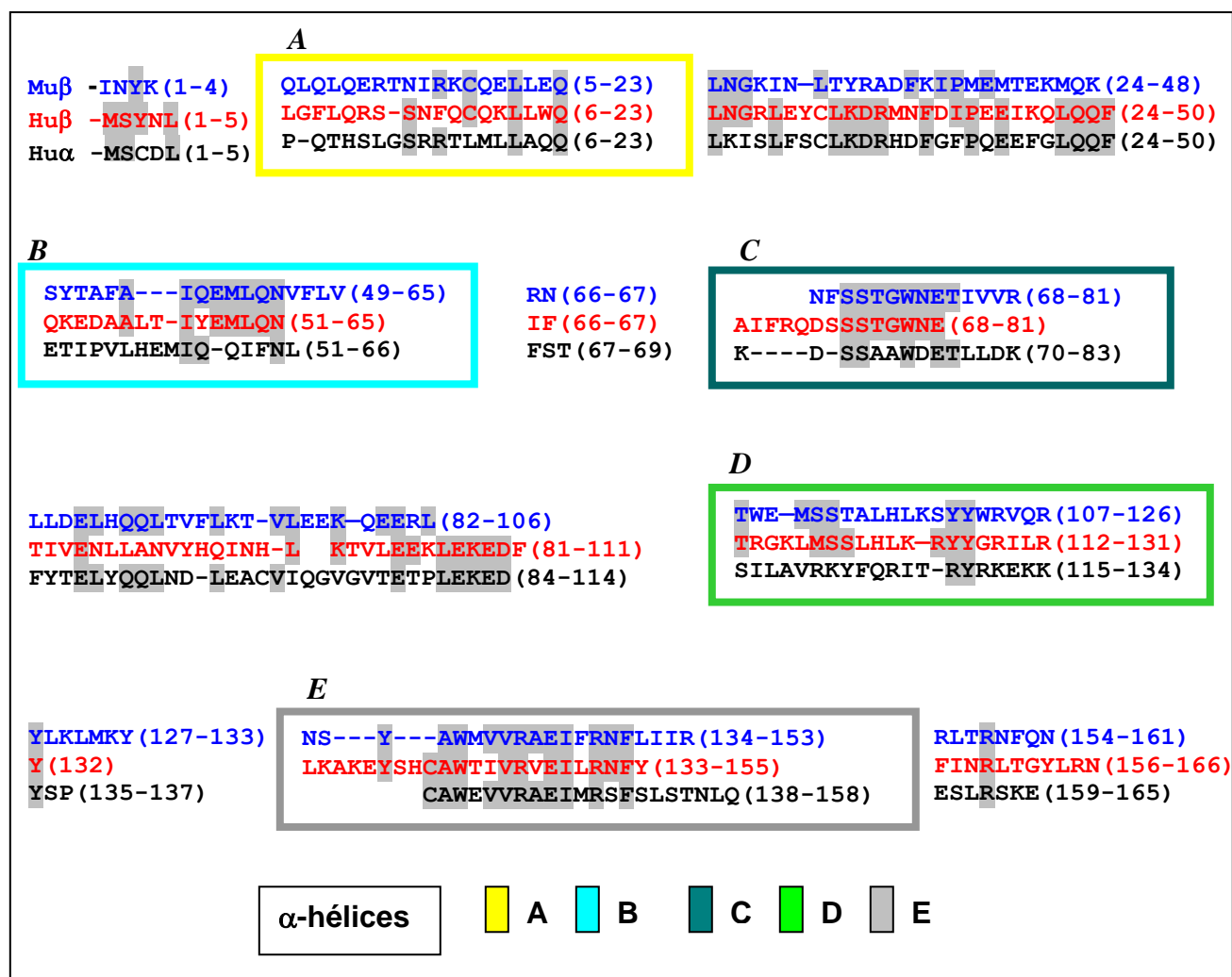


FIGURA 5: Pareamento dos aminoácidos inferidos da seqüência de nucleotídeos dos interferons beta murino (Muβ), beta humano (Huβ) e o alfa 2 humano (Huα). As regiões das α-hélices (A, B, C, D e E) estão agrupadas nos retângulos coloridos. As alças *ab*, *bc*, *cd* e *de*, estão fora dos retângulos, entre as α-hélices. Os aminoácidos conservados entre os três IFN estão grifados em cinza.

Estudos de mutagênese no HuIFN- β (RUNKEL *et al.*, 1998) identificaram os aminoácidos R35 na alça **ab**, K123 na α -hélice **D** e N84, Y92 na α -hélice **C**, como estando envolvidos em interações funcionais com o receptor. Os resíduos de aminoácidos expostos ao meio extracelular, que interagem com IFNAR-2, não são bem conservados entre os HuIFN- β e HuIFN- α (MOGENSEN *et al.*, 1999). Estudos com anticorpos monoclonais (mAc) que bloqueiam a atividade do IFN- β *in vitro*, mostraram duas regiões de ligação ao receptor em faces opostas da molécula, uma delas compreendida entre os aminoácidos 40-53 da alça **ab** e α -hélice **B** (REDLICH *et al.*, 1991). Para os HuIFN- α , resíduos de aminoácidos expostos ao solvente nas porções da alça **ab1**, **de** e α -hélices **B** e **E**, foram identificados como funcionalmente importantes (MITSUI *et al.*, 1993) e tem sido sugerido como sendo importantes para as interações com o receptor (RADHAKRISHNAN *et al.*, 1996) e a α -hélice **C** tem sido implicada nas interações entre HuIFN- α_1 e HuIFN- α_8 , com IFNAR-1 (UZÉ *et al.*, 1994). Portanto, estas são evidências que regiões específicas que entram em contato com IFNAR-1 e IFNAR-2 podem ser diferentes para os subtipos de HuIFN- α , daquelas definidas para o HuIFN- β (RUNKEL *et al.*, 2000). A comparação dos mutantes **A2** (no qual foram substituídos os aminoácidos F15, Q16, Q18, K19, W22 e Q23 por alaninas) e **de1** (no qual foram substituídos os aminoácidos K136 e E137 por alaninas), sugere que uma ativação do receptor de IFN tipo I por diferentes mutantes HuIFN- β , podem levar a estados ativados distintos do receptor, o que difere na eficiência com a qual ele induz uma resposta funcional (RUNKEL *et al.*, 2000). Este fato está de acordo com os estudos mutacionais do sítio de ligação do HuIFN- β (RUNKEL *et al.*, 1998). Mutação do aminoácido R35 do IFN- β resultou em uma diminuição na atividade deste IFN quando comparado com a mutação homóloga do aminoácido R33 no HuIFN- α_2 . Apesar da considerável homologia na seqüência de aminoácidos entre HuIFN- α_2 e HuIFN- β na alça **ab**, o arranjo espacial da maioria dos resíduos importantes para a ligação é bem diferente (PIEHLER & SCHREIBER, 1999).

Estudos de mutagênese sítio dirigida também com os IFN- α , tem mostrado uma relação das α -hélices e alças, no desenvolvimento das diversas atividades biológicas deste IFN, assim como na espécie especificidade. WEBER *et al.* (1987) introduziram uma série de aminoácidos na α -hélice **D** do HuIFN- α_2 , o que aumentou substancialmente a atividade deste IFN em células murinas. A melhor combinação de substituições foi nas posições 121, 125 e 132, sendo observado uma reatividade parcial comparada com aquela

observada nos HuIFN- α_1 . Estes dados indicam que a alça **ab** e a α -hélice **D** interagem com a subunidade IFNAR-2 (UZÉ *et al.*, 1994; UZÉ *et al.*, 1995; WALTER, 1997), estabelecendo uma relação entre estrutura e atividade biológica.

A mudança nos aminoácidos dos rHuIFN- α_8 na α -hélice **C** e do rHuIFN- α_1 nas α -hélices **A**, **C** e **D** e na alça **ab** parecem estar relacionados com a menor atividade biológica destes IFN em comparação com o rHuIFN- α_{2b} . Contudo, em estudos de competição por receptores, houve uma maior afinidade do rHuIFN- α_8 pela cadeia α do receptor (HuIFNAR-1) em comparação com o rHuIFN- α_{CON} e rHuIFN- α_{2b} , o que não está relacionado com a atividade biológica. Um aumento da antigenicidade do rHuIFN- α_{CON} também foi observado, o que pode estar relacionado com os 15 aminoácidos diferentes presentes nesta molécula, em relação ao rHuIFN- α_{2b} . Entretanto, a maioria das trocas dos aminoácidos foi conservativa e não trouxe mudança conformacional na molécula (WALTER *et al.*, 1997), sugerindo que a carga e a afinidade do aminoácido com o receptor, podem estar relacionadas ao papel funcional do ligante. Neste sentido, resíduos de aminoácidos expostos ao solvente nas porções da alça **ab1**, **de** e α -hélices **B** e **E** dos IFN- α foram identificados como funcionalmente importantes (MITSUI *et al.*, 1993) e fundamentais para as interações com o receptor (RADHAKRISHNAN *et al.*, 1996). Nos IFN- α_1 e IFN- α_8 a α -hélice **C** foi implicada nas interações entre com IFNAR-1 (UZÉ *et al.*, 1994).

O HuIFN- α_1 possui atividade antiviral e afinidade pelo receptor de IFN em células humanas em torno de 20x menos que o HuIFN- α_{2b} . As diferenças em 8 aminoácidos localizados na α -hélice **A** (D10), alça **ab** (S22, F27 e K31), α -hélice **C** (T68, D79 e a C85) e α -hélice **D** (R124) podem ser os responsáveis pela diminuição na afinidade de ligação ao receptor e à menor atividade antiviral em células humanas. Estudos recentes de mutagênese sítio dirigida mostraram que se a (S86) e (N90) forem substituídas pela Tirosina (Y), a atividade antiproliferativa da molécula aumenta. No mesmo estudo, foi observado que se a (Y86) for substituída pela isoleucina (I), a atividade antiproliferativa permanece igual, ao passo que se esta for substituída pelo ácido aspártico (D), lisina (K) ou alanina (A), a atividade antiproliferativa é substancialmente diminuída. Os resultados sugerem que resíduos hidrofóbicos na posição 86, assim como a região amino terminal, podem ser importantes para a interação da molécula com seu receptor. A partir desses

resultados, ficou demonstrada a importância da α -hélice **C**, principalmente os resíduos 81 a 95, na atividade antiproliferativa dos HuIFN- α e que os resíduos 86 e/ou 90 podem estar relacionados com a interação ao receptor (HU *et al.*, 2001).

2.9- OS INTERFERONS HÍBRIDOS

Os interferons híbridos foram feitos por engenharia genética, utilizando-se, na sua maioria, enzimas de restrição pré-existentes na molécula dos IFN em estudo. Por este motivo os subtipos de HuIFN- α foram os mais utilizados, por apresentarem 80 a 85% de identidade na sua sequência de aminoácidos, o que faz com que a substituição de um fragmento não traga modificações substanciais nesta sequência. Técnicas utilizando PCR e “overlapping” das sequências de ácidos nucleicos, também foram utilizadas. Os IFN obtidos foram expressos em vários sistemas, tais como sistema livre de células (WECK *et al.*, 1981), sistemas bacterianos (NAGATA *et al.*, 1980) e sistemas de levedura (TUIE *et al.*, 1982).

2.9.1- HÍBRIDOS DE IFN- α

Os leucócitos quando infectados por vírus produzem os HuIFN- α_1 e HuIFN- α_2 com maior abundância (HISCOTT *et al.*, 1984). Embora a diferença entre estes dois IFN seja de somente 29 aminoácidos, o HuIFN- α_2 mostra maior atividade em células bovinas e humanas e o HuIFN- α_1 mostra maior atividade em células humanas, e alguma atividade em células murinas (STEWART *et al.*, 1980). Várias construções foram feitas na tentativa de determinar o domínio protéico, como a construção do híbrido HuIFN- $\alpha_2/\alpha_1/\alpha_2$, compreendendo o resíduo de aminoácido 63 a 92, indicando que a atividade em células humanas está relacionada a sequência no N-terminal. Esta região difere em 13 das 63 posições dos aminoácidos e se estende do N-terminal até a α -hélice **B**. A atividade em células murinas está localizada na porção C-terminal do HuIFN- α_1 , o que também permitiu sugerir que a interação com receptores estaria ligada a 2 sítios de ligação (STREULI *et al.*, 1981).

O H_uIFN- α_1 possui uma atividade específica em células humanas de 2 a 3x10⁸ U/mg de proteína, 50 a 100 vezes maior do que o H_uIFN- α_8 , apesar destes interferons apresentarem uma diferença de 35 aminoácidos em um total de 166. Cerca de 14 híbridos foram construídos com base nos aminoácidos 62, 92 e 150 e todos apresentaram atividade antiviral similar em células bovinas (MEISTER *et al.*, 1986). A análise das construções, em células humanas, mostrou que a porção compreendida entre os resíduos 1 a 61, do H_uIFN- α_8 , é responsável pela atividade antiviral nestas células (MEISTER *et al.*, 1986). Alguns híbridos com o N-terminal de H_uIFN- α_1 , perderam a atividade em células humanas, o que é indicativo de que nem a região N ou C-terminal sozinhos, são responsáveis pela atividade antiviral. Também foi observado que o N-terminal também é necessário para a atividade antiproliferativa dos H_uIFN- α (FIDLER *et al.*, 1987).

Os subtipos H_uIFN- α_2 e H_uIFN- α_{17} diferem em 30 posições em seus aminoácidos e apresentam atividade antiviral em células bovinas e humanas, mas, por outro lado, divergem na atividade antiviral em células murinas, onde o H_uIFN- α_{17} é mais ativo. A construção de híbridos com estas sub-espécies de IFN mostrou que a atividade em células murinas está relacionada aos resíduos 1 a 121 do H_uIFN- α_{17} , onde estes IFN diferem em apenas 7 aminoácidos (MIZOGUCHI *et al.*, 1985).

A análise das 14 sub-espécies de interferon humano naturais existentes foi utilizada para a construção do IFN consenso (H_uIFN_{cons}) e expresso em *E. coli*. Esta molécula sintética apresentou todas as atividades observadas nos subtipos de H_uIFN- α , estando muito próxima do H_uIFN- α_{21} , de quem difere em apenas 10 resíduos de aminoácidos. Além disso, assemelha-se ao H_uIFN- β com 30% de identidade. A sua atividade antiviral foi 10 vezes superior a qualquer H_uIFN- α e quando comparado ao H_uIFN- α_2 mostrou resultados semelhantes não só na atividade antiviral, mas também na antiproliferativa e em células NK (OZES *et al.*, 1992).

Muitos estudos têm sido feitos, no sentido de determinar a atividade antiproliferativa dos subtipos diferentes de H_uIFN- α . Os subtipos H_uIFN- α_{21a} e H_uIFN- α_{2c} foram utilizados na construção de 8 recombinantes híbridos (HU *et al.*, 2001). Os dados obtidos neste trabalho demonstraram que, a região compreendida entre os aminoácidos 81-95 é importante para a atividade antiproliferativa. Além disso, através da substituição de um

aminoácido em regiões específicas da molécula, por mutagênese sítio dirigida, também ficou estabelecido que a S na posição 86 e N na posição 90, quando substituídos por Y, aumentam a atividade antiproliferativa. Neste mesmo estudo, a análise por dicroísmo circular mostrou que as substituições destes aminoácidos não causaram modificações na estrutura conformacional da proteína. A introdução de aminoácidos hidrofóbicos, na posição 86, assim como na região amino terminal, podem ser importantes para a interação da molécula com seu receptor (Hu *et al.*, 2001). A partir desses resultados, ficou demonstrado a importância da α -hélice **C**, principalmente os resíduos 81 a 95, na atividade antiproliferativa dos subtipos de HuIFN- α e que os resíduos 86 e/ou 90 podem estar relacionados com a interação ao receptor.

Além dos estudos dos híbridos HuIFN- α_{21a}/α_{2c} , realizado por HU *et al.* (2001), que relaciona estes com as atividades antiproliferativa e antiviral, estudos com estes mesmos híbridos demonstraram uma diferença também nas suas propriedades antigênicas. SCHMEISSER *et al.* (2002) utilizando diferentes anticorpos monoclonais (anti-IFN- α_1 , anti-IFN- α_2 e anti-IFN- $\alpha_{8/18}$), mostraram que estes sub-tipos estudados (HuIFN- α_{21a} e HuIFN- α_2) são antigenicamente distintos, uma vez que o anticorpo anti-IFN- α_1 reagiu com o HuIFN- α_2 , mas não com o HuIFN- α_{21a} . Além disso, as regiões N-terminal (aminoácidos 1-75) do HuIFN- α_{21a} e região C-terminal (aminoácidos 76-166) do HuIFN- α_2 (híbrido HuIFN- α_{21a}/α_2), foram analisadas através de ensaios de ELISA, utilizando os mesmos anticorpos citados. Os resultados obtidos mostraram que a inserção dos aminoácidos 112-132 (α -hélice **D**) do HuIFN- α_2 na molécula do HuIFN- α_{21a} , foi responsável pela diminuição da imunoreatividade deste IFN com os anticorpos monoclonais testados. Entretanto, a inserção dos aminoácidos 76-81 (alça **bc**) do HuIFN- α_2 na molécula do HuIFN- α_{21a} , restaurou a imunoreatividade deste híbrido. Também neste mesmo estudo com este híbrido, substituições dos aminoácidos nas posições 86 e 90 (α -hélice **C**), afetaram a imunoreatividade desta molécula. Estes dados sugerem a importância das α -hélices **C** e **D** e alça **bc** nas propriedades antigênicas dos HuIFN- α (SCHMEISSER *et al.*, 2002).

2.9.2- HÍBRIDOS ENTRE ESPÉCIES DE IFN- α

IFN murino/humano – os híbridos contruídos utilizando a região 1-121 do HuIFN- α e resíduos 122-165/167 do MuIFN- α , foram testados, em relação a atividade antiviral, em células humanas, murinas e bovinas. Estes estudos demonstraram que os resíduos de aminoácidos N-terminal 1-62 e o resíduo interno de 62-122 do HuIFN- α estão relacionadas a atividade antiviral em células humanas, enquanto que somente os resíduos compreendidos entre 62-122 estão relacionados a atividade em células bovinas (HORISBERGER & DI MARCO, 1995). A atividade em células murinas reside nos 104 aminoácidos do C-terminal. Os 44 resíduos do C-terminal parecem ser os mais importantes e compreendem as α -hélices **D** e **E**.

IFN bovino/humano – a atividade antiviral do BoIFN- α C é 10^5 vezes menor em células humanas em comparação com sua atividade em células bovinas. Esta diferença significativa serviu para comprovar o papel dos resíduos 1-44 do HuIFN- α , na atividade antiviral em células humanas. O HuIFN- α J1 foi utilizado na construção dos híbridos tendo sido utilizados 2 regiões: uma compreendendo a região 1-44 e outra, os resíduos 10-44 (SHAFFERMAN *et al.*, 1987). A região entre os aminoácidos 10-44 mostrou ser crítica para a atividade antiviral em células humanas, sendo observado um aumento de 10^4 vezes na atividade antiviral em células humanas. Estes dados sugerem que a α -hélice **A** e parte da alça **ab** são responsáveis pela alta atividade antiviral em células humanas e presumivelmente pela interação com o receptor.

2.9.3- HÍBRIDOS DE IFN- β/α

Em estudos realizados com os rHuIFN- β , rHuIFN- α_{2b} e IFN híbridos para as α -hélices **A**, **B** e **C** e alças **ab**, **bc** e **cd**, em nosso laboratório (CARVALHO, 1998), foi possível mostrar a importância destas α -hélices e alças, dentro da estrutura das moléculas de maneira geral. Todos os híbridos contruídos foram obtidos a partir dos genes que codificam para os HuIFN- α_{2b} e HuIFN- β , clonados em vetor pDS₅₆. Os modelos dos IFN híbridos demonstraram que as estruturas substituídas mantiveram a conformação similar à da suas moléculas de origem, o que indica que cada molécula deva apresentar algumas

características exclusivas do rHuIFN- α_{2b} e do rHuIFN- β . Porém algumas diferenças foram observadas no rHuIFN- β 107 α_{2b} , no qual foram substituídas as α -hélices **A**, **B**, **C** e alças **ab**, **bc** e **cd** do rHuIFN- α_{2b} , pelas mesmas do rHuIFN- β , apresentando este um encurtamento da α -hélice **C**, porém uma alça **cd** mais longa. No rHuIFN- α_{2b} 109 β , onde foram substituídas as mesmas α -hélices do rHuIFN- β , pelas do rHuIFN- α_{2b} , algumas mudanças estruturais também foram observadas na região C-terminal da alça **cd** e N-terminal da α -hélice **D**.

Além destas mudanças estruturais dos híbridos rHuIFN- β 107 α_{2b} e rHuIFN- α_{2b} 109 β , mudanças também de atividade antiviral nos diferentes sistemas celulares testados foram observadas. O híbrido rHuIFN- β 107 α_{2b} apresentou atividade antiviral em células Wish e Vero, entretanto não apresentou atividade antiviral detectável em células MDBK e L-929. Já o híbrido rHuIFN- α_{2b} 109 β , apresentou atividade antiviral em todas as células testadas (Wish, Vero, MDBK e L-929). Portanto estas variações observadas na atividade antiviral destes híbridos em células MDBK, sugere que a espécie-especificidade do HuIFN- α_{2b} parece não estar somente relacionada à alça **ab**, mas também à outras estruturas localizadas em algumas das α -hélices **B** e **C** e/ou nas alças **bc** e/ou **cd**. Este dado indica que devam existir sítios nas regiões N-terminal ou C-terminal do HuIFN α_2 , importantes na manutenção da atividade antiviral em células MDBK. Em células murinas L-929 a espécie especificidade do HuIFN- α_{2b} foi relacionada à α -hélice **A**, uma vez que esta atividade foi restabelecida no híbrido rHuIFN- α_{2b} 109 β , assim como mostrada para o híbrido rHuIFN- α_{2b} 45 β , também construído por CARVALHO, (1998), cuja α -hélice **A** e alça **ab** do HuIFN- β , foi substituída pelas mesmas do IFN- α_{2b} .

Um dos IFN híbridos construídos por CARVALHO (1998), denominado rHuIFN- α 44 β 106 α , no qual foram substituídas as α -hélices **B** e **C** e alças **bc** e **cd** do HuIFN- α_{2b} pelas mesmas do HuIFN- β , não foi utilizado por este autor em seu trabalho. Nenhum teste de atividade biológica com este híbrido foi feito. Sendo assim, para relacionarmos as α -hélices **B** e **C** e alças **bc** e **cd** com a atividade biológica dos HuIFN- α_{2b} e HuIFN- β , assim como compararmos sua atividade biológica com aquela dos híbridos construídos em nosso trabalho, este híbrido foi produzido e utilizado por nós, nos testes de atividades biológicas.

Além dos híbridos construídos por CARVALHO (1998), outras construções foram feitas em nosso laboratório. Um destes híbridos, denominado rHuIFN- β 131 α , foi construído durante minha dissertação de mestrado, BRITO (2000), e neste híbrido foi substituída a α -hélice **E** do rHuIFN- β pela mesma do rHuIFN- α_{2b} . Foram construídos também os IFN recombinantes rHuIFN- β 131 e rHuIFN α_2 128, dos quais foram substituídos os aminoácidos H131 para R131 e L128 para R128, respectivamente, ambos no final da α -hélice **D**. A atividade antiviral específica foi observada para todos os IFN construídos em células Vero, entretanto somente os rHuIFN- α_{2b} e rHuIFN- α_{2b} 128, apresentaram atividade em MDBK e nenhum deles, apresentaram atividade em L-929. Os dados obtidos mostraram que a α -hélice E do HuIFN- α_{2b} , não teve influência na atividade antiviral ou espécie especificidade destes IFN humanos (BRITO, 2000).

3 - OBJETIVOS

3.1- OBJETIVO GERAL

Estudar a relação entre estrutura e função dos HuiFN- α e HuiFN- β , utilizando técnicas de engenharia genética, para construção de híbridos de HuiFN- $\beta\alpha$ e HuiFN- $\alpha\beta$.

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 - Construir híbridos de interferons humanos rHuiFN- α_{2b} e rHuiFN- β , baseados nas substituições das α -hélices *D* e *E* e alças *cd* e *de*.
- 2 - Verificar a atividade antiviral dos interferons híbridos.
- 3 - Verificar a neutralização da atividade antiviral dos híbridos por anticorpos policlonais.
- 4 - Detectar os genes induzidos pelos interferons recombinantes e híbridos.
- 5 - Verificar a atividade biológica do híbrido rHuiFN- $\alpha_{44}\beta_{106}\alpha$.
- 6 - Comparar a atividade biológica do híbrido rHuiFN- $\alpha_{44}\beta_{106}\alpha$, com os híbridos construídos.
- 7 - Relacionar a estrutura e função das α -hélices e alças com as atividades biológicas dos interferons, em cultura de células.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1- CONSTRUÇÃO DOS HÍBRIDOS

4.1.1- INICIADORES

As modificações introduzidas nas moléculas dos HuIFN- α e HuIFN- β foram feitas através da técnica do PCR (INNIS, 1990), adicionando-se aos diversos iniciadores os sítios de enzimas de restrição desejados, de tal forma que permitissem a construção dos híbridos. Nos IFN controles e híbridos construídos, foram inseridos o sítio para a enzima de restrição **MLU I** nos DNA que codificam para estes IFN. A inserção do sítio da enzima de restrição, acarretou na modificação de um aminoácido ácido aspártico (D94) para alanina (A94) na molécula do HuIFN- α_{2b} e a modificação de uma histidina (H97) para alanina (A97), na molécula do HuIFN- β . Assim, nos híbridos construídos, foram substituídas as α -hélices **D** e **E** e alças **cd** e **de** do rHuIFN- α_{2b} pelas mesmas do rHuIFN- β e vice versa. Estes híbridos foram denominados rHuIFN- $\alpha_{94\beta}$ e rHuIFN- $\beta_{97\alpha}$, sendo os números relacionados à posição do aminoácido que foi mutado. O molde para a amplificação dos produtos de PCR foram os HuIFN- α_{2b} e HuIFN- β clonados no laboratório, alguns deles já adicionados de enzimas de restrição por engenharia genética (CARVALHO, 1998).

Os iniciadores foram desenhados como descrito a seguir:

1. Através do alinhamento das seqüências de aminoácidos dos HuIFN- α_{2b} e - β , conforme descrito por MITSUI *et al.* (1993), e baseando na estrutura tridimensional do MuIFN- β , determinada por difração de raios X, avaliando assim as regiões correspondentes as α -hélices.
2. Através do alinhamento das seqüências de nucleotídeos e introdução de sítios para enzimas de restrição, tornando possível a substituição das α -hélices e alças correspondentes.

Os iniciadores empregados para a inserção do sítio da enzima de restrição **Mlu I** na seqüência de nucleotídeos, que codificavam para os HuIFN- α_{2b} e HuIFN- β foram:

IFN α Mlu 5' 5'- TCA TAT ACG CGT TGG AAG CCT GT -3'
Mlu I

IFN α Mlu 3' 5'- TCC CCA CGC GTT CAG CTG CTG GTA -3'
Mlu I

IFN β Mlu5' 5'- ATA CCG ACG CGT TGA AGA CAG TCC TG -3'
Mlu I

IFN β Mlu3' 5'- CGA TGA CGC GTT TAT CTG ATG ATA GAC-3'
Mlu I

Além disso, foram empregados iniciadores localizados nas regiões N-terminal e C-terminal, para amplificação do fragmento que codifica para a molécula inteira de ambos os IFN, tendo como base as seqüências dos HuIFN- α_{2b} e HuIFN- β descritas (OHNO & TANIGUCHI, 1981). Os iniciadores foram identificados como P α 5', P α 3', P β 5' e P β 3', sendo que a letra grega define o tipo de interferon e o numeral a posição na fita positiva. Além disso, foram adicionados os sítios das enzimas de restrição **BamH I** na posicao 5' e **Hind III** na posicao 3' dos iniciadores, permitindo assim a inserção nos plasmídeos de expressão (pDs₅₆ ou pQE). Os iniciadores são mostrados abaixo:

P α 3' 5'-CCCAAGCTTCCTTACTTCTTAAAC-3'
Bam HI

P α 5' 5'-CGCAGGGATCCTGTGATCTGCCTCAAACC-3'
HindIII

P β 5' 5'-GCCGGATCCTTACAACCTTGGATTCCT-3'
BamHI

P β 3' 5'-GCCAAAGCTTAGTTTCGGTCATTCCTGTAAGTC-3'
HindIII

O híbrido contruído por CARVALHO (1998), foi também produzido e utilizado em nosso trabalho, nos testes de atividades biológicas. Ele foi construído, inserindo-se os sítios das enzimas de restrição **PST I** e **XHO I** nos DNA que codificam para os HulFN- α_{2b} e HulFN- β . A inserção do sítio para PST I acarretou na substituição dos aminoácidos glicina (G44) e asparagina (N45), para leucina (L44) e glutamina (Q45). Já a inserção do sítio para XHO I, acarretou na substituição do aminoácido metionina (M111) para ácido glutâmico (E111). Sendo assim, o híbrido construído a partir destas mutações foi denominado rHulFN- $\alpha_{44}\beta_{106\alpha}$.

Este híbrido citado foi clonado em vetor de expressão pDS₅₆ (CARVALHO 1998). O plasmídeo foi digerido com as enzimas Bam HI e Hind III, para retirada do inserto, uma vez que foi observado em experimentos anteriores, que a proteína híbrida clonada, não era produzida pela *E coli*. O inserto obtido foi purificado e clonado em vetor de expressão pQE 9 (QUIAGEN). Após a clonagem deste híbrido em pQE 9, foi então possível produzir a proteína e utilizá-la em nossos ensaios biológicos.

4.1.2- AMPLIFICAÇÃO POR PCR

A amplificação dos fragmentos dos genes que codificam para os HulFN- α_{2b} e HulFN- β , foi feita em duas etapas para a introdução do sítio **Mlu I**. Uma reação foi feita utilizando os iniciadores P $\alpha_{5'}$ /IFN α Mlu3' e P $\beta_{5'}$ /IFN β Mlu3', que amplificam a região que codifica os aminoácidos de 1-94, do HulFN- α_{2b} , ou 1-97, do HulFN- β , respectivamente. A região das moléculas relativas a estes fragmentos, são as α -hélices **A**, **B** e **C** e alças **ab** e **bc**. Outra reação foi feita utilizando os iniciadores P $\alpha_{3'}$ /IFN α Mlu5' e P $\beta_{3'}$ /IFN β Mlu5', que amplificam a região compreendida entre os aminoácidos 94-165, do HulFN- α_{2b} , e 1-97, do HulFN- β , respectivamente. A região correspondente a estes fragmentos são as α -hélices **D** e **E** e alças **cd** e **de** das moléculas.

Após a amplificação dos fragmentos e ligação destes entre si, de maneira a formar os recombinantes rHulFN- α_{94} e rHulFN- β_{97} , assim como os híbridos rHulFN- $\alpha_{94}\beta$ e rHulFN- $\beta_{97\alpha}$, estes insertos foram ligados ao vetor e bactérias foram transformadas. A seleção dos clones obtidos, foi feita utilizando os iniciadores P $\alpha/\beta_{5'}$ e P $\alpha/\beta_{3'}$, de acordo

com o tipo IFN utilizado. No caso das construções de IFN híbridos, a verificação dos clones foi feita utilizando os iniciadores Pβ5' e Pα3' ou vice-versa, dependendo da construção.

Nas reações de amplificação por PCR foram utilizados 10ng de DNA do plasmídeo pDS₅₆/HuIFN-α_{2b}/β, 10pM dos iniciadores, 0,2mM dos desoxiribonucleotídeos, 10μl de tampão 10x Taq polimerase, 1,5mM MgCl₂, 0,125U de taq polimerase (Promega, USA) e H₂Odd estéril q.s.p. 100μl. Após homogeneização, foram adicionados à reação 80μl de óleo mineral (Nujol). A amplificação foi feita em aparelho de PCR (Perkin Elmer, USA) utilizando as seguintes condições:

01 ciclo: 95°C/5' - 54°C/30'' - 72°C/1'

30 ciclos: 95°C/30'' - 54°C/30'' - 72°C/1'

01 ciclo: 95°C/30'' - 54°C/30'' - 72°C/10'

4.1.3- FRACIONAMENTO ELETROFORÉTICO E PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR

O produto de PCR (10μl) adicionado a 1μl de tampão de amostra (50% glicerol, 40% azul de bromofenol 0.85% p/v, 10% v/v 10x TAE) foi fracionado em gel de agarose (1%), em tampão TAE, a 50V, por 40 a 60 minutos. O fragmento de DNA foi visualizado e fotografado sob iluminação luz UV onda longa (366nm). O tamanho dos fragmentos foi estimado pela comparação com o controle positivo obtido (amplificação do fragmento inteiro dos IFN). As bandas de aproximadamente 280/230pb do rHuIFN-α e 290/210 pb do rHuIFN-β foram recortadas do gel e o DNA purificado.

A purificação dos fragmentos de DNA amplificados por PCR, foi feita com o kit "Wizard PCR Preps DNA Purification System" (Promega, BRA), segundo o protocolo do fabricante. Em resumo, as bandas recortadas do gel de agarose de baixo ponto de liquefação, foram fundidas a 70°C e adicionado 1ml de resina de purificação. Em seguida a resina foi passada em coluna, a qual se fixa o DNA, sendo então a coluna lavada com etanol 80% e o DNA eluído em 50 μl de água e estocado a -20°C.

4.2- CLONAGEM

4.2.1- LIGAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR e purificados (10 μ l) foram digeridos em presença de 1U da enzima de restrição **Mlu I** (GIBCO-BRL, USA), 2 μ l de tampão 3 e H₂O dd q.s.p. 20 μ l, sendo em seguida incubados a 37°C por 2 h. Em seguida, os insertos foram fracionados em gel 1% agarose de baixo ponto de liquefação, em tampão TAE 1x, sendo o DNA visualizado com luz UV manual (UVGL-25,UVP inc., USA), com comprimento de onda longa (366nm), para se evitar quebras no DNA. As bandas correspondentes ao inserto foram cortadas do gel e purificadas utilizando-se o Kit "Wizard PCR Preps DNA Purification System" (Promega, BRA). Os fragmentos de DNA, após digestão, foram então ligados entre si e inseridos no vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega, BRA).

A reação de ligação foi feita utilizando uma relação molar de 3 partes de inserto para 1 parte de vetor, sendo que a concentração de ambas foi avaliada após corrida em gel 1% agarose, em tampão TAE 1x. Nesta reação foram empregados aproximadamente 25ng de inserto, 50ng do vetor, 1U de T4 DNA Ligase (Promega, BRA), 1 μ l de tampão de ligação 10x e H₂O para uma reação total de 10 μ l. A reação foi incubada a 14°C em aparelho Termomixer Confort (EPPENDORF), durante 16 a 18 h. O controle da ligação foi feito em tubo separado onde foram adicionados os mesmos reagentes da reação de ligação, exceto o inserto.

4.2.2- PREPARO DAS BACTÉRIAS COMPETENTES

A bactéria hospedeira *Escherichia coli*, linhagem M15, foi utilizada na produção das proteínas recombinantes e a linhagem DH5 α , utilizada para as clonagens dos IFNs. Ambas foram transformadas com os vetores pDS₅₆/IFNs e pGEM-T/IFNs respectivamente. Para a transformação, as bactérias foram preparadas de maneira a se tornarem competentes para receberem o plasmídeo. Para tanto, estas foram inoculadas em 50ml de Meio Lúria Bertani (LB) e incubadas sob agitação (180 rpm, Shaker Superohm G-25, Brasil), a 37°C, durante 16h. Desta cultura, foram transferidos 4ml para 400ml de LB e

incubados nas mesmas condições. O crescimento foi acompanhado até que cada cultura estivesse numa $D.O_{600nm}$ igual a 0.375, correspondendo a um crescimento equivalente à metade da fase logarítmica. As bactérias foram centrifugadas a 1600xg, durante 30 minutos, a 4°C e o sedimento homogeneizado em 80 ml da solução de 75 mM $CaCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 8.0. A suspensão bacteriana foi incubada a 0°C por 20 minutos e centrifugada como anteriormente. O sedimento celular foi homogeneizado com 16ml da mesma solução, distribuído em alíquotas (100µl), as quais foram congeladas rapidamente em mistura gelo seco-álcool e estocadas à temperatura de -70°C.

4.2.3- TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Aos 100µl de bactéria competente *E. coli* DH5α foram adicionados 5µl provenientes da reação de ligação dos insertos ao vetor de pGEM-T e 95µl de T.E., pH 7,2. A reação foi suavemente agitada e imediatamente incubada em banho de gelo, por 30 minutos, quando foi feito o choque térmico, incubando-se a mistura a 42°C por 120 segundos e banho de gelo novamente. Foi então adicionado 1 mL de meio LB (bacto triptona 1% p/v, extrato de levedura 0.5% p/v, 171mM NaCl) às bactérias, sendo estas incubadas a 37°C por 60 minutos. As bactérias foram então sedimentadas em microcentrífuga, homogeneizadas em 100µl de meio LB e os volumes de 30 e 70µl foram semeados em placas de Petri contendo LB ágar acrescido de 100µg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas em estufa 37°C, por 16h. Paralelamente foram feitos controles do crescimento de bactérias competentes não transformadas, em placas contendo ágar LB (1.5% p/v ágar, 0.5% p/v extrato de levedura, 0.1% p/v triptona, 0.5% p/v NaCl) suplementado ou não, com ampicilina.

4.2.4- IDENTIFICAÇÃO DOS CLONES (INNIS, 1990)

A identificação dos clones foi feita pela reação de PCR, utilizando-se os iniciadores Pα5', Pα3', Pβ5' e Pβ3' para os respectivos HuIFN-α ou β. As reações de amplificação foram realizadas utilizando-se 1µl dos clones (após o seu crescimento em 100µl de meio LB 1x, durante aproximadamente 3h), 10pM de cada iniciador, 0,2µM de cada nucleotídeo

(dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 μ l de tampão 10x, 1,5mM de MgCl₂, 0,5U de Taq Polimerase (Promega, BRA) e H₂O dd estéril q.s.p. 20 μ l.

O produto de PCR, ao qual foi adicionado 1 μ l de tampão de amostra, foi aplicado em gel de agarose (1%), em tampão TAE 1X e o fracionamento efetuado a 100V, por 20 a 40 min. O fragmento de DNA foi então visualizado pelo tratamento com brometo de etídio e fotografado sob luz UV (366nm). O tamanho dos fragmentos foi estimado pela / comparação com o controle positivo obtido (amplificação do fragmento inteiro dos IFN).

4.3- EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

4.3.1- PREPARAÇÃO EM PEQUENA ESCALA

A extração plasmidial em pequena escala foi feita utilizando o Kit “Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega, BRA). Os clones positivos no PCR foram crescidos em 10ml de meio LB suplementado com 100 μ g/mL de ampicilina. A cultura bacteriana foi centrifugada por 30 minutos e o sedimento das bactérias foi homogeneizado em solução de ressuspensão. A essa solução foi adicionado tampão de lise, sendo em seguida misturada e incubada 5 minutos a temperatura ambiente e logo após, adicionado o tampão de neutralização. O sobrenadante foi purificado em coluna com resina, na qual se liga o DNA plasmidial. A coluna foi lavada com etanol 80% e o DNA eluído em 100 μ l de H₂O dd estéril e estocado a -20°C. Estes plasmídeos foram utilizados em reações de digestão e em reações de sequenciamento.

4.3.2- PREPARAÇÃO EM LARGA ESCALA (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Para a produção do plasmídeo em larga escala, foram inoculados 5ml de uma cultura de bactérias transformadas em 500ml de meio LB suplementado com 100 μ g/ml de ampicilina. Esta cultura foi incubada a 37°C, sob a agitação de 100 rpm, por 18 h. As bactérias foram sedimentadas por centrifugação por 30 minutos, 3500xg, a 4°C e o precipitado solubilizado em 20ml de tampão GTE (4.10.5) contendo 0.1g (p/v) de lisozima

e incubado a temperatura ambiente por 25 minutos. Foram então adicionados 40ml de solução 0,2M NaOH e 1% (p/v) SDS, preparada no momento do uso, homogeneizado, incubado em banho de gelo durante 5 minutos. Após esta incubação, foram adicionados 20ml de 3 M acetato de potássio (KoAc) pH 5,0 gelado, a reação homogeneizada e novamente incubada em banho de gelo por 15 minutos. A mistura foi centrifugada a 3800xg, refrigerada a 4°C e em seguida filtrada em 8 camadas de gaze hidrófila. Ao filtrado foram adicionados 0.7 vezes do volume de álcool isopropílico (Merck, Alemanha). A mistura foi incubada à temperatura ambiente, por 10 minutos e centrifugada 3800xg, durante 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado, o precipitado solubilizado em 10ml de TE (4.10.30) e misturado com 8.6 g de cloreto de cézio (BRL, EUA). Após a homogeneização, a solução foi transferida para tubos de ultracentrifugação com capacidade para 18,5ml (Sorvall, EUA.) e acrescentados 1mg/ml de brometo de etídio (EtBr) que foram lacrados e então centrifugados a 243.000xg, por 18 h, em ultracentrífuga Sorvall.

O DNA do plasmídeo fracionado foi visualizado em luz ultravioleta manual (366 nm), coletado com auxílio de agulha 40x12, acoplada em seringa 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 e centrifugação por 15 segundos, 500xg, a fase superior contendo 2-butanol e EtBr foi desprezada. Esta operação foi repetida até que a fase inferior ficasse totalmente clara, quando então foi coletada e o seu volume completado com H₂O dd estéril q.s.p. 10ml. Foram adicionados ao tubo 17ml de álcool etílico absoluto (Merck, Alemanha) e então o material homogeneizado e centrifugado a 3.200xg, durante 40 minutos, a temperatura ambiente para posterior coleta do DNA.

O DNA precipitado foi solubilizado em 500µl de TE (4.10.30) estéril e sua concentração calculada, após leitura da DO_{260nm} de uma alíquota diluída 1/50 em H₂O. Para o cálculo foi considerado que uma unidade de DO corresponde a uma solução de DNA de concentração 50µg/ml (SAMBROOK *et al.*, 1989). O plasmídeo obtido foi então estocado a -20°C.

4.4- SEQÜENCIAMENTO

Os fragmentos de DNA purificados, clonados no plasmídeo pGEM-T, foram seqüenciados pelo método reação do sequenciamento automático, utilizando o kit "ET Dyenamic Kit For Mega Bace" (Amersham Pharmacia Biotech, USA).

4.5 - PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS INTERFERONS RECOMBINANTES

Os produtos de PCR clonados em pGEM-T, foram transferidos para o plasmídeo pDS₅₆ 6xHis (BUJARD, 1987) ou pQE9 (QUIAGEN), para expressão em *E. coli*. Estes plasmídeos contêm um sítio promotor/operador (P/O₂) localizado próximo ao sítio de ligação do ribossomo (RBS). A atividade deste promotor é reprimida pela ligação de uma proteína repressora lac ao operador. A atividade do promotor pode ser restabelecida pela adição de β -D-thiogalactoside (IPTG) o qual inativa o repressor liberando assim o operador. Após a região de ligação ao ribossomo (RBS) segue-se o código de iniciação (ATG), as seqüências que codificam para 6 moléculas do aminoácido histidina e um sítio de clonagem adjacente, que permite a inserção do fragmento de DNA a ser expresso. Finalmente, este plasmídeo possui três códon de terminação da tradução nas três diferentes janelas de leitura. A inserção das histidinas adjacentes permite a fácil purificação e concentração da proteína recombinante produzida, através da cromatografia de afinidade em resina de quelato de níquel (STÜBER, 1990). Na FIGURA 6, estão ilustradas estas regiões, assim como os sítios das enzimas de restrição presentes no sítio de clonagem.

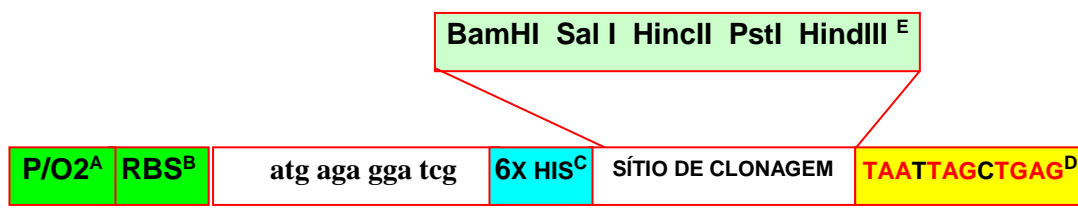


FIGURA 6: Principais regiões do sítio de clonagem do plasmídeo pDS₅₆.

(A) - Seqüência do promotor e do operador; (B) - Seqüência de ligação ao ribossomo; (C) - Seqüência que codifica para 6 His; (D) - Códon de terminação da tradução para qualquer das três janelas de leitura; (E) - Sítio de clonagem.

A identificação dos clones positivos foi feita através do PCR, assim como descrito anteriormente para os insertos clonados em pGEM-T. A expressão dos HuIFN recombinantes híbridos foi feita pela indução das bactérias com 4mM de IPTG, após atingirem uma DO_{600nm} de 0,7 por 5 horas, a 37°C. Amostras não induzidas também foram feitas como controle da indução dos IFN recombinantes. Após 5 horas de indução as bactérias foram sedimentadas, o sobrenadante desprezado e o precipitado homogeneizado em 10ml de tampão A (6M Guanidina HCl, 100mM fosfato de sódio, 10mM tris/HCl pH 8,0), sob agitação durante 30 minutos a 100rpm. O lisado bacteriano foi centrifugado a 10.000 rpm em centrífuga Sorval rotor S34 por 15min a 4°C, o líquido sobrenadante foi coletado e procedida então, a purificação por cromatografia de afinidade em quelato de Ni^{2+} .

4.5.1- PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Ao sobrenadante obtido, foram adicionados 1ml da resina de quelato de níquel (QIAGEN, EUA) carregada com Ni^{2+} e previamente equilibrada com tampão A (6M Guanidina HCl, 0.1M fosfato de sódio, 0,01M tris/HCl pH 8). A mistura resina/rHuIFN foi colocada em um tubo cônico de 50ml, este foi selado e então agitado em um tambor rolante a aproximadamente 25rpm durante 1h. Logo em seguida, a mistura foi transferida para uma coluna de dimensões de 1cm diâmetro por 6cm de altura onde a resina foi adicionada e o líquido restante correspondente à fração residual (proteínas não ligadas à resina), foi coletado em tubo falcon 15 ml. Em seguida foi feita eluição da proteína ligada a resina, utilizando-se os seguintes eluentes, sendo os tampões B, C, D, E, F e G, a mesma fórmula, mudando somente o pH (8M uréia, 0.1M fosfato de sódio, 0,01M tris/HCl):

- a) O tampão A, num volume de 5x ao da coluna, sendo coletado em uma fração;
- b) O tampão B, pH 8,0, coletado em uma fração;
- c) O tampão C, pH 6,0, também coletado em uma fração;
- d) Os tampões D (pH5,5), E (pH5,0), F (pH4,5) e G (pH4,0) foram coletados em frações de 500 μ l;
- e) A coluna foi lavada com tampão H (6M Guanidina-HCl, 0.2M CH_3COO_4 , pH 2.7) e o eluato desprezado.

4.5.2- CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS EM GEL SDS – PAGE (LAEMMLI, 1970)

As amostras de cada fração foram diluídas 2 vezes em tampão de amostra de proteína (20% glicerol, 2%SDS, 0,375M Tris pH8,8, 0,75M β -Mercaptoetanol e 0,25 % v/v do corante azul de bromofenol), fervidas a 100°C por 5 minutos e analisadas em gel SDS-PAGE 12,5%. Os marcadores de peso molecular usados foram padrões de proteínas com mobilidade relativa que variaram entre 18 a 66 kDa. As frações que apresentaram maior grau de pureza quando fracionadas em PAGE foram agrupadas e dialisadas em PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄, 1.4mM K₂HPO₄) com 0,025% SDS. Os géis guardados para registro foram corados por 1 hora a 37°C com agitação em solução de corante coomassie blue, descorados em solução fixadora I e então mantidos em solução de etanol 10% até desaparecimento da coloração de fundo. Os géis foram secos entre duas folhas de papel celofane, sendo estas folhas esticadas e presas sobre uma placa de vidro durante 48h a temperatura ambiente.

4.6- ENSAIOS BIOLÓGICOS

Todas as proteínas recombinantes obtidas foram testadas quanto à atividade biológica. Os ensaios biológicos de atividade antiviral, neutralização da atividade antiviral e indução de genes pelos interferons construídos, foram testados em diferentes sistemas celulares. As células foram cultivadas um número desconhecido de vezes no laboratório de vírus em meio mínimo essencial autoclavável (MEM-Gibco), acrescido de 5% de soro fetal bovino para a manutenção, além dos antibióticos fungizona, penicilina e gentamicina. As células foram mantidas em garrafas de 500ml, em tambor rolante a 37°C ou em garrafas plásticas de 25cm²/50ml em estufa de CO₂, a 37°C. O sub-cultivo foi realizado quando as células apresentavam 90% de confluência.

4.6.1- CÉLULAS

VERO

As células de linhagem contínua VERO são derivadas de rim do macaco verde e foram obtidas da "American Type Culture Collection", Maryland - U.S.A., na passagem nº 126. Estas células foram empregadas em todos os experimentos de infecção e titulação das amostras de vírus e dos Interferons recombinantes e híbridos.

WISH

As células de linhagem contínua WISH, derivadas de células amnióticas humanas, foram obtidas da "American Type Culture Collection" (catálogo número CCL-25), Maryland - EUA. Estas células foram utilizadas para a titulação dos interferons recombinantes e híbridos e para análise da expressão dos mRNA dos genes induzidos por estes interferons.

MDBK

As células MDBK, originadas de rim bovino, foram obtidas da "American Type Culture Collection", Maryland - E.U.A. Estas células foram utilizadas para a titulação dos interferons recombinantes e híbridos.

L- 929

As células L-929 (fibroblastos de camundongos) foram obtidas do Roche Institute of Molecular Biologie, Nutley, New Jersey, USA, gentilmente cedidas pelo Dr. Sidney Pestka. Estas células foram utilizadas para multiplicação do vírus da Encefalomiocardite de Camundongo (EMC), para a titulação e análise da expressão dos mRNA dos genes induzidos pelos interferons recombinantes e híbridos.

4.6.2- OS VÍRUS

VÍRUS DA ENCEFALOMIOCARDITE MURINA (EMC)

O vírus EMC foi cedido pelo Dr. IAN KERR, Londres, Reino Unido. Estoques de vírus foram obtidos em cultivos de fibroblastos de camundongo, em células L-929 e titulados pelo sistema de microtécnica, sendo o título obtido de 1×10^{11} TCID₅₀ (“Tissue Culture Infective Dose”).

VÍRUS HERPES BOVINO (BHV-1)

A amostra colorado do vírus BHV-1 foi gentilmente cedida pelo Dr. Maurício Resende, do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. O vírus foi titulado em células MDBK, sendo o título $1 \times 10^{7.04}$ TCID₅₀. Estes vírus foram utilizados nas titulações dos interferons recombinantes e híbridos em células MDBK.

4.7- MEDIDA DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.7.1- IFN PADRÃO E ANTICORPOS UTILIZADOS

Os IFN padrões utilizados foram: HuIFN- α_{2b} (cat. nº 6.a.23-902530) NIH e o rHuIFN- β clonado em vetor pDS₅₆ e produzido em nosso laboratório.

O hrHuIFN α_2/α_1 utilizado foi produzido em nosso laboratório, a partir de bactérias *E. coli* JM103 transformadas com o plasmídeo pPIT α_2 contendo o gene do hrHuIFN α_2/α_1 (WEBER *et al.*, 1987).

Os anticorpos policlonais anti-IFN de leucócitos (anti-HuIFN- α) foram produzidos em carneiros e gentilmente cedidos pela Dra. Barbara Dalton e Dra. Marilyn Paucker (Children Hospital, PA, EUA). Os anticorpos secundários anti-carneiro, ligados a peroxidase, utilizados nos ensaios de western blot, foram gentilmente cedidos pelo Dr. Carlos Chaves, do departamento de Bioquímica, deste instituto.

4.7.2- MEDIDA DA ATIVIDADE ANTIVIRAL

A titulação das amostras dos interferons recombinantes e híbridos foi feita em sistema de microtécnica (FERREIRA *et al.*, 1979). Os títulos dos interferons foram obtidos utilizando-se células VERO, WISH, MDBK e L-929. Em cada câmara foram adicionadas 60 mil células, sendo em seguida adicionado os interferons, os quais foram diluídos em MEM contendo 5% de SFB na razão de 2 e 200 μ l das diluições foram aplicados nas câmaras da placa de microtécnica. Quatro câmaras foram reservadas para o controle de células (células + meio) e outras quatro para o controle de vírus (células + meio + vírus). Após a diluição dos interferons, foram acrescentados 10, 100 ou 1000 TCID₅₀ do vírus EMC, dependendo do tipo celular e 200 TCID₅₀ do vírus BHV-1 em células MDBK. O efeito citopático (ECP) dos controles de vírus foi monitorado até 48 horas, sendo então feita leitura das monocamadas tratadas com os interferons. O título foi expresso pela recíproca da diluição na qual houve redução em 50% do ECP, quando comparado ao ECP observado nas câmaras controle de vírus.

4.7.3- NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL (FERREIRA *et al.*,1979)

Os interferons recombinantes e híbridos foram diluídos na razão de 2, em placa de microtécnica de 96 câmaras, em volume de 50 μ l de meio MEM. A seguir foram adicionados 50 μ l de anticorpo anti-IFN- α . A placa foi incubada a 37°C por 60 minutos em atmosfera com 5% CO₂ e após este tempo foram adicionadas células VERO e vírus EMC nas condições descritas anteriormente para a titulação. A neutralização foi observada com a diminuição do título viral dos interferons, quando estes foram neutralizados pelos anticorpos, comparados com os títulos dos interferons não tratados com os anticorpos.

4.8- GENES INDUZIDOS EM CELULAS: OBTENÇÃO DE RNA HIBRIDIZACAO

4.8.1- EXTRAÇÃO DO RNA CELULAR TOTAL

A extração do RNA total de células Wish e L-929, foi feita para verificação do acúmulo dos mRNA dos genes induzidos (6-16, 2'5'OAS, MxA e GBP) pelos IFN híbridos construídos.

Para tanto, estas células foram crescidas até 90% de confluência, sendo então tratadas ou não com 500U/ml dos interferons recombinantes e híbridos obtidos. Após 18 horas de tratamento, as células foram coletadas e processadas de acordo com o método de CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987) com algumas modificações. As culturas foram lavadas duas vezes com PBS e adicionadas de 2ml/garrafa (80cm² de área) de solução de RNAzol (tiocianato de guanidina 2M; citrato de sódio 12,5 mM 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 Pasteur, sendo os fluídos transferidos para microtubos previamente adicionados de 10% v/v de clorofórmio. A mistura foi então homogeneizada em vórtex, durante 30 segundos, seguido de incubação por 15 minutos em banho de gelo. Em seguida, o material foi centrifugado a 13.500rpm em microcentrífuga por 15 minutos, a 4°C. A fase aquosa foi coletada e transferida para outro microtubo. 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 13.500rpm por 30 minutos, a 4°C. O sedimento contendo o RNA foi lavado 2 vezes com etanol 75 %, seco à temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos e solubilizado em ddH₂O Depec (H₂O deionizada tratada com 0.05% de dietilpirocarbonato), quantificado por espectrofotometria e estocado a -70°C.

4.8.2- FRACIONAMENTO ELETROFORÉTICO DOS RNA (SAMBROOK *et al.*, 1989)

O fracionamento eletroforético foi feito utilizando-se 20µg de RNA total, 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. 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 um volume total 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 o fracionamento efetuado em tampão MOPS 1X a 50V, durante 90 a 150 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 removido através da lavagem em água autoclavada e o RNA transferido para a membrana de nylon.

4.8.3- TRANSFERÊNCIA DE “NORTHERN” (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Após o fracionamento eletroforético do RNA em gel de agarose, a posição dos RNA ribossomais 18S e 28S foi marcada, procedendo-se então à transferência por capilaridade dos RNA para membrana de nylon (Hybond N, Amersham, UK), conforme SAMBROOK *et al.*, (1989). A transferência foi feita em tampão SSC 10x por no mínimo 12 h. Após a transferência, a fixação dos RNA à membrana de nylon foi realizada pela exposição à luz UV (320nm) por 2 minutos. As membranas foram guardadas entre duas folhas de papel de filtro, seladas dentro de saco plástico e armazenadas a 4°C até momento do uso.

4.8.4- SONDAS MOLECULARES

Foram empregados como sondas moleculares:

- a) Um fragmento de 0,5 Kb correspondente ao cDNA do gene do interferon rHuIFN- α_{2b} clonado em pDS₅₆ entre os sítios de restrição de Bam HI e Hind III.
- b) Um fragmento de 0,7 Kb correspondente ao cDNA do gene 6.16, induzido por interferon, clonado no sítio EcoRI do plasmídeo pBR322, que foi gentilmente cedido Pelo Dr. Ian M. Kerr, Imperial Cancer Research Fund, Londres, Inglaterra.
- c) Um fragmento de 1,25 Kb do gene 2' 5' oligoadenilato sintetase, induzido por interferon, obtido de cDNA e clonado no plasmídeo pSP64 nos sítios de restrição SmaI/EcoRI, gentilmente cedido pelo Dr. Jean Content, Institute Pasteur, Paris, França.
- d) Um fragmento de 1,6 kb correspondente ao gene da proteína MxA, clonado no sítio Bam HI e Hind III do plasmídeo pUC 19, em nosso laboratório.
- e) Um fragmento de 1,6 kb do gene GBP Murino , induzido por interferon
- f) Para a normalização das quantidades de RNAs aplicadas nas canaletas, foi investigada a expressão do RNA ribossomal 18S. O oligonucleotídeo correspondente ao rRNA 18S humano, cuja sequência é complementar à sequência do gene na posição 1471 a 1550,

foi sintetizado pela Invitrogen, BR e purificado através de eletroforese em gel de poliacrilamida.

4.8.5- MARCAÇÃO ISOTÓPICA DAS SONDAS MOLECULARES (RIGBY *et al.*, 1977)

As sondas dos genes dos rHuIFN- α_{2b} , 6.16, 2' 5' oligoadenilato sintetase, MxA e GBP Murino, foram marcadas radioativamente utilizando-se [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP (Amersham Bioscience, UK) como radioisótopo, com atividade específica de 3000 Ci/mmol, de acordo com o Kit *Rediprimell* (Random Primer Labelling), Amersham Bioscience, UK. Para a marcação destas, a quantia de 2,5 a 50 ng de DNA foram diluídos em 45 μl de TE pH 8,0 (25mM Tris-HCl pH8,0; 1mM EDTA) e desnaturados por 5 minutos à 96° C, quando foram então adicionados às misturas de marcações (solução tampão, dATP, dGTP, dTTP, enzima exonuclease Klenow livre e iniciadores aleatórios), acrescidos de 5 μl de [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP e incubado por 30 minutos à 37° C. As reações foram interrompidas pela adição de 5 μl de EDTA 0,2M ou 50 μl de T.E. pH 8,0. As sondas marcadas foram purificadas através de cromatografia de filtração em coluna Sephadex G-50 (Sigma, USA) e eluídas em T.E pH 8,0.

O oligonucleotídeo 18S foi marcado na sua extremidade 3' OH pela transferência do grupo fosfato fornecido pelo ATP, contendo ^{32}P na posição γ , com atividade específica de 3000 Ci/mmol. A reação de marcação foi realizada com 5 μmoles de oligonucleotídeo (Invitrogen, Br), 5 μl de [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP 3000Ci/mmol (Amershan Bioscience, UK), 2 μl Tampão PNK 10X (Promega, USA), 1 μl de PNK 10u/ μl (Promega, USA) e água deionizada q.s.p. 20 μl . A reação foi incubada por uma hora, a 37°C, purificada através de cromatografia de filtração em coluna Sephadex G-50 e eluída em água deionizada.

4.8.6- HIBRIDIZAÇÃO (CHURCH & GILBERT, 1984)

A hibridização foi feita de acordo com método descrito por CHURCH & GILBERT (1984). As membranas contendo os mRNA foram colocadas em tubo de hibridização e pré-hibridizadas por 15 minutos a 65°C em solução contendo 50% (v/v) de 0,5M Na_2HPO_4 ,

7% (p/v) de SDS, 1% (p/v) de BSA e 1mM EDTA. Em seguida, as sondas marcadas radioativamente foram desnaturadas por 5 minutos a 96°C, resfriadas em banho de gelo por 5 minutos, sendo então adicionadas à solução contida no tubo (solução de pré-hibridização). As membranas foram incubadas 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 estes revelados posteriormente, utilizando-se revelador e fixador indicados pelo fabricante.

4.9- ANÁLISE DOS INTERFERONS POR “WESTERN BLOT”

4.9.1- FRACIONAMENTO ELETROFORÉTICO E TRANSFERÊNCIA DAS PROTEÍNAS

Os interferons obtidos foram fracionados em SDS/PAGE 12%, a 100V, por aproximadamente 1,5 horas e transferidos para membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech), conforme protocolo do "Kit Bio-Rad Transferency" (Bio-Rad Laboratories, USA). Após transferência, as membranas foram coradas com "ponceau 1%" para visualização da eficiência da mesma. As membranas foram bloqueadas por 18 a 20 horas a 4°C, utilizando-se PBS 1X/Tween 0,1% contendo 5% de leite em pó desnatado.

4.9.2- REAÇÃO COM ANTICORPOS E REVELAÇÃO

Para a reação com os anticorpos primários, as membranas bloqueadas foram primeiramente lavadas por 3 vezes em PBS/Tween 0,1%. Em seguida, estas foram incubadas com os anticorpos primários a 4°C, por 18-24 horas, em solução de PBS/Tween contendo 5% de BSA (albumina bovina sérica). Após o período de incubação, as membranas foram lavadas novamente em PBS/Tween 0,1% por 3 vezes, incubadas durante 1 hora, a temperatura ambiente, com o anticorpo secundário respectivo ligado a peroxidase, em solução PBS/Tween 0,1% contendo 5% de leite em pó desnatado. Após

nova sessão de lavagens por 3 vezes em PBS/Tween, as membranas foram incubadas em solução reveladora "ECL-Plus" (Amersham Bioscience, UK) por 5min, expostas contra filme de raio X, em intervalos de 30 segundos a 10 minutos (Hyperfilm ECL, Amersham Bioscience, UK) e reveladas utilizando-se revelador e fixador (Kodak), de acordo com recomendações do fabricante.

5 - RESULTADOS

5.1- CONSTRUÇÃO DOS IFN RECOMBINANTES E HÍBRIDOS

5.1.1 - AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DOS GENES QUE CODIFICAM PARA OS INTERFERONS

A construção dos interferons híbridos foi possível através da técnica do PCR pela inserção de enzimas de restrição, tendo sido obtida a inserção do sítio para a enzima Mlu I. A seqüência de nucleotídeos que codifica para os interferons humanos HuIFN- α_{2b} e HuIFN- β foram clonados em plasmídeo de expressão (pDS₅₆ ou pQE9) e as proteínas recombinantes produzidas em *E. coli* e purificadas em cromatografia de afinidade de quelato de Ni²⁺.

A inserção do sítio foi obtida pela amplificação de dois fragmentos de cada um desses genes dos IFN, sendo esses fragmentos relacionados à região 5' e 3' respectivamente. Para tanto, a amplificação dos fragmentos do gene do HuIFN- α_{2b} , foi obtida, utilizando-se iniciadores que flanqueiam as regiões 5' e 3' desse gene, combinados com iniciadores que se ligam à regiões internas nesse gene. Os iniciadores utilizados para a obtenção do fragmento da região 5' do gene do HuIFN- α_{2b} foram IFN α P5' e IFN α Mlu3', cuja amplificação foi um fragmento de 282 pb (FIG. 7, canaleta 3). Já os iniciadores utilizados para a amplificação do fragmento da região 3' deste mesmo IFN, foram os iniciadores IFN α P3' e IFN α Mlu5', sendo amplificado um fragmento de 213pb (FIG. 7, canaleta 2).

As amplificações dos fragmentos dos genes que codificam para o HuIFN- β foram obtidos da mesma maneira que as do HuIFN- α_{2b} . Contudo, os iniciadores utilizados para amplificar o fragmento da região 5' deste gene, foram os IFN β P5' e IFN β Mlu3', cuja amplificação resultou num fragmento de 291 pb (FIG. 7, canaleta 4). A região 3' deste gene foi amplificada utilizando-se os iniciadores IFN β P3' e IFN β Mlu5', cuja amplificação obtida foi um fragmento de 207 pb (FIG. 7, canaleta 1). Como controle positivo das reações da PCR, foi feita uma reação utilizando os iniciadores IFN α P5'/IFN α P3' e o fragmento de nucleotídeos que codifica para do rHuIFN- α_{2b} , sendo obtido um produto de PCR que mostrou uma mobilidade relativa correspondente a um fragmento de aproximadamente 500 pb (FIG.7, canaleta 5).

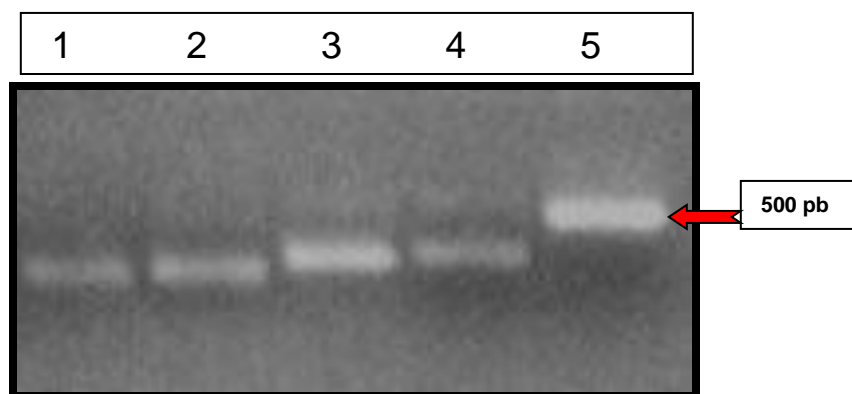


FIGURA 7: Amplificação por PCR dos fragmentos clonados dos nucleotídeos que codificam para os HulFN- α_{2b} e HulFN- β , para inserção do sítio da enzima Mlu I. Os produtos de PCR foram fracionados em gel 1% agarose, corado com EtBr e fotografado sob luz UV. Canaleta 1, amplificado pelos iniciadores IFN β P3' e IFN β Mlu5' (207 pb); Canaleta 2, amplificado pelos iniciadores IFN α P3' e IFN α Mlu5' (213 pb); Canaleta 3, amplificado pelos iniciadores IFN α P5' e IFN α Mlu3' (282 pb); Canaleta 4, amplificado pelos iniciadores IFN β P5' e IFN β Mlu3' (292 pb); Canaleta 5, amplificado pelos iniciadores IFN α P5' e IFN α P3' (500 pb).

5.1.2 – CADEIA DE AMINOÁCIDOS DOS HÍBRIDOS CONSTRUÍDOS

Em todos os híbridos construídos em nosso trabalho, assim como os híbridos construídos por CARVALHO (1998), as regiões de mutações foram planejadas de maneira a conservar alguns aminoácidos importantes, tais com a tirosina (Y), que é importante na mudança de direção de α -hélices, a cisteína (C), responsável pela formação de pontes dissulfeto e outros como triptofano (W) e fenilalanina (F), os quais são altamente hidrofóbicos. Da mesma forma, as mutações foram planejadas de maneira a manter o tamanho das alças e α -hélices, tentando não interferir muito na estrutura conformacional da molécula. Entretanto, a previsão destas alterações objetivando manter a estrutura da molécula é apenas teórica, sendo que a análise do efeito destas construções deve ser feita minuciosamente, através de testes biológicos, os quais fornecem informação da integridade estrutural dos híbridos construídos. As alterações feitas podem ser visualizadas na estrutura primária da proteína, na cadeia de aminoácidos. Na FIGURA 8, visualizamos a representação das seqüências de aminoácidos na formação das quimeras propostas, assim como as regiões de α -hélices (sublinhadas) e alças (não sublinhadas) e os aminoácidos substituídos na troca das regiões propostas, assim como os aminoácidos que foram conservados (grifados em amarelo).

Híbrido rHuIFN- α 94 β

01 10 20 30 40 50
MSHHHHH CDLPQTHSLG SRRTLMLLAQ QLKISLFSCL KDRHDFGFPQ EEFGLQQFQK
51 - AETIPVLHEM IQQIFNLFST KDSSAAWDET LLDKFYTELY QQLNHLKTVL
101 - EKLEKEDFT RGKLMSSLHL KRYYGRILRY LKAKEYSHCA WTIVRVEILR
151 - NFYFINRLTG YLRN

Híbrido rHuIFN- β 97 α 1

01 10 20 30 40 50
MSHHHHH SYNLLGFLQ RSSNFQCQKL LWQLNGRLEY CLKDRMNFDI PEEIKQLQQF
51 - QKEDAALTIY EMLQNIFAIF QDSSSTGWN ETIVENLLAN VYHQINHLEA
101 - CVIQGVGVTE TPLEKEDSIL AVRKYFQRIT RYRKEKKYSP CAWEVVRAEI
151 - MRSFSLSTNL QESLRSKE

Híbrido rHuIFN- α 44 β 106 α

01 10 20 30 40 50
MSHHHHH CDLPQTHSLG SRRTLMLLAQ QLKISLFSCL KDRHDFGFPQ EEFLLQ FOKE
51- DAALTIYEML QNIFAIFRQD SSSTGWN ETI VENLLANVYH QINH LKTVLE
101- EKLEKEDSIL AVRKYFQRIT RYRKEKKYSP CAWEVVRAEI MRSFSLSTNL
151- QESLRSKE

FIGURA 8: Representação da sequência de aminoácidos dos IFN híbridos. A sequência dos aminoácidos dos rHuIFN- α (preto) e rHuIFN- β (vermelho) foram utilizadas na montagem da sequência dos híbridos propostos. As α -hélices estão sublinhadas e os aminoácidos conservados, mesmo com a troca das regiões de interesse, estão grifados em amarelo.

5.2- CLONAGEM DOS INTERFERONS RECOMBINANTES HÍBRIDOS EM VETOR PGEM-T

A construção dos interferons recombinantes híbridos, através da introdução do sítio para a enzima de restrição Mlu I, permitiu a troca das α -hélices **D** e **E** e alças **cd** e **de** entre os rHuIFN- α_{2b} e rHuIFN- β . Para isto, os códonos AAT (N93), GAC (D94) e CTG (L95) foram trocados por AAC (N93), GCG (A94) e TTG (L95), no HuIFN- α_{2b} . Neste IFN as substituições para a inserção do sítio de restrição Mlu I alterou apenas o aminoácido D94 por uma A94, o que modifica a carga de negativa para neutra. No rHuIFN- β , os códonos CAT (H97) e CTG (L98) foram substituídos por GCG (A97) e TTG (L98), alterando apenas o H97 que passou a ser uma A97. A modificação do aminoácido no rHuIFN- β modifica a carga positiva da H para uma neutra da A.

Uma vez obtido os fragmentos amplificados e clonados em vetor, as bactérias contendo o inserto foram selecionadas pela migração relativa do produto de PCR, o qual foi amplificado com iniciadores específicos para os IFN (FIG. 9). Em todas as reações, foram amplificados fragmentos de igual tamanho molecular, aos controles positivos, utilizando-se fragmentos que codificavam para as proteínas maduras, sem as modificações introduzidas. A confirmação da presença do sítio da enzima de restrição Mlu I no DNA dos clones, foi feita através da digestão dos produtos de PCR, como também, após a obtenção da seqüência de seus nucleotídeos.

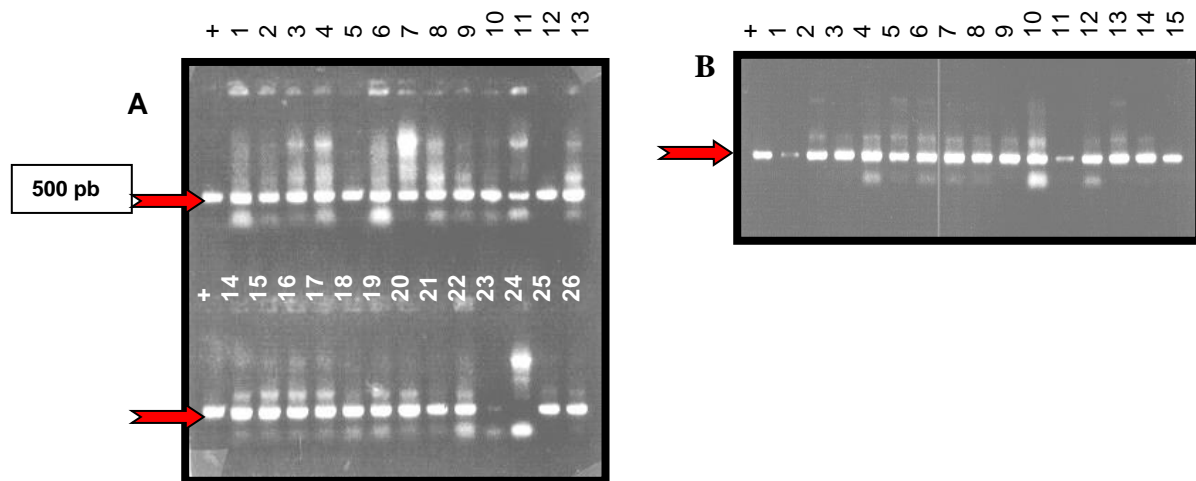


FIGURA 9: Seleção dos interferons recombinantes híbridos inseridos em pGEM-T. As colônias selecionadas foram crescidas em meio com antibióticos e empregadas para amplificação por PCR utilizando-se iniciadores específicos para rHuIFN- β e rHuIFN- α . Os produtos foram fracionados em gel de agarose, corado com EtBr e fotografado sob luz UV. Vários insertos foram amplificados. Gel A: canaletas 1-10, rHuIFN- β 97; canaletas 11-20, rHuIFN- α 94; canaletas 21-26, rHuIFN- β 97 α . Gel B: canaletas 1-4, rHuIFN- β 97 α ; canaletas 5-15, rHuIFN- α 94 β . A amplificação dos controles positivos é mostrada (+).

5.3 - TRANSFERÊNCIA DOS INTERFERONS RECOMBINANTES E HÍBRIDOS PARA VETOR DE EXPRESSÃO

Após a clonagem dos insertos em vetor pGEM-T, estes plasmídeos foram digeridos com as enzimas Bam HI e Hind III, para se obter os insertos de interesse. Uma vez obtidos os insertos, estes foram transferidos para vetor de expressão (pDS₅₆ ou pQE9), os quais também foram digeridos com as mesmas enzimas. Após a ligação aos plasmídeos, *E.coli* M15/pDM1 foi transformada com estes e os clones foram obtidos, conforme já descrito. Os fragmentos amplificados foram fracionados eletroforéticamente em gel de agarose. Vários clones testados foram amplificados e foi obtido DNA de igual tamanho molecular aos controles positivos, sendo então selecionados 5 clones de cada interferon e escolhido a partir destes, o melhor produtor da proteína. A FIGURA 10 mostra os resultados da amplificação dos híbridos que apresentam a mesma mobilidade relativa dos controles positivos.

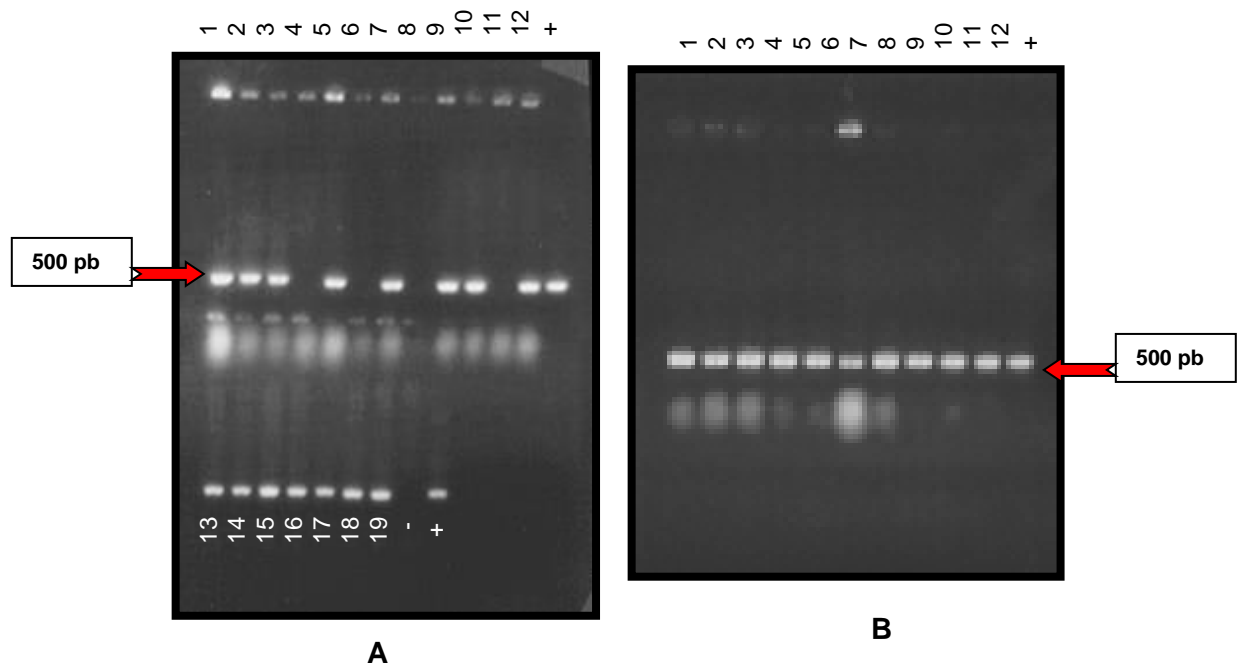


FIGURA 10: Transferência dos interferons recombinantes e híbridos para vetor de expressão. As colônias selecionadas foram crescidas em meio com antibióticos e empregadas para amplificação por PCR utilizando-se iniciadores específicos para rHuIFN- β e rHuIFN- α . Os produtos foram fracionados em gel de agarose, corado com EtBr e fotografado sob luz UV. Vários insertos foram amplificados. Gel A: canaletas 1-10, rHuIFN- α 94; canaletas 11-19, rHuIFN- α 94 β . Gel B: canaletas 1-6, rHuIFN- β 97; canaletas 7-12, rHuIFN- β 97 α . A amplificação do controle positivo foi mostrada (+) e controle negativo da reação (-).

5.4- PRODUÇÃO DOS INTERFERONS.

A produção dos IFN recombinantes e híbridos construídos, mostraram bandas com a mobilidade relativa a massa molecular estimada em torno de 21 a 26 kDa (FIG. 11 e 12). Todos os interferons recombinantes híbridos obtidos foram selecionados entre 5 clones que melhor produziram as proteínas, após indução com IPTG.

Na FIGURA 11 são mostradas as diferenças na produção de proteínas pelos diferentes clones testados, referentes ao híbrido rHuIFN- α 44 β 106 α , construído por CARVALHO, (1998). Nas canaletas onde foram aplicadas as amostras dos clones induzidos com IPTG, foram observadas uma banda diferencial em relação aos clones correspondentes não induzidos, com uma mobilidade relativa em torno de 26 kDa.

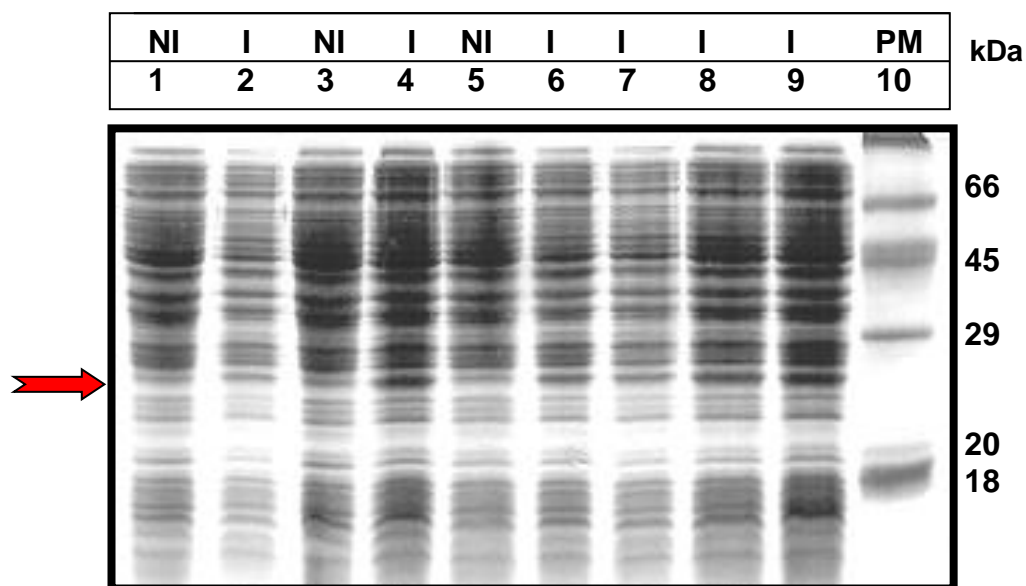


FIGURA 11: Produção do híbrido rHuIFN- α 44 β 106 α , em *E.coli* M15. As proteínas dos IFN híbridos, obtidas dos clones do rHuIFN- α 44 β 106 α induzidos por IPTG por 5 horas, foram fracionadas eletroforéticamente em SDS-PAGE e coradas pelo comassie blue. As letras **I** indicam as culturas induzidas com IPTG e as letras **NI**, indicam as culturas não induzidas. A seta indica a banda diferencial correspondente aos IFN, obtidas das culturas induzidas. Canaletas 1 e 2, clone 1; Canaletas 3 e 4, clone 5; Canaletas 5 e 6, clone 6; Canaletas 7 a 10, clones 9, 13 e 17, respectivamente; Canaleta 10, padrão de peso molecular (PM) indicando a mobilidade relativa das proteínas (padrão) em kDa.

Na FIGURA 12 são mostrados somente as proteínas referentes aos clones dos rHuIFN- β , rHuIFN- α 94, rHuIFN- β 97, rHuIFN- β 97 α , os quais foram previamente selecionados quanto à produção das proteínas. Nesta figura, também foi observada uma banda diferencial nas canaletas onde foram aplicadas as amostras dos clones induzidos com IPTG, em relação aos clones não induzidos. Entretanto, nestes híbridos foram observadas diferenças na mobilidade relativa das proteínas, em gel de poliacrilamida. Os híbridos rHuIFN- β , rHuIFN- β 97 e rHuIFN- β 97 α , apresentaram uma mobilidade relativa correspondente a proteínas com 22 kDa, enquanto o híbrido rHuIFN- α 94 apresentou uma mobilidade relativa próxima das proteínas com 24 kDa.

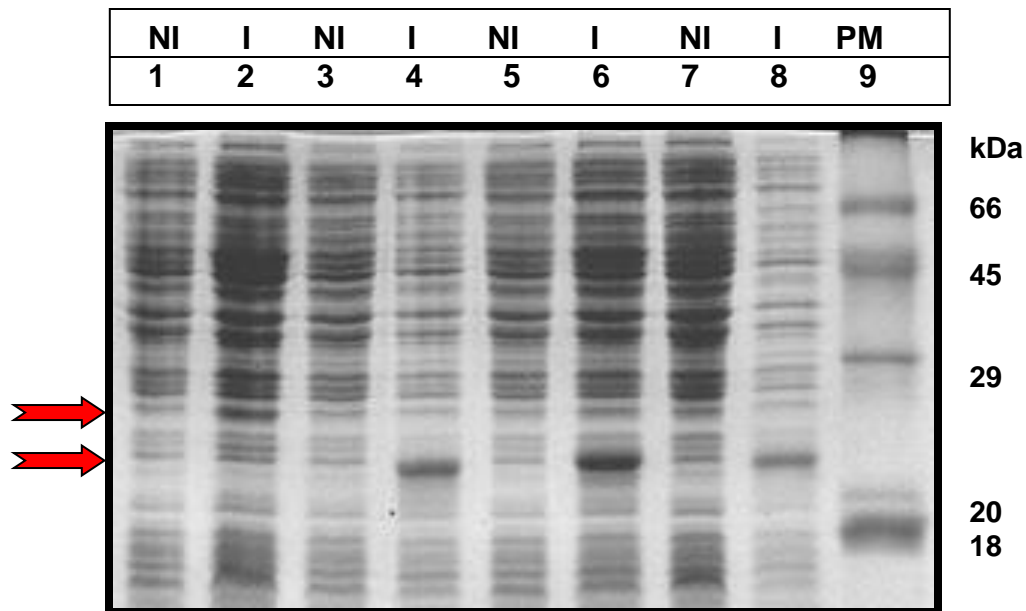


FIGURA 12: Produção dos IFN recombinantes híbridos, em *E.coli* M15. As proteínas dos IFN híbridos foram obtidas pela indução com IPTG por 5 horas, fracionadas eletroforéticamente em SDS-PAGE e coradas pelo comassie blue. As letras **I** indicam as culturas induzidas e as letras **NI**, indicam as culturas não induzidas. A seta indica a banda diferencial correspondente aos IFN, obtidas das culturas induzidas. Canaletas 1 e 2, clones rHuIFN- α 94; Canaletas 3 e 4, clones rHuIFN- β 97; Canaletas 5 e 6, clones rHuIFN- β 97 α ; Canaletas 7 e 8, clones rHuIFN- β . Canaleta 9, padrão de peso molecular (PM) mostrando a mobilidade relativa das proteínas (padrão) em kDa.

Na FIGURA 13 observamos o fracionamento das proteínas obtidas de cinco clones diferentes testados, referentes ao híbrido rHuIFN- α 94 β . A produção do IFN híbrido não foi visualizada em SDS-PAGE, como podemos observar nesta figura. Nas canaletas onde foram aplicadas as amostras dos clones induzidos com IPTG, nenhuma banda diferencial em relação aos clones correspondentes não induzidos, foi observada, com mobilidade relativa em torno de 21 a 26 kDa, como esperado.

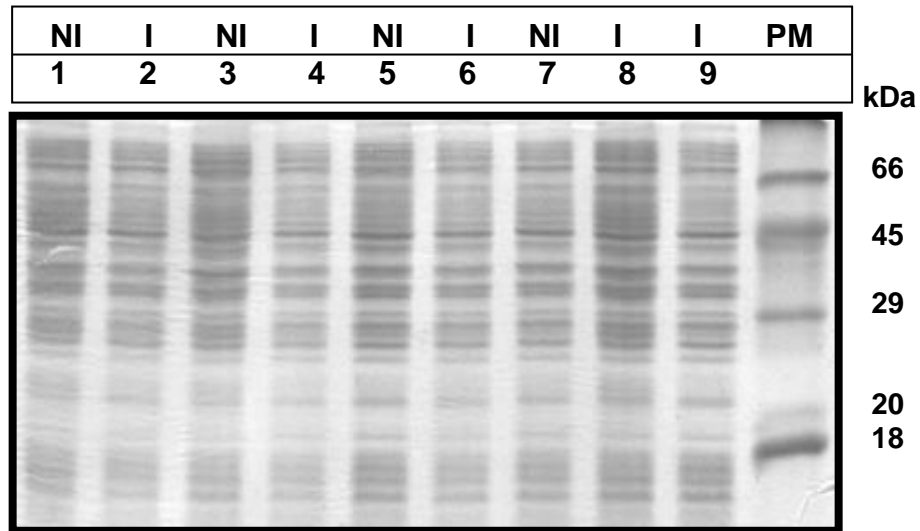


FIGURA 13: Produção do IFN híbrido rHuIFN- α 94 β , em *E.coli* M15. Após 5 horas de indução com IPTG, as proteínas das bactérias (clones 1 a 5) induzidas ou não, foram fracionadas eletroforéticamente em SDS-PAGE e coradas pelo comassie blue. As letras **I** indicam as culturas induzidas e as letras **NI**, indicam as culturas não induzidas. Canaletas 1 e 2, clone 1; Canaletas 3 e 4, clone 2; Canaletas 5 e 6, clone 3; Canaletas 7 e 8, clone 4; Canaleta 9, clone 5; PM - padrão de peso molecular (PM) mostrando a mobilidade relativa das proteínas (padrão) em kDa.

5.5- ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DOS INTERFERONS RECOMBINANTES HÍBRIDOS EM BACTÉRIAS *E. coli* M15

Após a análise da produção dos interferons recombinantes e híbridos em *E. coli* M15, foi observado que o rHuIFN- α 94 β não foi produzido, ou pelo menos a sua detecção não foi observada nem na medida da atividade antiviral nem no SDS-PAGE (FIG. 13). Para resolver o problema, duas abordagens foram feitas. O material foi enviado para seqüenciamento dos nucleotídeos e para confirmar se o problema foi na transcrição do gene ou na tradução do mRNA transcrito, os clones selecionados foram induzidos com IPTG por 5 h, sendo em seguida feita a extração do mRNA total (FIG. 14). Após a transferência para a membrana, o acúmulo do mRNA dos interferons foi observado, utilizando-se o fragmento de DNA correspondente ao HuIFN- α _{2b}, marcado com radioisótopo [α ³²P] dCTP (Amersham Bioscience, UK). Como observado na FIGURA 14, o híbrido rHuIFN- α 94 β , após a indução com IPTG, apresentou grande acúmulo de mRNA, assim como pode ser observado o acúmulo dos mRNA dos outros híbridos rHuIFN- α 94 e rHuIFN- β 97 α . Estes dados sugeriram que o problema estava na tradução da proteína e após análise da seqüência de pares de bases obtida no seqüenciamento automático, foram comprovados deleções na seqüência do DNA desse IFN híbrido, o que gerou códons de terminação, impedindo a produção da proteína.

A partir destes resultados, foram feitas várias tentativas de clonagem do híbrido rHuIFN- α 94 β , em outros vetores de expressão pQE 10 e pQE11, os quais possuem inserções de bases, que permitem a correção na tradução total da proteína. Além disso, foram feitas também várias tentativas de obtenção dos fragmentos dos HuIFN- α e HuIFN- β , através do PCR, na intenção da construção do híbrido com a seqüência de nucleotídeos correta. No entanto, todas as tentativas foram fracassadas e portanto, como o prazo permitido para a defesa de tese estava terminando, as tentativas de construção deste híbrido foram encerradas. Sendo assim, a partir deste resultado, não serão observados dados de testes de atividade biológica, referentes ao híbrido rHuIFN α 94 β .

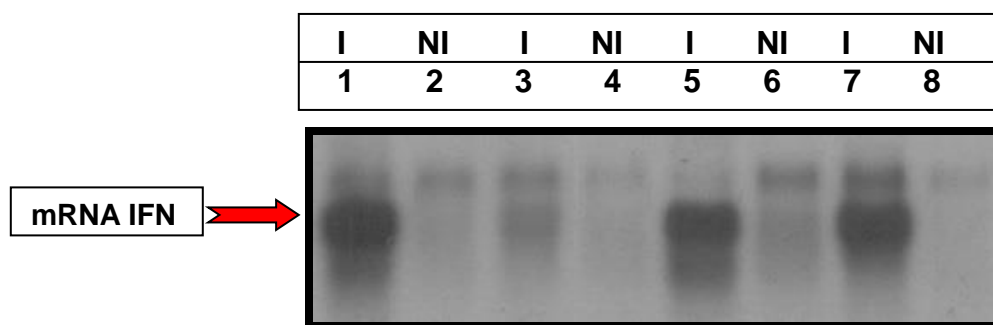


FIGURA 14: Análise do mRNA dos interferons recombinantes híbridos após 5 horas de indução das bactérias M15. O RNA total das bactérias foi induzido com IPTG por 5 h e após extração, fracionado em gel de agarose desnaturante e transferido para membrana de nylon. O acúmulo do mRNA correspondentes aos IFN recombinantes foi visualizado após hibridização com sonda específica. Canaletas 1 e 2, rHuIFN- α 94; Canaletas 3 e 4, rHuIFN- β 97; Canaletas 5 e 6, rHuIFN- α 94 β ; Canaletas 7 e 8, rHuIFN- β 97 α . **I** = induzido, **NI** = não induzido.

5.6 - ANÁLISE DA PRODUÇÃO DO INTERFERON HÍBRIDO rHuIFN- α 44 β 106 α , POR ENSAIO DE WESTERN BLOT

O híbrido rHuIFN- α 44 β 106 α produzido apresentou um padrão semelhante ao rHuIFN- α 94 em sua mobilidade relativa em SDS-PAGE (FIGURAS 11 e 12), sendo esta mobilidade relativa correspondente à migração do padrão com 26 kDa. A produção do híbrido rHuIFN- α 44 β 106 α foi confirmada por ensaio de “Western Blot”.

Como observado na FIGURA 15, os seis clones selecionados (clones 1, 5, 6, 9, 13 e 17) produziram a proteína quando induzidos com IPTG. A visualização das bandas referentes às proteínas foi possível pela adição do anticorpo secundário ligado a peroxidase. O controle positivo da reação foi o HuIFN α_{2b} , utilizado como IFN padrão em todos os experimentos. Nas canaletas onde foram aplicadas as amostras dos clones não induzidos (clones 1, 5 e 6), não foi possível observar bandas referentes aos híbridos. Após a confirmação por imunoreação (“immunoblot”), o clone 17 foi selecionado para uso em todos os testes biológicos.

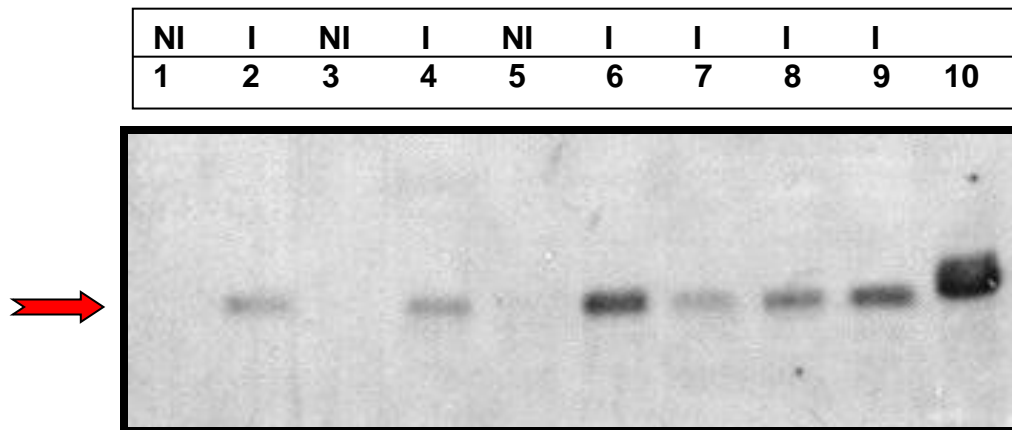


FIGURA 15: Análise da produção do interferon híbrido rHuIFN α 44 β 106 α , por ensaio de Western Blot. As proteínas de vários clones do rHuIFN α 44 β 106 α foram obtidas pela indução com IPTG por 5 horas, fracionadas eletroforéticamente em SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. Após a transferência, o IFN foi identificado por anticopo anti-IFN α , revelado por conjugado/Peroxidase e exposto em filme de raio X. As letras I indicam bactérias induzidas e as letras NI, não induzidas. Canaletas 1 e 2, clone 1; Canaletas 3 e 4, clone 5; Canaletas 5 e 6, clone 6; Canaletas 7, 8 e 9, clones 9, 13 e 17, respectivamente; Canaleta 10, controle positivo HuIFN- α_2 .

5.7- PURIFICAÇÃO DOS INTERFERONS.

A purificação de proteínas recombinantes foi feita conforme STÜBER *et al.*, (1990), com algumas modificações, como a utilização de um gradiente de pH durante a eluição das frações, a fim de se melhorar o grau de pureza e conseqüentemente, aumentar a atividade específica das proteínas produzidas.

Na FIGURA 16, é mostrado o fracionamento em SDS-PAGE de diferentes frações obtidas na purificação do rHuIFN- α 94, relativas aos pH 5, 4,5 e 4. Nesta figura pode ser observado que a proteína foi eluída em pH 4,5 (frações 1 e 2) e no pH 4,0 (fração 1). No pH 5,0 não foi detectada a presença da proteína. Neste sistema de purificação desse IFN, só foi observada uma banda referente proteína contaminante, na canaleta 5, pH 4,0.

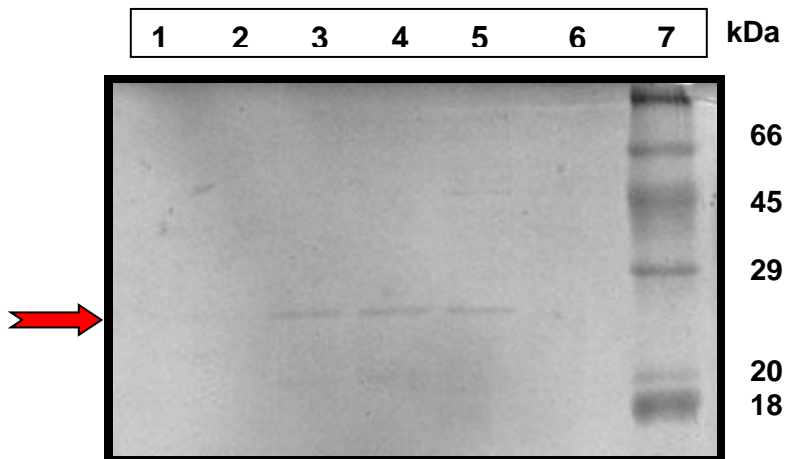


FIGURA 16: Purificação do interferon recombinante rHuIFN- α 94. O IFN produzido em *E. coli* M15 foi purificado em coluna de quelato de níquel. A eluição das proteínas foi obtida em tampão uréia 8M, pH 4,5 e 4,0 e as duas primeiras frações obtidas, foram fracionadas em gel de poliacrilamida. A seta indica a banda do rHuIFN- α 94, de aproximadamente 25 kDa. Canaletas 1 e 2, fração eluída em pH 5; Canaletas 3 e 4, fração eluída em pH 4,5; Canaletas 5 e 6, fração eluída em pH 4; Canaleta 7, padrão de peso molecular mostrando a mobilidade relativa das proteínas (padrão) em kDa.

Na FIGURA 17, é mostrado SDS-PAGE com fracionamentos de diferentes frações obtidas na purificação do rHuIFN- β 97 α , relativas aos pH 5, 4,5 e 4, assim como frações relativas aos pH 8 e 6, para a confirmar se a proteína não foi eluída nestes pH. Em todas as frações analisadas nos pH 5, 4,5 e 4, foram observadas bandas referentes a este híbrido. Entretanto, nas frações obtidas no pH 4, foram observadas também, bandas referentes a proteínas contaminantes. Sendo assim, somente proteínas obtidas nas frações dos pH 5 e 4,5 foram agrupadas e dialisadas.

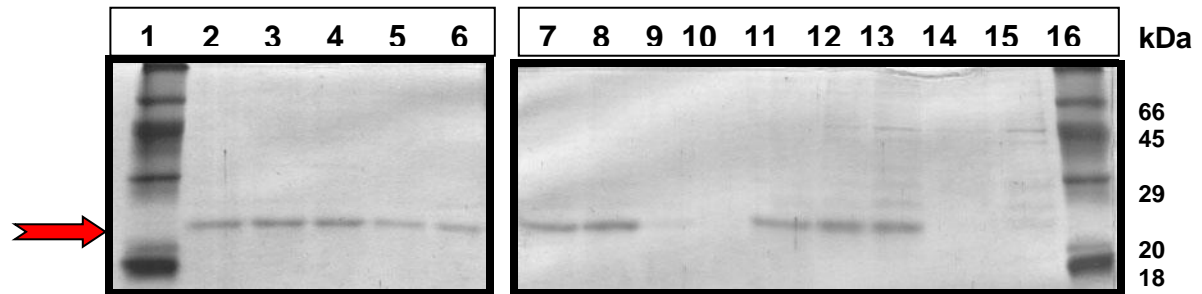


FIGURA 17: Purificação do interferon rHuIFN- β 97 α . O IFN híbrido produzido em *E. coli* M15 foi purificado em coluna de quelato de níquel, as proteínas foram eluídas em tampão uréia 8M, nos pH 8, 6, 5, 4,5 e 4,0 e fracionadas SDS-PAGE. A seta indica a banda do rHuIFN- β 97 α , de aproximadamente 22 kDa. Canaletas 2 a 6, frações eluídas em pH 5; Canaletas 7 a 10, frações eluídas em pH 4,5; Canaletas 11 a 13, frações eluídas em pH 4; Canaleta 14, fração eluída em pH 8; Canaleta 15, fração eluída em pH 6; Canaleta 1 e 16, padrão de peso molecular mostrando a mobilidade relativa das proteínas (padrão) em kDa.

Na FIGURA 18, é mostrado SDS-PAGE com fracionamentos de diferentes frações obtidas na purificação do rHuIFN- β 97, relativas aos pH 4,5 e 4. Pode ser observado nesta figura que as proteínas foram purificadas no pH 4,5, onde foram visualizadas bandas referentes à estas. Nas frações do pH 4 foram observadas ainda, pequenas quantidades da proteína, as quais não são visíveis na figura, mas foram observadas no gel. Bandas referentes a proteínas contaminantes não foram observadas.

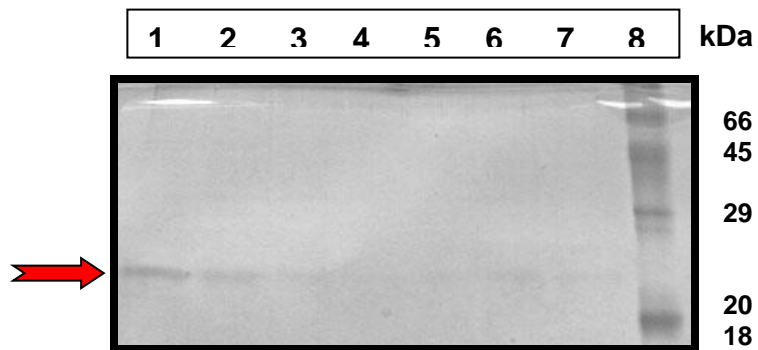


FIGURA 18: Purificação do interferon recombinante rHuIFN- β 97. O IFN híbrido produzido em *E. coli* M15 foi purificado em coluna de quelato de níquel, as proteínas foram eluídas em tampão uréia 8M, nos pH 4,5 e 4,0 e fracionadas SDS-PAGE. A seta indica a banda do rHuIFN- β 97, de aproximadamente 22 kDa. Canaletas 1 a 4, frações eluídas em pH 4,5; Canaletas 5 a 7, frações eluídas em pH 4; Canaleta 8, padrão de peso molecular mostrando a mobilidade relativa das proteínas (padrão) em kDa.

Na FIGURA 19 é mostrado SDS-PAGE com fracionamentos de diferentes frações obtidas na purificação do rHuIFN- β , relativas aos pH 5, 4,5 e 4. Nesta figura, pode ser observado bandas relativas às proteínas nas frações 2 e 3 do pH 5 e nas frações 1 e 2 do pH 4,5. Não foram observadas bandas nas frações do pH 4. Bandas referentes a proteínas contaminantes não foram observadas.

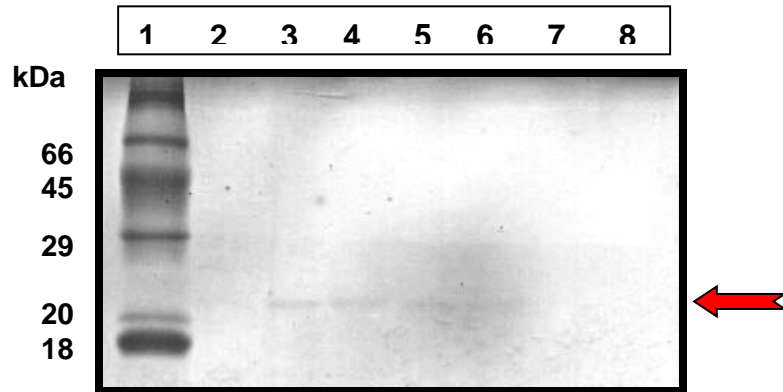


FIGURA 19: Purificação do interferon recombinante rHuIFN- β . O IFN híbrido produzido em *E. coli* M15 foi purificado em coluna de quelato de níquel, as proteínas foram eluídas em tampão uréia 8M, nos pH 5 e 4,5 e fracionadas SDS-PAGE. A seta indica a banda do rHuIFN- β , de aproximadamente 22 kDa. Canaleta 1, padrão de peso molecular mostrando a mobilidade relativa das proteínas (padrão) em kDa; Canaletas 2 e 4, frações eluídas em pH 5; Canaletas 5 e 6, frações eluídas em pH 4,5; Canaletas 7 e 8, frações eluídas em pH 4.

Na FIGURA 20, é mostrado SDS-PAGE com fracionamentos de diferentes frações obtidas na purificação do rHuIFN- α 44 β 106 α , relativas aos pH 5,0, 4,5 e 4,0. Nesta figura, pode ser observado bandas relativas às proteínas, somente nas frações do pH 5,0. Entretanto, nessas frações foram eluídas proteínas de massa molecular diferentes, sendo observado duas bandas mais fortes, situadas entre 20 e 29 kDa.

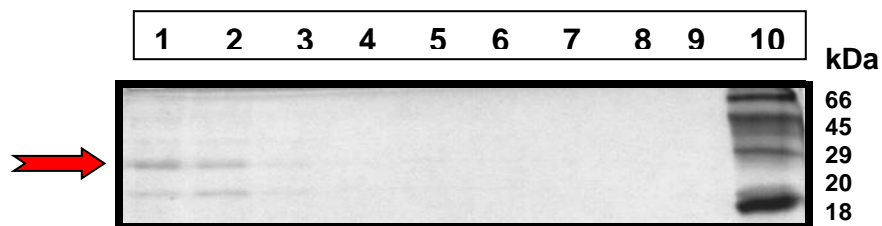


FIGURA 20: Purificação do interferon híbrido rHuIFN- α 44 β 106 α . O IFN híbrido produzido em *E. coli* M15 foi purificado em coluna de quelato de níquel, as proteínas foram eluídas em tampão uréia 8M, nos pH 5, 4,5 e 4 e fracionadas SDS-PAGE. A seta indica a banda do rHuIFN- β , de aproximadamente 22 kDa. Canaletas 1 e 4, frações eluídas em pH 5; Canaletas 5 a 8, frações eluídas em pH 4,5; Canaletas 9, frações eluídas em pH 4; Canaleta 10, padrão de peso molecular mostrando a mobilidade relativa das proteínas (padrão) em kDa.

5.8 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Dentre as várias propriedades apresentadas pelos interferons, uma delas é a espécie-especificidade, isto é, o IFN produzido em células de uma dada espécie tem uma maior atividade antiviral em células da mesma espécie que o produziu. Contudo, alguns FN humanos, como o HuIFN α_1 e HuIFN α_2 apresentam atividade cruzada em células bovinas e murinas, em diferentes níveis, enquanto que o HuIFN- β mostra atividade antiviral muito baixa nestas células. Os estudo empregando-se moléculas híbridas destes IFN, permite avaliar os domínios das proteínas, envolvidos na interação com os receptores e as diferentes respostas celulares. Os híbridos construídos foram analisados em diferentes células (Vero, L-929, MDBK e WISH), através da sua atividade antiviral.

Após a produção e purificação dos IFN, estes foram dialisados em PBS e o primeiro teste de atividade biológica foi de medida de atividade antiviral em células Vero. Na titulação das amostras dialisadas, nenhum dos IFN apresentou título em relação à atividade antiviral (FIGURA 21 A). Nas canaletas onde foram aplicadas diluições seriadas das proteínas híbridas, nenhum efeito de inibição da multiplicação do vírus foi observado. Nas canaletas do controle de vírus, observamos o efeito citopático (ECP) e nas canaletas do controle de células, a viabilidade das mesmas, no experimento de titulação.

Entretanto, quando analisamos a titulação dos extratos bacterianos induzidos com IPTG, das culturas referentes às proteínas híbridas, observamos que nas canaletas onde foram aplicadas diluições seriadas das amostras dos clones induzidos (I), houve uma proteção das células, assim como esta proteção não foi observada nas canaletas onde foram aplicadas as amostras das bactérias não induzidas (NI) (FIGURA 21 B).

Com este resultado, resolvemos então adicionar o mesmo tampão de amostra de proteína, o qual foi adicionado aos extratos bacterianos, às amostras dos IFN dialisados e aquecer estas amostras 60°C, por 5 minutos. Os resultados são mostrados na FIGURA 22.

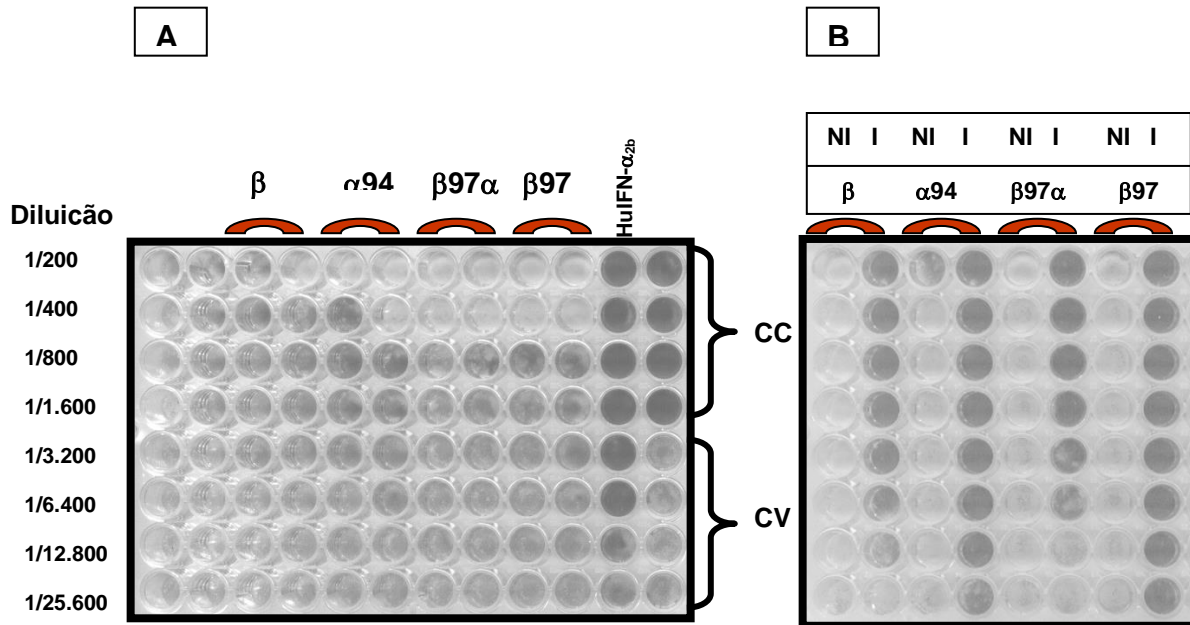


FIGURA 21: Título dos interferons recombinantes e híbridos, em células Vero. As diluições seriadas na razão de 2 das diferentes preparações dos IFN recombinantes purificados e dialisados (A) e dos extratos bacterianos induzidos (I) ou não (NI) (B), foram incubadas com células Vero e após 24h tratadas com vírus EMC (100 TCID₅₀). As células foram observadas diariamente até quando foi observado um ECP de 100% no controle de vírus. O título foi expresso como o inverso da diluição onde ocorreu uma redução em 50% do ECP, quando comparado às células tratadas com IFN e o controle de vírus.

Para todas as amostras dos IFN purificados e dialisados testadas, foram feitas preparações em paralelo destas, com tampão de amostra de proteínas 2x, o qual contém 0,75M de β -mercaptoetanol e 2% de SDS. Isto porque foi observado que os interferons purificados e dialisados não apresentavam atividade antiviral em células Vero, como mostrado anteriormente (FIGURA 21 A). Sendo assim, uma vez que moléculas contendo elevado teor de aminoácidos hidrofóbicos tendem a formar complexos quando em solução, resolvemos então testar a atividade destas proteínas acrescidas de tampão de amostra.

As células tratadas com os IFN preparados com o tampão de amostra e aquecidos a 60°C, por 5 minutos, mostraram atividade antiviral em células Vero (FIG. 22). Além disso, observa-se que o recombinante rHuIFN- α 94, apresentou uma atividade antiviral, sem o tampão de amostra, entretanto esta atividade foi muito menor, comparada com a atividade deste quando acrescentado de tampão de amostra e aquecido. Em outras células, como em MDBK e Wish, também foi observada atividade antiviral dos IFN recombinantes e híbridos, somente quando acrescentado o tampão de amostra (dado não mostrado).

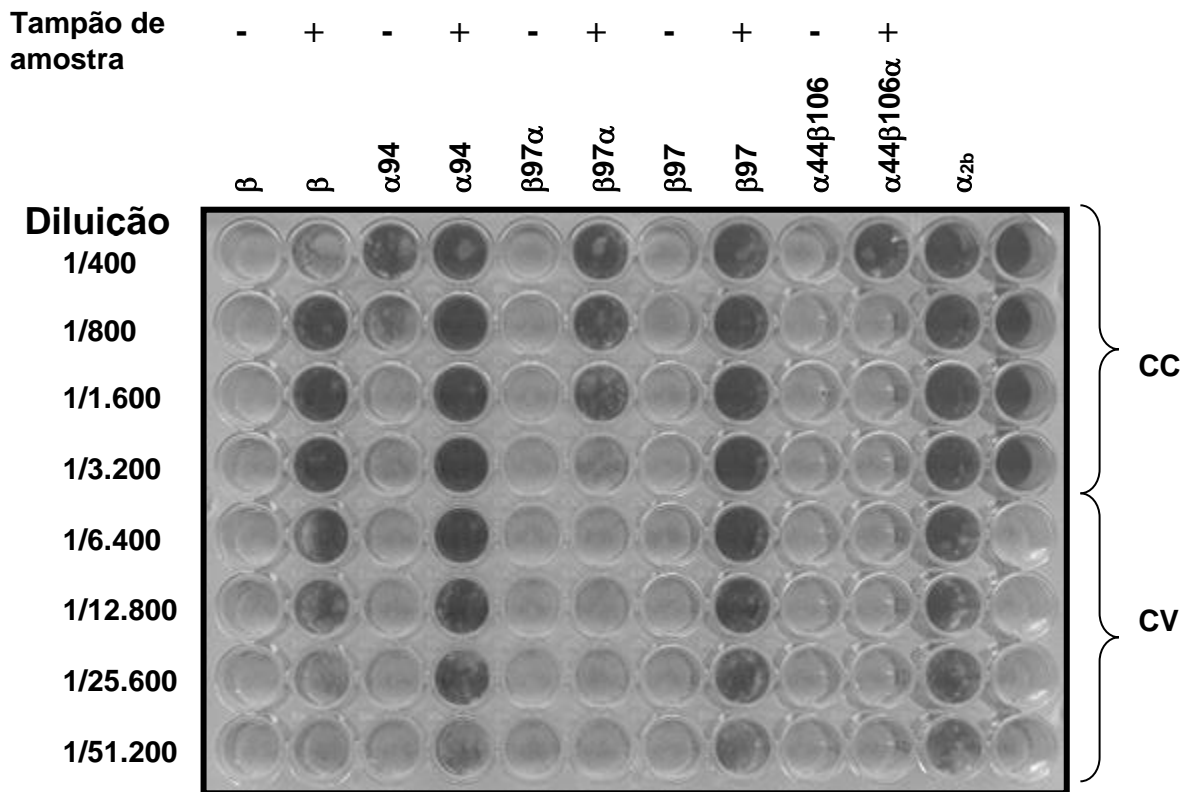


FIGURA 22: Título dos interferons recombinantes híbridos purificados, em células Vero. As diluições seriadas na razão de 2 das diferentes preparações dos IFN recombinantes purificados foram incubadas com células Vero e após 24h tratadas com vírus EMC (100 TCID₅₀). As células foram observadas diariamente até quando foi observado um ECP de 100% no controle de vírus. O título foi expresso como o inverso da diluição onde ocorreu uma redução em 50% do ECP, quando comparado às células tratadas com IFN e o controle de vírus.

5.8.1 - EFEITO DO β -MERCAPTOETANOL E DO TAMPÃO DE AMOSTRA, NA MULTIPLICAÇÃO DO VÍRUS EMC, EM CÉLULAS VERO

O β -mercaptoetanol (β ME) é um agente redutor que quebra pontes de sulfeto. Este agente redutor é utilizado em tampão de amostra de proteínas, juntamente com SDS, um detergente aniônico que rompe quase todas as interações não-covalentes nas proteínas nativas. Estes se ligam às cadeias protéicas principais, numa proporção de um SDS para cada dois aminoácidos, o que dá ao complexo de SDS/proteína, uma carga negativa, aproximadamente proporcional à massa da proteína.

Em algumas construções, os IFN híbridos obtidos (FIG. 22) apresentaram atividade antiviral somente após a adição do tampão de amostra e aquecimento (60°C). Entretanto, a inibição da multiplicação dos vírus poderia estar associada ao efeito inibidor do SDS ou β ME. Para tanto, foi testado o efeito destas substâncias no ciclo de multiplicação dos vírus EMC, utilizados em células VERO. Quantidades de β ME relativas ao do tampão de amostra foram testadas isoladamente, assim como o tampão de amostra. Além disso, as amostras foram também aquecidas, assim como as amostras de interferons testadas nos experimentos de titulação.

Os resultados estão mostrados na FIGURA 23, e mostram que tanto o β -mercaptoetanol quanto às outras substâncias contidas no tampão de amostra, não possuem efeito sobre a multiplicação do Vírus EMC.

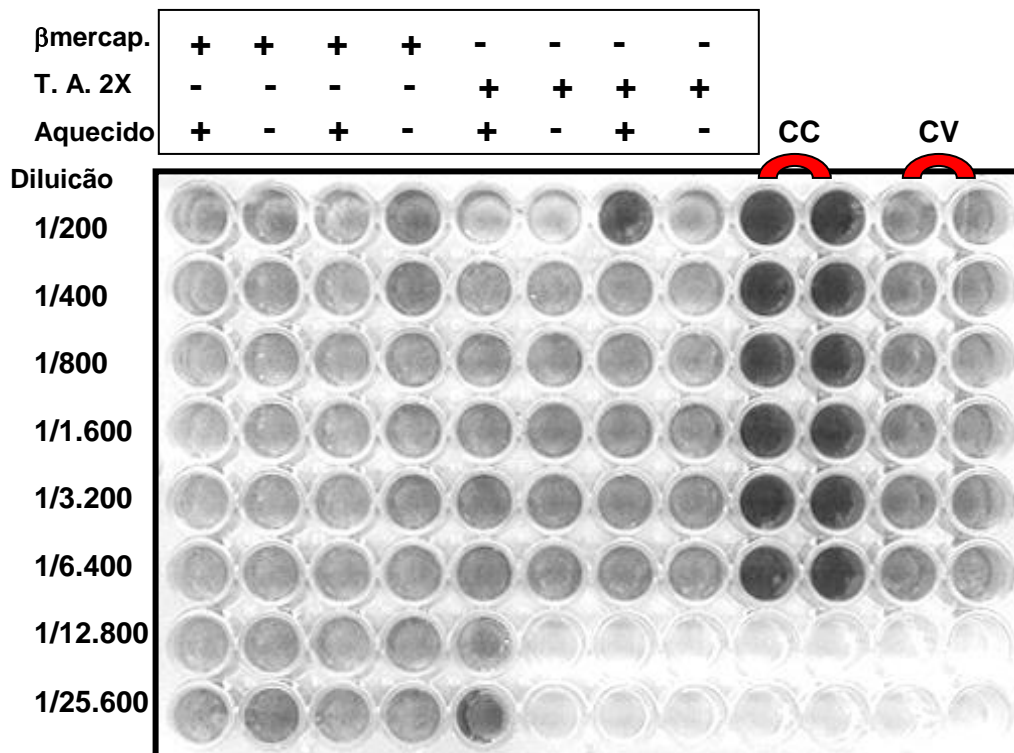


FIGURA 23: Efeito do β -mercaptoetanol e do tampão de amostra, na multiplicação do vírus EMC, em células Vero. Diluições seriadas do β -mercaptoetanol e do tampão de amostra, aquecidas (60°C) ou não, por 5 minutos, foram incubadas em estufa de CO_2 por 24 horas com células Vero. Em seguida foram adicionados vírus EMC (100 TCID_{50}) por 48 horas, quando então foi observado o efeito dessas substâncias na multiplicação do vírus, comparando-se o efeito citopático das câmaras onde foram adicionados o β -mercaptoetanol e o tampão de amostra de proteínas 2x, com as câmaras de controle de vírus (CV) e de células (CC).

5.8.2 - ATIVIDADE ANTIVIRAL EM DIFERENTES SISTEMAS CELULARES

Os experimento de titulação dos IFN nos diversos sistemas celulares foram feitos no mínimo 3 vezes (experimentos independentes). Os títulos mostrados referem-se a uma média entre os valores obtidos. Estes valores podem ser observados nas TABELAS 2 e 3, assim como também podem ser visualizados nas FIGURAS 24 a 28. A atividade antiviral não foi observada em células L-929 para nenhum dos interferons híbridos testados.

Nas FIGURAS 24, 25, 26, 27 e 28, pode-se observar a proteção das células, contra o vírus utilizado no desafio, pelos interferons recombinantes obtidos. O título foi dado como o inverso da diluição na qual foi observada uma redução em 50% do ECP, quando comparada àquelas nas câmaras do controle de vírus.

O rHuIFN- β , que não possui nenhuma modificação na seqüência dos aminoácidos, foi também produzido em *E. coli* como os outros híbridos, para servir de controle nos testes realizados. O rHuIFN- β mostrou uma atividade antiviral de 1×10^5 , 6×10^5 e 5×10^5 U/ml, em células Vero, Wish e MDBK, respectivamente, sendo todas estas células desafiadas com o vírus EMC. Entretanto, mostrou uma diminuição na atividade antiviral em células MDBK (6×10^4 U/ml), quando desafiadas com o vírus BHV-1. Além disso, esse mesmo IFN não apresentou atividade antiviral detectável (ou $< 1 \times 10^2$ U/ml) em células L-929 (TABELAS 2 e 3; FIG. 28).

O rHuIFN- β 97, que possui uma substituição da H97 pela A97, apresentou uma atividade antiviral de 5×10^5 e 8×10^5 U/ml, em células Vero e Wish, respectivamente, desafiadas com o vírus EMC. Em células MDBK, apresentou atividade antiviral de (6×10^5 e 1×10^5 U/ml) desafiadas com o vírus EMC e BHV-1, respectivamente. Já em células L-929 desafiadas com o vírus EMC, esse IFN também não apresentou atividade antiviral detectável (TABELAS 2 e 3; FIG. 28).

O híbrido rHuIFN- β 97 α , cujas α -hélices **C**, **D** e **E** e alças **cd** e **de** do IFN- β foram substituídas por aquelas correspondentes do IFN- α , apresentou uma atividade antiviral de 5×10^4 U/ml em células Vero, entretanto a atividade antiviral foi menor em células Wish (8×10^3 U/ml) e não detectável em células L-929 ($< 1 \times 10^2$ U/ml), quando desafiadas com o vírus EMC. No entanto, em células MDBK, desafiadas tanto com o vírus EMC como o

BHV-1, a atividade antiviral desse híbrido foi maior (1×10^6 e 1×10^5 U/ml, respectivamente), 2 e 1 log, em relação à atividade antiviral do rHuIFN- β nas mesmas células (TABELAS 2 e 3; FIG. 28).

O rHuIFN- α_{94} , que possui uma substituição do D94 por L94, apresentou uma atividade antiviral de 7×10^5 e 8×10^5 U/ml, em células Vero e Wish, respectivamente, desafiadas com o vírus EMC., Em células MDBK desafiadas com o EMC, apresentou maior atividade antiviral (6×10^6 U/ml) e em células MDBK desafiadas com o vírus BHV-1, a atividade antiviral foi semelhante àquela das células Vero (3×10^5 U/ml). Da mesma forma como encontrado para os outros IFN, em células L-929 desafiadas com o vírus EMC, esse IFN também não apresentou atividade antiviral detectável (TABELAS 2 e 3; FIG. 28).

O híbrido rHuIFN- $\alpha_{44\beta 106\alpha}$, cujas α -hélices **B** e **C** e alças **bc** e **cd** do HuIFN- α_{2b} foram substituídas pelas mesmas do HuIFN- β , a atividade antiviral detectável em células Vero e Wish foi menor em relação aos outros híbridos (4×10^3 e 6×10^3 U/ml, respectivamente), assim como não foi detectável atividade em células L-929 ($< 1 \times 10^2$ U/ml). Entretanto, a atividade antiviral observada em células MDBK desafiadas tanto com o vírus EMC (5×10^5 U/ml) quanto com o vírus BHV-1 (1×10^5 U/ml), foi semelhante a dos outros híbridos citados anteriormente (TABELAS 2 e 3; FIG. 28).

O HuIFN- α_{2b} utilizado em células Vero, Wish e MDBK como IFN padrão e o HuIFN- $\alpha_{2\alpha_1}$ utilizado em células L-929, foram titulados em experimentos anteriores sendo seus títulos respectivamente 1×10^6 U/ml e 3×10^4 U/ml.

TABELA 2 - Título dos interferons (U/ml) obtidos em células VERO, WISH e L-929 desafiadas com o vírus EMC.

Células	IFN $\alpha_2\alpha_1$	IFN α_{2B}	IFN β	IFN β_{97}	IFN α_{94}	IFN $\beta_{97\alpha}$	IFN $\alpha_{44\beta_{106\alpha}}$
VERO	*NT	1x10 ⁶	1x10 ⁵	5x10 ⁵	7x10 ⁵	5x10 ⁴	4x10 ³
WISH	*NT	1x10 ⁶	6x10 ⁵	8x10 ⁵	8x10 ⁵	8x10 ³	6x10 ³
L-929	3x10 ⁴	*NT	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²	<1x10 ²

*NT – Não testado

<1x10² – Diluição mínima testada

TABELA 3 - Título dos interferons (U/ml) obtidos em células MDBK desafiadas com os vírus EMC e BHV-1.

INTERFERONS RECOMBINANTES						
Vírus	α_{2B}	β	β_{97}	α_{94}	$\beta_{97\alpha}$	$\alpha_{44\beta_{106\alpha}}$
EMC						
1000 TCID₅₀	2x10 ⁶	5x10 ⁵	6x10 ⁵	6x10 ⁶	1x10 ⁶	5x10 ⁵
BHV-1						
200 TCID₅₀	1x10 ⁶	6x10 ⁴	1x10 ⁵	3x10 ⁵	1x10 ⁵	1x10 ⁵

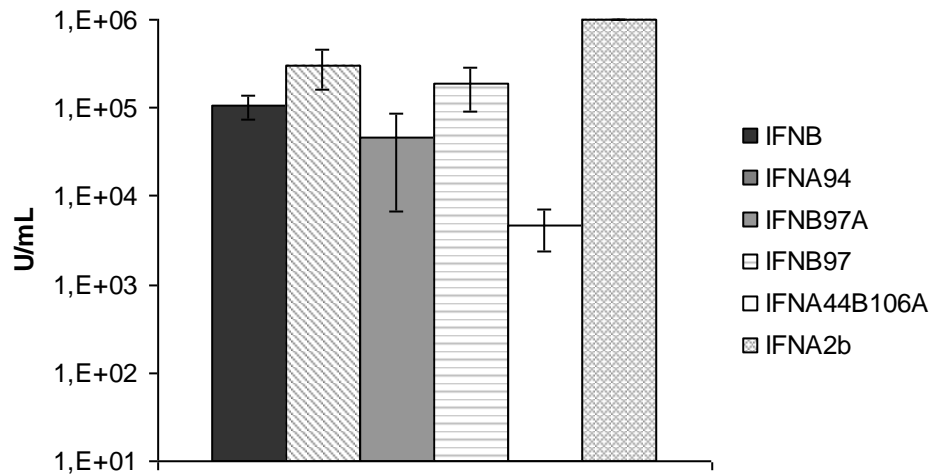


FIGURA 24: Atividade antiviral dos interferons recombinantes em células VERO. As diluições seriadas das diferentes preparações dos IFN recombinantes purificados foram incubadas por 24 horas com células Vero, sendo em seguida, desafiadas com vírus EMC (100 TCID₅₀) por 48 horas. O título foi dado como a recíproca da diluição na qual foi observada uma redução em 50% do ECP quando comparada àquelas nas câmaras do controle de vírus.

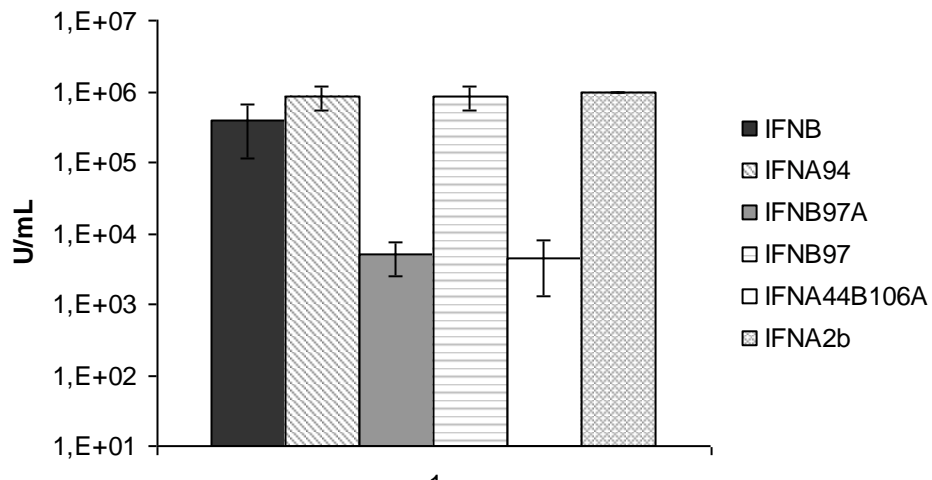


FIGURA 25: Atividade antiviral dos interferons recombinantes em células Wish. As diluições seriadas das diferentes preparações dos IFN recombinantes purificados foram incubadas por 24 horas com células Wish, sendo em seguida, desafiadas com vírus EMC (100 TCID₅₀) por 48 horas. O título foi dado como o inverso da diluição na qual foi observada uma redução em 50% do ECP quando comparada àquelas nas câmaras do controle de vírus.

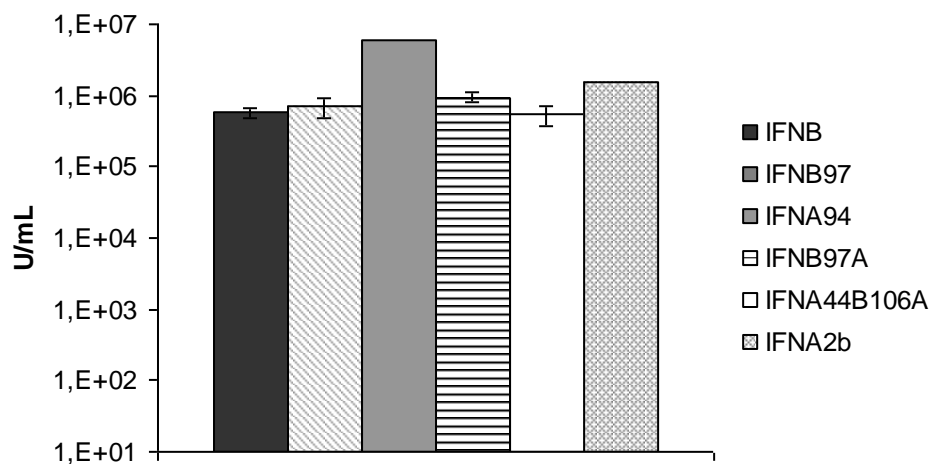


FIGURA 26: Atividade antiviral dos interferons recombinantes em células MDBK desafiadas com o vírus EMC. As diluições seriadas das diferentes preparações dos IFN recombinantes purificados foram incubadas por 24 horas com células MDBK, sendo em seguida, desafiadas com vírus EMC (1000 TCID₅₀) por 48 horas. O título foi calculado pelo inverso da diluição na qual foi observada uma redução em 50% do ECP quando comparada àquelas nas câmaras do controle de vírus.

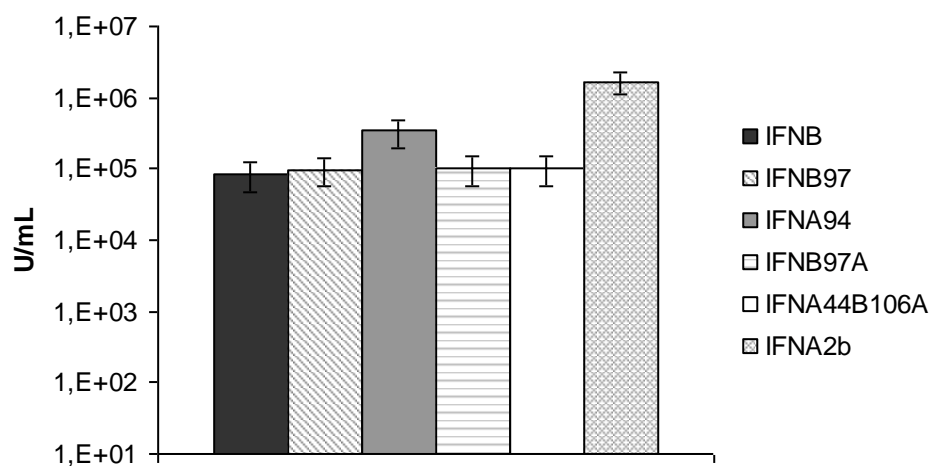


FIGURA 27: Atividade antiviral dos interferons recombinantes em células MDBK, desafiadas com o BHV-1. As diluições seriadas das diferentes preparações dos IFN recombinantes purificados foram incubadas por 24 horas com células MDBK, sendo em seguida, desafiadas com vírus BHV-1 (200 TCID₅₀) por 48 horas. O título foi calculado pelo inverso da diluição na qual foi observada uma redução em 50% do ECP quando comparada àquelas nas câmaras do controle de vírus.

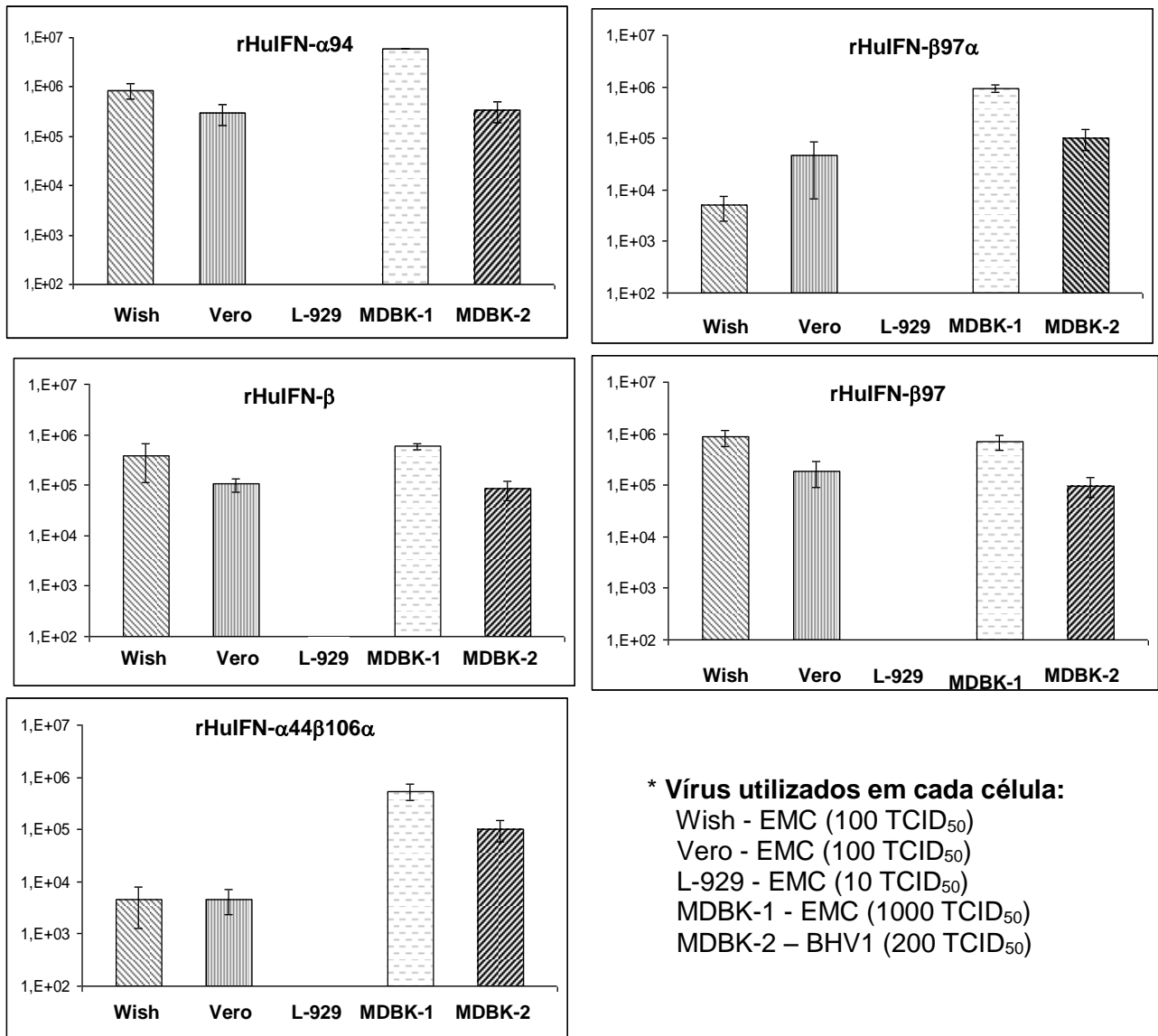


FIGURA 28: Comparação da atividade antiviral dos interferons recombinantes, nos diferentes sistemas celulares. As diluições seriadas das diferentes preparações dos IFN recombinantes purificados, foram incubadas por 24 horas com células Wish, Vero, L-929 ou MDBK, sendo em seguida, desafiadas com os respectivos vírus, por 48 horas. O título foi calculado pelo inverso da diluição na qual foi observada uma redução em 50% do ECP, quando comparada àquelas nas câmaras do controle de vírus.

5.9 - NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS INTERFERONS RECOMBINANTES E HÍBRIDOS EM CÉLULAS VERO, POR ANTICORPO ANTI- α .

A neutralização da atividade antiviral dos IFN recombinantes pelo anticorpo policlonal antiHuIFN- α , em células Vero infectadas com o vírus EMC, é mostrado na FIGURA 29 (A e B). Podemos observar a neutralização total da atividade antiviral do rHuIFN- α 94 pelo anticorpo antiHuIFN- α . Contudo, a atividade do híbrido rHuIFN- β 97 α foi parcialmente neutralizada pelo anticorpo antiHuIFN- α , assim como a atividade antiviral dos interferons rHuIFN- β e rHuIFN- β 97. Não foi possível analisar a neutralização da atividade antiviral do interferon híbrido rHuIFN- α 44 β 106 α neste experimento, uma vez este IFN possui baixa atividade antiviral em células Vero (4×10^3 U/ml).

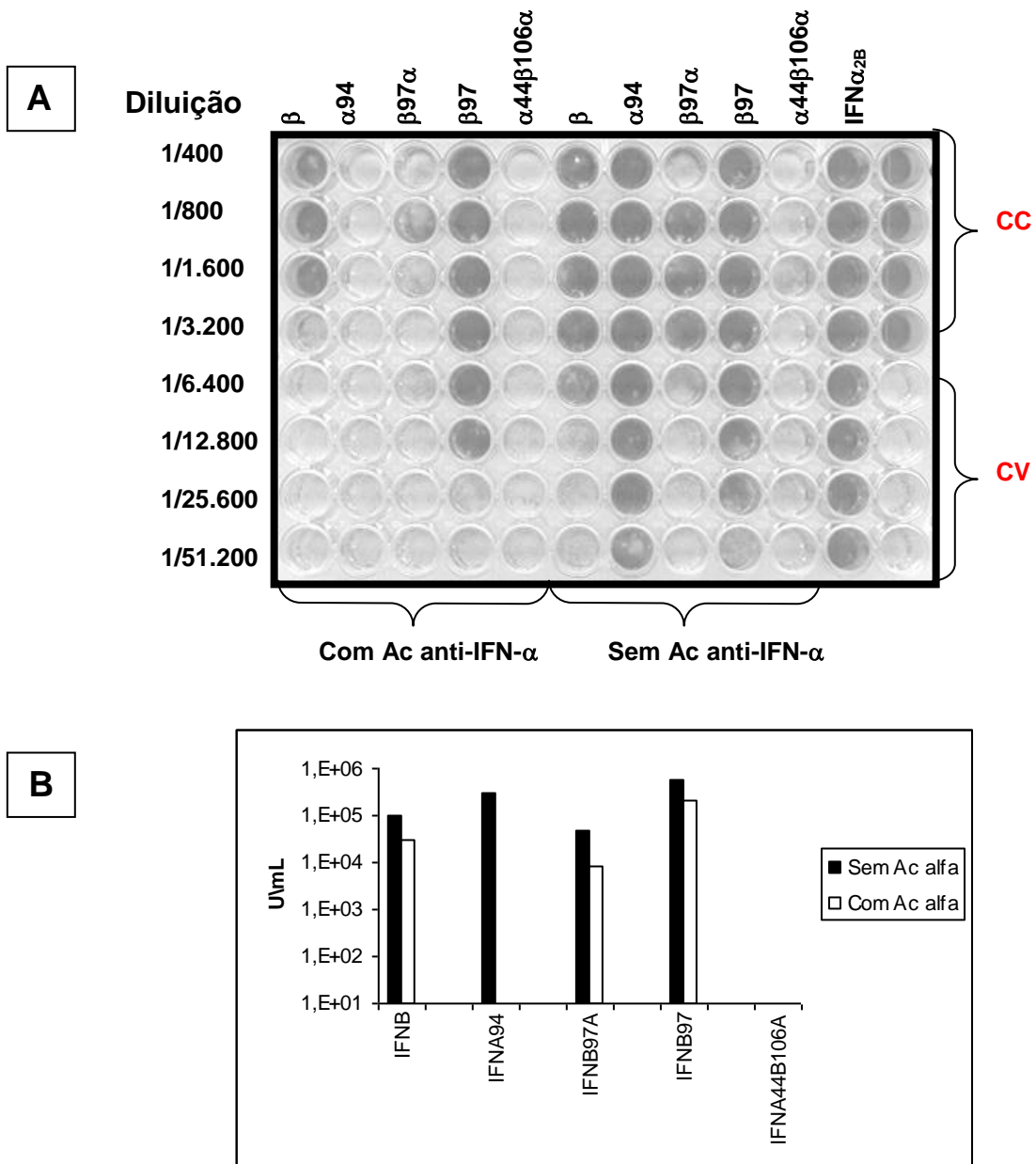


FIGURA 29: Neutralização da atividade antiviral dos interferons recombinantes em células Vero, por anticorpo Anti- α . Os IFN recombinantes foram diluídos em série em placa de microtécnica e incubados a 37°C com anticorpo antiHulFN- α por 1 hora. Após esse intervalo foram adicionadas células Vero e vírus EMC (100 TCID₅₀) e incubados em estufa de CO₂, a 37°C, por 48 h quando foi feita a leitura do ECP.

5.10 - ANÁLISE DOS NÍVEIS DA ACUMULAÇÃO DE mRNA DOS GENES INDUZIDOS PELOS INTERFERONS RECOMBINANTES E HÍBRIDOS

A proteção das células à infecção viral pelos IFN está relacionada com a capacidade desses em induzir uma série de genes (ISG), os quais desencadearão vários processos, que levarão ao estado antiviral. Dentre estes genes induzidos pelos interferons, podemos citar vários conhecidos, que já foram mostrados como relacionados com o desenvolvimento de um estado antiviral na célula. A indução de alguns desses genes sabidamente induzidos por IFN, como 2'5' oligoadenilato sintetase (2'5'OAS), 6-16 e MxA, foram analisados em células WISH. Da mesma forma, foi analisada também a indução do gene GBP em células murinas L-929.

Na FIGURA 30 estão apresentados os resultados das induções de genes 2'5'OAS e 6-16 pelos IFN híbridos e IFN controles rHuIFN- α_{2b} e rHuIFN- β , e na FIGURA 31, são mostrados os resultados da indução do gene MxA, também por estes IFN. As células Wish tratadas com estes IFN apresentaram acúmulo dos mRNA do gene 2'5' OAS (FIG. 30 A), do gene 6-16 (FIG. 30 B) e do gene MxA (FIG. 31 A). Os maiores níveis de acumulação dos mRNA do gene 2'5' OAS em células Wish, pode ser observada nas células tratadas com os rHuIFN- β e rHuIFN- β_{97} (FIG. 30 A), no entanto, nas células tratadas pelos outros IFN, rHuIFN- α_{94} , rHuIFN- $\beta_{97\alpha}$ e o rHuIFN- $\alpha_{44\beta_{106\alpha}}$, foi observado também um nível de acumulação deste mRNA (FIG. 30 A). Nas células tratadas ou não com o tampão de amostra de proteína, não foram observados níveis detectáveis deste mRNA (FIG. 30 A).

As células Wish quando tratadas com estes IFN apresentaram níveis de acúmulo do mRNA do gene 6-16 (FIG. 30 B). Nas células Wish não tratadas com os IFN, não foram observados níveis detectáveis de mRNA do gene 6-16, assim como nas células tratadas com o tampão de amostra de proteína (FIG. 30 B). Observa-se também na FIGURA 30 (C), a normalização da quantidade de RNA aplicados em cada canaleta, através da visualização do RNA ribossomal 18S.

Na FIGURA 31, observamos um acúmulo dos mRNA transcritos do gene MxA, induzidos pelos IFN híbridos testados, assim como pelo IFN padrão HuIFN- α_{2b} . Entretanto, observamos um maior acúmulo do mRNA quando as células foram tratadas com o IFN

recombinante HuIFN- β e com o híbrido rHuIFN- β 97. Nas células não tratadas com IFN, não foi observado acúmulo deste mRNA, a não ser níveis basais de transcrição desse gene. A normalização da quantidade de RNA aplicados em cada canaleta foi observada, através da visualização do RNA ribossomal 18S (FIG. 31 B).

Na FIGURA 32 são apresentados os resultados da indução do gene GBP pelos IFN híbridos e IFN controle rHuIFN- $\alpha_2\alpha_1$, em células L-929. Como observado na FIGURA 32 A, não houve acúmulo dos mRNA do gene GBP, para nenhum dos interferons recombinantes e híbridos testados (rHuIFN- α 94, rHuIFN- β , rHuIFN- β 97, HuIFN- β 97 α e rHuIFN- α 44 β 106 α). No entanto, a acumulação do mRNA do gene GBP, foi observada nas células tratadas com o IFN recombinante, rHuIFN- $\alpha_2\alpha_1$, o qual já foi mostrado como tendo atividade antiviral nessas células. As células tratadas ou não com tampão de amostra de proteínas, também não apresentaram níveis detectáveis de acúmulo de transcritos desse gene. A normalização da quantidade de RNA aplicados em cada canaleta foi feita também, através da visualização do RNA ribossomal 18S.

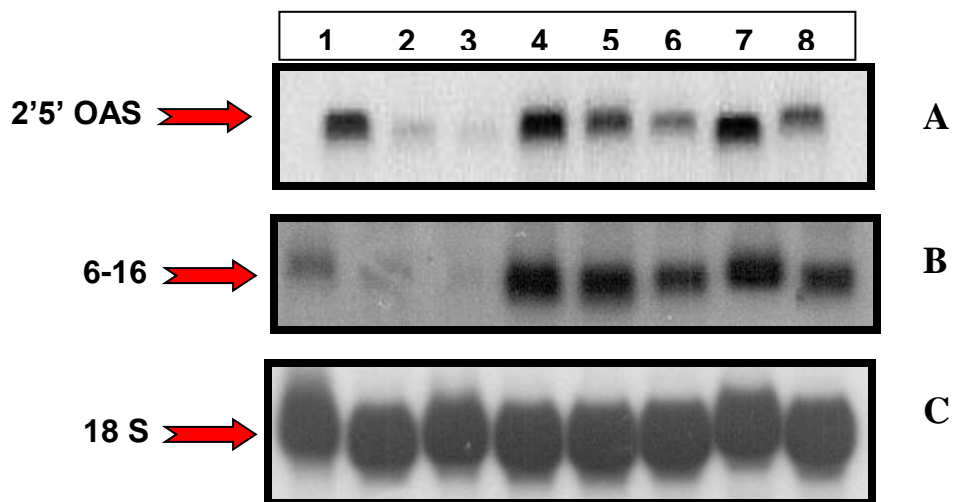


FIGURA 30: Acumulação dos mRNA dos genes 2'5'OAS e 6-16, induzidos pelos interferons recombinantes e híbridos, em células Wish. Células WISH foram tratadas com os diferentes interferons por (18 h) e o RNA total foi extraído, quantificado e separado eletroforéticamente em gel de agarose. Em seguida foram transferidos para membrana de nylon e a membrana tratada com sondas marcadas radioativamente correspondendo aos genes 2'5'OAS (A) e 6-16 (B), e o RNA ribossomal 18S (C). As setas indicam as bandas referentes aos RNAs obtidos. Canaleta 1, HuIFN- α_{2b} ; Canaleta 2, células não tratadas; Canaleta 3, células tratadas com tampão de aplicação de amostra; Canaleta 4, rHuIFN- β ; canaleta 5, rHuIFN- α_{94} ; Canaleta 6, HuIFN- $\beta_{97\alpha}$; Canaleta 7, rHuIFN- β_{97} ; Canaleta 8, rHuIFN- $\alpha_{44\beta_{106\alpha}}$.

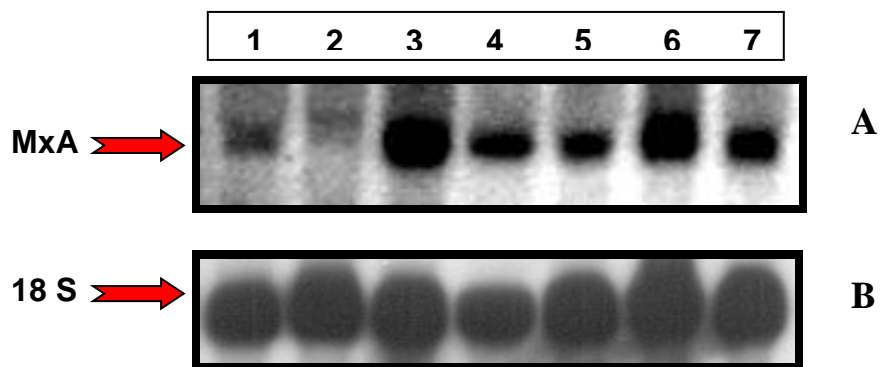


FIGURA 31: Acumulação do mRNA do gene MxA, induzido pelos interferons recombinantes e híbridos, em células Wish. Células WISH foram tratadas com os diferentes interferons por (18 h) e o RNA total foi extraído, quantificado e separado eletroforéticamente em gel de agarose. Em seguida foram transferidos para membrana de nylon e a membrana tratada com sondas marcadas radioativamente correspondendo ao gene MxA (A) e o RNA ribossomal 18 S (B). As setas indicam as bandas referentes aos mRNA obtidos. Canaleta 1, HuIFN- α_{2b} ; Canaleta 2, células não tratadas; Canaleta 3, rHuIFN- β ; Canaleta 4, rHuIFN- α_{94} ; Canaleta 5, HuIFN- $\beta_{97\alpha}$; Canaleta 6, HuIFN- β_{97} ; Canaleta 7, rHuIFN- $\alpha_{44\beta_{106\alpha}}$.

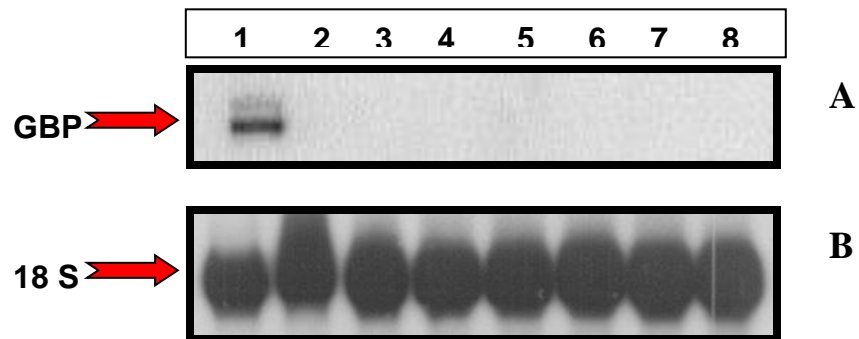


FIGURA 32: Acumulação do mRNA do gene GBP, induzido pelos interferons recombinantes e híbridos, em células L-929. Células L-929 foram tratadas com os diferentes interferons por (18 h) e o RNA total foi extraído, quantificado e separado eletroforéticamente em gel de agarose. Em seguida foram transferidos para membrana de nylon e a membrana tratada com sondas marcadas radioativamente correspondendo ao gene GBP (A) e o RNA ribossomal 18S (B). As setas indicam as bandas referentes aos RNAs obtidos. Canaleta 1, HuIFN- $\alpha_2\alpha_1$; Canaleta 2, células não tratadas; Canaleta 3, células tratadas com tampão de aplicação de amostra; Canaleta 4, rHuIFN- β ; Canaleta 5, rHuIFN- α_94 ; Canaleta 6, HuIFN- $\beta_97\alpha$; Canaleta 7, rHuIFN- β_97 ; Canaleta 8, rHuIFN- $\alpha_44\beta_106\alpha$.

6 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

6.1- CONSTRUÇÃO E CLONAGEM DOS INTERFERONS HUMANOS HÍBIDOS

A construção de proteínas híbridas através do uso da engenharia genética é uma técnica que vem sendo utilizada, no Laboratório de Vírus, desde a década de 1980. O pioneiro destas construções foi CARVALHO, que em sua tese de doutorado (1998), mostrou a construção de vários HuIFN α /HuIFN β híbridos. Todas estas construções foram possíveis, a partir da obtenção do fragmento gênico que codifica para estas proteínas não mutadas (naturais), os quais foram clonados em vetores de expressão, sendo estes utilizados como molde para a inserção das diferentes mutações.

Neste trabalho, a construção dos híbridos foi possível pela utilização de construções anteriores, algumas delas adicionadas de novos sítios de restrição que permitiu a construção de novos híbridos. Através da técnica do PCR, foi possível inserir os sítios de restrição nos fragmentos dos ácidos nucleicos que codificam para a proteína madura dos HuIFN e a conseqüente construção dos diferentes fragmentos propostos (FIG. 7). A transferência para vetores de expressão (FIG. 10), permitiu a produção das proteínas em procaríotos, como descrito por STÜBER, 1990. O sequenciamento dos plasmídeos obtidos com os híbridos confirmou a correta clonagem destes, assim como a inserção das modificações desejadas.

6.2 - PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS INTERFERONS

A produção dos rHuIFN utilizados neste trabalho, foi feita em sistema de procaríoto, utilizando a bactéria *E. coli* M15. Todos os IFN foram produzidos pela bactéria após indução com IPTG (FIG. 11 e 12), sendo uns induzidos em maior ou menor quantidade. A variação na produção destas proteínas é devida a alguns fatores intrínsecos da própria proteína recombinante, como também a fatores do hospedeiro (bactéria). Um exemplo bem conhecido em relação aos fatores protéicos é em relação à alta hidrofobicidade do HuIFN- β , que além de causar um efeito tóxico na bactéria hospedeira, também é responsável pela dificuldade de purificação e cristalização deste IFN (FRESENIUS *et al.*, 1997). Este autor propôs a substituição de 10 resíduos hidrofóbicos de fenilalanina e leucina (expostos nas α -hélices **D** e **E**) pelo aminoácido serina. Os resultados mostraram que, em três moléculas em que apenas um destes aminoácidos foi trocado, houve

aumento da solubilidade e produção do rHuIFN- β sem modificação da atividade biológica (FRESENIUS *et al.*, 1997). Além disso, proteínas de eucariontes são muito pouco expressas em *E.coli*, quando estas contêm seqüências de códons raramente usados pela bactéria, inseridas nos vetores de expressão, também chamada “hungry códon syndrome” (KURLAND e GALLANT, 1996).

A concentração das proteínas não foi possível de ser avaliada por espectrofotometria através do “Kit Bio-Rad Assay” (Bio-Rad laboratories, USA). Este método de quantificação não foi sensível o suficiente para quantificar os IFN, mas a confirmação da produção das proteínas foi feita através da visualização destas em SDS-PAGE. Neste sistema de fracionamento eletroforético de proteínas desnaturadas, foi possível a visualização de bandas referentes aos IFN, sendo a mobilidade relativa destas proteínas comparada àquela de padrões de massa molecular, que evidenciam a mobilidade relativa de proteínas conhecidas, com massa molecular também conhecida.

Em todas as proteínas produzidas pelos plasmídeos de expressão pDS₅₆ e pQE9, foram inseridos os amino ácidos M, S e seis resíduos de H, na sua região N-terminal. A afinidade de ligação das 6 histidinas à Ni-NTA, que é maior que a afinidade de ligação entre antígeno/anticorpo ou enzima/substrato, foi utilizada para a purificação das proteínas recombinantes (HOCHULI *et al.*, 1987). A cauda de H não é carregada em pH fisiológico e geralmente não altera a secreção, compartimentalização e o enovelamento das proteínas, não interferindo na estrutura e função das proteínas (STÜBER *et al.*, 1990). Por isso, este método descrito há mais de uma década tem sido utilizado até hoje para a purificação de uma grande variedade de proteínas recombinantes, inclusive IFN híbridos (rHuIFN α_2 \backslash α_8) com algumas variações em relação à coluna de afinidade (PLATIS e FOSTER, 2003).

A purificação das proteínas foi confirmada em SDS-PAGE. Todos os IFN recombinantes e híbridos foram purificados neste sistema. Entretanto, algumas diferenças na purificação foram observadas. O rHuIFN- β 97 α foi o que apresentou um melhor grau de purificação, em relação à quantidade purificada, comparado com todos os outros híbridos (FIG. 17). A proteína foi eluída em todos os gradientes de pH utilizados (5,0; 4,5 e 4,0), entretanto, em relação à pureza, as amostras das proteínas que foram eluídas no pH 4,0, foram as que

apresentaram maior quantidade de proteínas contaminantes. A diminuição do pH favoreceu a eluição de outras proteínas ligadas à coluna. Estes dados estão de acordo com STÜBER *et al.*, 1990, cujas proteínas recombinantes foram eluídas nos pH 5,9 e 4,5. Entretanto, estes pesquisadores não usaram gradientes de pH. Em nosso trabalho, o uso deste gradiente foi adaptado, de acordo com os resultados obtidos.

Os IFN recombinantes rHuIFN- α 94, rHuIFN- β 97 e rHuIFN- β , apresentaram um grau de purificação parecidos (FIG 16, 18 e 19). Contudo o grau de purificação não foi satisfatório e precisa ser aprimorado. Os rHuIFN- α 94 e rHuIFN- β 97 foram eluídos nos pH 4,5 e 4,0, entretanto, no pH 4,0 também foi observado bandas referentes à proteínas contaminantes, mas em quantidades bem menores que aquelas mostradas para o rHuIFN- β 97 α . Já o rHuIFN- β , foi eluído nos pH 5,0 e 4,5 e na fração 1 do pH 5,0 foi observado pequenas quantidades de bandas referentes a proteínas contaminantes.

O rHuIFN- α 44 β 106 α foi o que apresentou menor grau de purificação (FIG. 20). Este híbrido foi eluído somente em frações do pH 5,0 e nestas frações, bandas relacionadas a proteínas contaminantes também foram visualizadas no gel. Várias tentativas foram feitas no sentido de melhorar a purificação deste híbrido, entretanto sem sucesso. A dificuldade da purificação de proteínas que possuem cisteínas (HuIFN- α _{2b} e HuIFN- β possuem respectivamente, 4 e 3 cisteínas), já foi descrita (STÜBER *et al.*, 1990). Entretanto, as duas bandas mais fortes de proteínas observadas, apresentavam uma mobilidade relativa de 20 e 26 kDa aproximadamente. Este dado sugere a possibilidade de ter ocorrido síntese da proteína inteira, assim como a síntese pode ter sido interrompida por algum fator e isto, levou a produção de uma proteína com menor massa. Entretanto, isto é apenas uma especulação, uma vez que deveriam ter sido feitos testes para comprovar esta hipótese. O fato é que este híbrido apresentou atividade biológica e a confirmação de que a atividade observada era realmente relacionada ao rHuIFN- α 44 β 106 α , foi feita através de ensaio de imunoreação (Western Blot).

O tamanho molecular aparente dos IFN recombinantes e híbridos, após purificação, foi estimado entre 20 e 26 kDa, a partir dos dados de mobilidade relativa (Rf) obtidos em SDS-PAGE (FIGURAS 16 a 20). A diferença de mobilidade relativa observada entre os híbridos pode ser explicada em parte, devido ao cálculo do peso molecular aparente estar sujeito a erro. Entretanto, as diferenças podem também ser atribuídas às características

bioquímicas das moléculas. O SDS, utilizado na técnica de fracionamento de proteína em SDS-PAGE, se liga a toda cadeia polipeptídica, mascarando a carga da molécula e contribuindo para que estas sejam desnaturadas. Além disso, o agente redutor β -mercaptoetanol rompe as pontes dissulfeto das proteínas. Neste contexto, a migração da proteína só dependeria da massa molecular desta. Porém, como demonstrado por alguns pesquisadores, isto não é a regra (DUBE e FLYNN, 1998). A quantidade de SDS que se liga aos aa básicos e hidrofóbicos é maior que naqueles ácidos e hidrofílicos, como demonstrado a muitos anos, por MALEY *et al.*, (1977). Também, a quantidade de SDS que se liga às proteínas é influenciado pela concentração de sal, carga elétrica média e conformação estrutural da proteína (PITT-RIVERS e IMPIOMBATO, 1968; TUNG e KNIGHT, 1972).

6.3 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS

As modificações feitas na estrutura dos IFN controles rHuIFN- α 94 e rHuIFN- β 97, assim como nos rHuIFN híbridos rHuIFN- β 97 α e rHuIFN- α 44 β 106 α , foram testadas em relação a atividade antiviral e indução de genes por interferons. Estes experimentos foram feitos para confirmar a possibilidade do uso de modelagem molecular computacional, em associação com a engenharia genética, como ferramentas fundamentais para os estudos da relação entre estrutura e função. A base para estes estudos foi o fato de que os HuIFN- α _{2b} e HuIFN- β , além de possuírem estrutura tridimensional muito semelhante (KARPUSAS *et al.*, 1997; RADHAKRISHNAN *et al.*, 1996; KLAUS *et al.*, 1997) induzem atividades biológicas similares, porém, mostrando diferenças quantitativas e qualitativas, quando testados em sistemas homólogos ou heterólogos (LEAMAN *et al.*, 2003; DUMOUTIER *et al.*, 2004).

Os testes da atividade biológica das proteínas recombinantes e híbridas, foram feitas diálises em tampão de uréia com concentrações decrescentes (6M, 4M e 2M) e em seguida, dialisadas contra PBS contendo 0,025% de SDS. Este processo de diálise diminuindo gradativamente a concentração da uréia foi feito, na tentativa de minimizar a renaturação incorreta das proteínas, assim como minimizar a formação de agregados, uma vez que já foi demonstrado que, principalmente o IFN- β produzido em sistema de procaríoto, ou seja, não glicosilado, possui essa característica (KARPUSAS *et al.*, 1998).

Além disso, a adição de SDS ao PBS foi feita também, porque dados do laboratório mostraram o aumento da estabilidade da atividade antiviral (FERREIRA, 1982). O uso de SDS em tampões utilizados para a diálise de IFN já foi descrito por vários autores, sendo também mostrado nas preparações de amostras do rHuIFN- β_{Ser17} , devido ao alto teor de resíduos hidrofóbicos expostos na molécula do IFN- β . (KARPUSAS *et al.*, 1998).

A medida da atividade biológica dos recombinantes produzidos e dialisados foi evidenciada pelo desenvolvimento da atividade antiviral, o qual é descrita como uma das principais atividades dos IFN (FIG. 21). Os resultados de medida da atividade antiviral dos IFN construídos só foram observados, em presença de β -mercaptoetanol (β ME) e SDS, e quando as amostras foram aquecidas a 60°C, durante 5 minutos (FIG. 22). Estes dados vão contra aqueles encontrados na literatura, onde as proteínas utilizadas são renaturadas em tampões específicos, como mostrado recentemente por PLATIS e FOSTER, 2003. Além disso, as C31 e C141 formam pontes dissulfeto do HuIFN- β e entre as C1 e C98 e entre as C29 e C138 no HuIFN- α_2 , o que é de extrema importância para a manutenção da estrutura conformacional da molécula e a sua interação com o receptor celular (KARPUSAS *et al.*, 1998). O tratamento dos recombinantes construídos com β ME provavelmente irá desfazer as pontes de S-S, porém ao ser diluído em meio de cultura deve retornar ao estado conformacional natural o que permite a sua interação com o receptor.

Como já dito anteriormente, o IFN- β não glicosilado forma agregados entre as suas moléculas, além de ser susceptível à formação de dímeros, através da ligação entre as duas histidinas presentes nas moléculas, nas posições 93 e 97 (KARPUSAS *et al.*, 1998). Em relação à formação de dímero, no entanto, RUNKEL *et al.*, (2000), mostraram as substituições das H97 por A97 não interferiram com a atividade biológica do mutante. Sendo assim, a formação do dímero ainda é uma controvérsia, em relação ao seu papel na atividade biológica destes IFN. Nossos resultados com o HuIFN- β_{97} , no qual também foi substituída a H97 por A97, também estão de acordo com os de RUNKEL *et al.*, (2000).

Os resultados obtidos em nossos estudos indicam que os IFN recombinantes e híbridos obtidos, após diálise, podem não ter tido a renaturação que permitissem a interação com os receptores. Possivelmente, por interações intramoleculares de tal forma a expor ou

aminoácidos carregados ou regiões hidrofóbicas, que passaram a interferir na ligação com o receptor celular. Por outro lado, também indicam o papel das cisteínas, provavelmente pela formação de pontes dissulfeto, na estrutura destes híbridos. Esta suposição é baseada no fato de que quando foi adicionado β ME e SDS e as amostras foram aquecidas, houve o restabelecimento da atividade antiviral. Tudo indica que as proteínas tiveram suas pontes dissulfeto rompidas pelo β ME e em meio isotônico das células ocorreu, mesmo que por um breve momento o restabelecimento da estrutura conformacional passível de induzir a proteção antiviral.

A quantidade do tampão de amostra de proteínas foi ajustada, através de testes em vários experimentos, de forma que a concentração não foi tóxica para as células, mas o suficiente para a manter a atividade da proteína. O tampão de amostra de proteína, que é utilizado na concentração 1x para fracionamento em SDS-PAGE, foi diluído 10x para ser utilizado nas amostras de proteínas, nos experimentos de medida das atividades biológicas. Sendo assim, a quantidade de β ME e SDS foi menor, mas necessária para o restabelecimento da atividade protéica.

A partir dos resultados obtidos com as proteínas adicionadas de tampão de amostra de proteína, foi necessário mostrar que a inibição da multiplicação do Vírus EMC não era ocasionada pela ação das substâncias contidas no tampão da amostra utilizado ou da presença de inibidores após o aquecimento. Os resultados obtidos mostraram que nem o β ME, nem os componentes do tampão de amostra, foram capazes de interferir com a multiplicação do vírus (FIG. 23). Sendo assim, ficou demonstrado que a inibição da multiplicação do vírus no teste de atividade antiviral obtida, era devida exclusivamente, aos IFN testados.

6.3.1 – ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS IFN RECOMBINANTES E HÍBRIDOS - rHuIFN- β , rHuIFN- β 97, rHuIFN- α 94, rHuIFN- β 97 α E rHuIFN- α 44 β 106 α

ATIVIDADE ANTIVIRAL EM CÉLULAS VERO

A atividade antiviral apresentada pelo rHuIFN- β e pelo IFN controle rHuIFN- β 97, em células Vero desafiadas com o vírus EMC (1×10^5 e 5×10^5 U/ml, respectivamente), foi

muito semelhante (FIG. 24). Assim, a substituição do aminoácido H97, com carga positiva, para A97, com carga neutra, na porção inicial da alça **cd** na molécula do rHuIFN- β , não determinou nenhuma alteração da molécula que pudesse interferir na ligação da molécula ao receptor destas células e na atividade antiviral.

Da mesma maneira, a atividade antiviral observada para o rHuIFN- α 94 em células Vero desafiadas com o vírus EMC (7×10^5 U/ml), foi muito semelhante a atividade do HuIFN- α_{2b} (FIG. 24). Portanto, a substituição do aminoácido D94 com carga negativa, para A94, com carga neutra, não influenciou na ligação ao receptor e na atividade antiviral do IFN controle construído.

Em relação à atividade antiviral apresentada pelos híbridos rHuIFN- β 97 α e rHuIFN- α 44 β 106 α (5×10^4 e 4×10^3 U/ml), em células Vero, houve uma diminuição em cerca de um a dois log da atividade biológica em relação aos controles (FIG. 24). Estes resultados associados aos dados obtidos em nosso laboratório com os híbridos rHuIFN- β 131 α (BRITO, 2000) e rHuIFN- β 107 α (CARVALHO, 1998), cuja atividade antiviral específica nestas células foi também menor àquela apresentada pelo rHuIFN- β , nos permite sugerir que a atividade antiviral nestas células pode estar relacionada a região C-terminal da molécula do HuIFN- β , ou mais especificamente as α -hélices **D** e **E**, as quais foram substituídas pelas mesmas do HuIFN- α .

ATIVIDADE ANTIVIRAL EM CÉLULAS WISH

A atividade antiviral apresentada pelo rHuIFN- β e pelo IFN controle rHuIFN- β 97, em células Wish, desafiadas com o vírus EMC (6×10^5 e 8×10^5 U/ml, respectivamente), foi muito semelhante (FIG. 25). Sendo assim, como observado em células Vero, a substituição do aminoácido H97, para A97, não determinou nenhuma alteração conformacional da molécula que pudesse interferir na ligação da molécula ao receptor destas células e na atividade antiviral.

Da mesma maneira, a atividade antiviral observada para o rHuIFN- α 94 em células Wish desafiadas com o vírus EMC (8×10^5 U/ml), foi muito semelhante a atividade do HuIFN- α_{2b}

(FIG. 25). Portanto, a substituição do aminoácido D94 para A94, não influenciou na ligação ao receptor e na atividade antiviral do IFN controle construído, em células humanas.

A baixa atividade antiviral apresentada pelos híbridos rHuIFN- β 97 α e rHuIFN- α 44 β 106 α (8×10^3 e 4×10^3 U/ml), em células Wish (FIG. 25), foi um dado interessante e importante, que associado também a outros dados obtidos em nosso laboratório com os híbridos rHuIFN- β 46 α e rHuIFN- β 107 α (CARVALHO, 1998), nos permite sugerir que a região C-terminal do HuIFN- β é importante para manutenção de sua atividade antiviral em células humanas. Entretanto, esta região em separado, não é responsável pelo aumento de afinidade de ligação deste IFN ao seu receptor celular, uma vez que CARVALHO, (1998), observou também que o híbrido rHuIFN- α 109 β , cuja região C-terminal, ou mais precisamente α -hélices **D** e **E** do HuIFN- β foi adicionada ao HuIFN- α , apresentou uma menor atividade antiviral em células Wish, comparado ao controle rHuIFN- α 109.

ATIVIDADE ANTIVIRAL EM CÉLULAS MDBK

Vários pesquisadores virologistas mostram que os vírus desenvolvem mecanismos de defesa, que impedem as células hospedeiras de interferirem em seu ciclo de multiplicação, o que permite que alguns vírus sejam mais ou menos “patogênicos”, em relação a diferentes sistemas celulares. Recentemente, BARRECA e O’HARE, 2004, mostraram diferenças no padrão de inibição da multiplicação do vírus humano Herpes Simples 1 (HSV), em diferentes células (Vero e MDBK). A inibição da multiplicação do HSV foi fortemente evidenciada, após 6 dias de infecção, em células MDBK, ao contrário daquela observada em células Vero. Parte deste efeito foi relacionado à produção de IFN em MDBK, induzida pela infecção viral, o que não ocorre em células Vero, já que estas são deficientes nesta via de indução destas citocinas. Outro dado interessante mostrado neste trabalho foi, a capacidade do HSV em induzir a produção de IFN em MDBK, e a falta de capacidade de induzir a produção de IFN em células humanas HeLa (BARRECA e O’HARE, 2004). Portanto, para avaliarmos se existe alguma diferença entre o título de atividade antiviral entre os IFN recombinantes e híbridos em MDBK, estas células foram desafiadas por dois vírus diferentes, EMC e BHV-1.

Em células MDBK desafiadas com o vírus EMC, o título de atividade antiviral dos rHuIFN- β e rHuIFN- β 97 foi muito semelhante (5×10^5 e 5×10^5 U/ml) (FIG. 26). Estes títulos também foram muito semelhantes aos obtidos em células Wish e Vero. Entretanto, em MDBK desafiadas com o BHV-1, o título do rHuIFN- β foi cerca de um log menor (FIG. 27).

O título do rHuIFN- α 94 em MDBK desafiadas com EMC foi 6×10^6 U/ml, também muito semelhante ao título do HuIFN- α_{2b} (FIG. 26).

Os híbridos rHuIFN- β 97 α e rHuIFN- α 44 β 106 α apresentaram um título de atividade antiviral em MDBK, desafiadas com o EMC, de 1×10^6 e 5×10^5 U/ml (FIG.26).

A análise das FIGURAS 26 e 27 permite a observação de que a maioria dos IFN construídos apresentou atividade antiviral menor nas células MDBK, quando estas foram desafiadas com o BHV-1. Quando comparamos o título de atividade antiviral obtido nestas células, observamos que, os rHuIFN- β , rHuIFN- α 94 e rHuIFN- β 97 α apresentaram atividade antiviral cerca de um log menor (FIGURAS 26 e 27). Este dado é sugestivo de que o vírus EMC pode ser “menos eficiente” que o BHV-1 em relação à indução da produção de IFN nestas células e que estes IFN podem ter sido menos eficientes em interferir nos processos de defesa desencadeados pelos BHV-1. Diferenças nos títulos obtidos nestas células eram esperados, uma vez que estes vírus desenvolvem mecanismos de defesa, para manutenção do seu ciclo de multiplicação nas células hospedeiras (BARRECA e O’HARE, 2004).

ATIVIDADE ANTIVIRAL EM CÉLULAS L-929

Nenhum dos IFN recombinantes e híbridos construídos apresentaram atividade antiviral detectável em células murinas L-929 (FIG. 28). Estes dados não foram muito surpreendentes, uma vez que já foi descrito na literatura que os HuIFN- α_{2b} e HuIFN- β possuem baixa atividade antiviral nestas células (STEWART *et al.*, 1980).

6.3.2 – RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA E FUNÇÃO DAS α -HÉLICES E ALÇAS DOS IFN RECOMBINANTES E HÍBRIDOS, NOS DIFERENTES SISTEMAS CELULARES.

OS IFN CONTROLES rHuIFN- β , rHuIFN- β 97 e rHuIFN- α 94.

Algumas diferenças nos títulos de atividade antiviral dos IFN recombinantes e híbridos, foram observadas nas diversas células testadas. Em células Wish e Vero, os rHuIFN- β e rHuIFN- β 97 não apresentaram diferenças significativas entre os dois tipos celulares. Da mesma maneira, a atividade antiviral apresentada por estes IFN em células MDBK foi muito semelhante (FIG. 28). Portanto, estes dados nos permitem sugerir que, não houve nenhuma interferência na interação do rHuIFN- β 97 com o receptor destas células, mesmo com a mudança de um aminoácido com carga positiva (H), para um aminoácido com carga neutra (A).

Em recente artigo de revisão dos HuIFN- $\alpha\beta$, foi avaliado a importância da glicosilação do rHuIFN- β , o qual sem a glicosilação é muito susceptível à agregação, além da possibilidade de formação de dímeros, através da ligação entre as duas histidinas presentes nas moléculas, nas posições **93** e **97** (Revisado por KARPUSAS *et al.*, 1998). Entretanto, RUNKEL *et al.* (2000) descreveram dois HuIFN- β mutantes (H93/H97 e H121), nos quais foram substituídas as histidinas (H) por argininas (R). Neste estudo, ambos os mutantes apresentaram atividade antiviral semelhante ao do HuIFN- β natural, assim como apresentaram mesma ligação ao receptor de superfície celular. Portanto, nossos dados associados aos de RUNKEL *et al.*, (2000), permitem sugerir, que os dímeros observados na estrutura do HuIFN- β cristalizado, podem representar um artefato no processo de cristalização e que não é relevante para sua função biológica.

A atividade antiviral observada para o rHuIFN- α 94 em células Vero e Wish, foi muito semelhante, sendo esta menor que a do HuIFN- α 2b, cerca de 1,2 vezes apenas. Da mesma maneira, a atividade antiviral observada em MDBK para este IFN controle, foi muito semelhante ao HuIFN- α 2b (FIG. 28). Portanto, as pequenas diferenças de títulos de atividade antiviral encontradas entre as células Wish, Vero e MDBK, permitem concluir que a alteração do D94 para A94, com a mudança de aminoácido de carga negativa, para um aminoácido de carga neutra, não interfere na interação deste IFN com o receptor

celular, assim como não altera a especificidade deste IFN. Vários trabalhos têm demonstrado a atividade antiviral dos subtipos de IFN- α humanos, em células bovinas, sendo confirmado também no nosso trabalho que, o subtipo HuIFN- α_{2b} , possui atividade nestas células. HU *et al.*, 1999, mostraram a semelhança da atividade antiviral específica, entre os HuIFN- α_{2c} e HuIFN- α_{21a} nas células MDBK e Wish. Entretanto, estes mesmos autores mostraram dois híbridos entre estes subtipos, denominados HY-1 (HuIFN- α_{21a} 1-75\HuIFN- α_{2c} 76-165) e HY-2 (HuIFN- α_{21a} 1-95\HuIFN- α_{2c} 96-165), os quais apresentaram uma atividade maior de 20 vezes e 30 vezes, respectivamente, em células MDBK, comparado com Wish. Estes dados sugerem que a porção C-terminal do HuIFN- α_{2c} é importante para a interação deste com o receptor celular, e esta região pode influenciar na espécie especificidade (células bovinas).

O HÍBRIDO rHuIFN- β 97 α .

A substituição das α -hélices **D** e **E** e alças **cd** e **de** do HuIFN- β pelas mesmas do HuIFN- α no híbrido rHuIFN- β 97 α , representada na FIGURA 8, acarretou numa diminuição da atividade antiviral de 10 vezes em células Vero e de 100 vezes em células Wish, comparada com a atividade do rHuIFN- β 97 (FIG. 28). A diminuição da atividade antiviral observada, nestas duas células, podem estar relacionadas as α -hélices e alças substituídas. A importância das α -hélices **D** e **E** e alça **de** na manutenção da atividade antiviral do HuIFN- β em células humanas e de macaco foi também demonstrado por CARVALHO (1998), através da construção do híbrido rHuIFN- β 107 α . Em seu trabalho, CARVALHO mostrou que a atividade antiviral deste híbrido em células Wish e Vero, foi reduzida em relação ao rHuIFN- β 107, mostrando a importância das α -hélices **D** e **E** e alça **de**, na atividade antiviral nestas células. Entretanto, a diferença deste híbrido construído por CARVALHO e do híbrido rHuIFN- β 97 α construído em nosso trabalho, foi na alça **cd**, compreendida entre os aminoácidos 97 a 107 (A, L, K, T, V, L, E, E, K, L e E) do rHuIFN- β . Portanto, a análise destes dados obtidos, em conjunto, permite sugerir também a participação desta alça **cd** na manutenção da atividade antiviral em células Wish e Vero.

Ainda em relação a este híbrido, a atividade antiviral observada em células bovinas MDBK, desafiadas com o vírus EMC, foi 1,6 vezes maior em relação a atividade do

rHuIFN- β 97 nestas mesmas células (FIG. 26). Entretanto essa diferença não é considerada significativa, em virtude da ocorrência de variações na titulação, que podem chegar a um fator de 2. Da mesma forma, em células MDBK, desafiadas com o BHV-1, a atividade antiviral deste híbrido foi semelhante ao do rHuIFN- β 97 (FIG. 27). Mas, se analisarmos o aumento da atividade deste híbrido em MDBK, comparada a sua atividade em células humanas Wish, que foi de 125 vezes (FIG. 28), e em células de macaco Vero, que foi de 20 vezes (FIG. 28), podemos sugerir que a adição da região C-terminal do HuFN- α_2 na molécula do HuIFN- β , parece ter sido responsável pelo aumento da atividade antiviral deste híbrido em células MDBK. Estes dados estão de pleno acordo com aqueles encontrados na literatura, assim como já demonstrado por HU *et al.*, 1999, a relação desta porção C-terminal do HuFN- α_2 , na atividade espécie específica, relacionada com células bovinas, do HuIFN- α_2 .

O HÍBRIDO rHuIFN- α 44 β 106 α

A substituição das α -hélices **B** e **C** e alças **bc** e **de** do HuIFN- α pelas mesmas do HuIFN- β no híbrido rHuIFN- α 44 β 106 α , representada na FIGURA 8, influenciou na atividade antiviral desencadeada pelos IFN em células humanas e de macaco. A atividade antiviral deste híbrido em células Vero foi 250 vezes menor do que aquela observada para o IFN padrão HuIFN- α_{2b} e em células Wish, foi 166 vezes menor (FIG. 28). Estes dados encontrados nos permitem fazer algumas sugestões a respeito destas estruturas, na participação da atividade biológica dos IFN, quando comparamos com os dados obtidos por CARVALHO, (1998), com o híbrido rHuIFN- β 46 α . Este híbrido apresentou baixa atividade específica nas duas células testadas (Wish e Vero), comparado ao híbrido rHuIFN- α 45 β , que apresentou uma diferença de dois log maior na atividade antiviral, nestas mesmas células. Sendo assim, a análise dos dados obtidos por CARVALHO, somado aos dados obtidos em nosso trabalho, nos permite sugerir a importância das α -hélices **B** e **C** e alças **bc** e **de** do HuIFN- α , na manutenção da atividade antiviral em células humanas e de macaco, e ainda, sugerir que as α -hélices **D** e **E** e alça **de** do HuIFN- α , não são de extrema importância para esta atividade, uma vez que estas estruturas foram acrescentadas na região C-terminal do híbrido rHuIFN- α 44 β 106 α , e mesmo assim, a atividade antiviral não foi aumentada.

Ainda os resultados de atividade antiviral apresentados pelo rHuIFN- α 44 β 106 α em células MDBK, sugere o envolvimento da região C-terminal do HuIFN- α na interação com o receptor celular e espécie especificidade, em células bovinas. A baixa atividade antiviral apresentada por este híbrido em células Vero e Wish (FIG. 24 e 25), foi diferente daquela apresentada por este híbrido em células MDBK (FIG. 26), quando desafiadas com EMC. A diferença observada foi de 125 vezes maior que a atividade em Vero e em Wish (FIG. 28). Ainda para este mesmo híbrido, a atividade antiviral apresentada em MDBK (FIG. 27), desafiadas com BHV-1, foi 25 vezes maior (FIG. 28). A manutenção da região C-terminal do HuIFN- α_2 , na molécula híbrida (aa 106-165), provavelmente foi responsável pelo aumento da atividade antiviral deste híbrido em células MDBK. Estes dados, portanto, reforçam a importância da região C-terminal do HuIFN- α_{2b} , na especificidade de interação desta molécula com os receptores celulares bovinos, como já demonstrado por HU *et al.*, 1999, em relação do HuIFN- α_{2c} . Entretanto, não só esta região C-terminal está envolvida na especificidade dos HuIFN- α , em células bovinas. CARVALHO, (1998), mostrou uma perda total da atividade antiviral do híbrido rHuIFN- β 46 α em MDBK e ainda uma atividade antiviral significativa do rHuIFN- α 45 β , nestas mesmas células. Estes dados portanto, nos permite sugerir que além da participação das α -hélices **D** e **E** e alça **de** do HuIFN- α , na manutenção da atividade antiviral em células bovinas, observada pela adição destas estruturas na molécula do rHuIFN- α 44 β 106 α , a região N-terminal, mais precisamente a α -hélice **A** e alça **ab**, deste IFN, também é de extrema importância para a atividade antiviral dos HuIFN- α , em células MDBK.

A atividade antiviral dos IFN tipo I (HuIFN- α_{2b} , HuIFN- α_1 e HuIFN- β) é diferente em células humanas, bovinas e murinas. Vários estudos têm sido feitos, para tentar mapear as regiões que podem estar relacionadas à capacidade destes IFN em desencadear uma alta atividade antiviral em um tipo celular e não em outro. Os HuIFN- α_2 e HuIFN- β , mostram maior atividade em células bovinas e humanas, enquanto que o HuIFN- α_1 mostra maior atividade em células humanas e alguma atividade em células murinas (STEWART *et al.*, 1980).

A construção de híbridos entre os HuIFN- α_{2b} e HuIFN- β e os testes de atividade antiviral feitos em células murinas L-929, em nosso trabalho, nos permite sugerir que os domínios

protéicos relacionados com a atividade antiviral destes IFN em células murinas, não está relacionada as α -hélices **D** e **E** e alças **cd** e **de** do HuIFN- α_{2b} , uma vez que substituímos estas estruturas do HuIFN- β , pelas mesmas do HuIFN- α_{2b} , e mesmo assim a atividade antiviral em L-929 não foi observada.

É claro que estes dados não são conclusivos, uma vez que, seria necessário um estudo mais detalhado da participação de cada região dos HuIFN- α e HuIFN- β , nas atividades biológicas destas citocinas. Mas, com certeza, eles são importantes para demonstrar que é possível alterar partes inteiras (α -hélices e alças) destas moléculas, mantendo a estrutura conformacional e a interação destas com seus receptores celulares, ainda que as alterações possam levar a uma diferente sinalização intracitoplasmática, levando a uma diminuição nas respostas celulares envolvidadas com estas proteínas.

6.4 - NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL

A total neutralização da atividade antiviral do rHuIFN- α_{94} pelo anticorpo antiHuIFN- α mostra que a substituição do D94 por A94 não alterou a localização do epítipo ou epítopos reconhecidos por estes anticorpos policlonais, já descritos (FIG. 29). A neutralização parcial da atividade antiviral dos rHuIFN- $\beta_{97\alpha}$ (FIG. 29), pelo anticorpo antiHuIFN- α , já era esperada, uma vez que a maioria dos epítopos imunodominantes dos HuIFN- α , como demonstrado por diversos estudos, estão localizados em três regiões hidrofílicas, α -hélice **A**, a alça **ab** e a alça **cd** e α -hélice **D/E** (HORISBERGER e DIMARCO, 1995; KONTSEK, 1994).

Muitos estudos com os diferentes subtipos de IFN- α têm sido feitos, no intuito de localizar nestas citocinas, regiões relacionadas com as propriedades antigênicas. SHMEISSER *et al.*, (2002), construíram uma série de híbridos entre os sub-tipos de rHuIFN- α_{2c} e rHuIFN- α_{21a} e testaram com estes híbridos, um painel de 27 anticorpos monoclonais (anti-IFN- α_1 , anti-IFN- α_2 e anti-IFN- $\alpha_{8/1/8}$). Neste estudo os autores mostraram que os sub-tipos HuIFN- α_{2c} e HuIFN- α_{21a} são antigenicamente distintos, confirmando os dados encontrados na literatura, que mostram que os sub-tipos de HuIFN- α possuem propriedades antigênicas diferentes (ZOON *et al.*, 1992). Neste trabalho foram identificadas também algumas

regiões imunodominantes destes IFN, dentre elas, a alça **bc**, resíduos de 76-95, α -hélice **C** e **D** (SHMEISSER *et al.*, 2002).

Poucos estudos de localização de epitopos foram realizados com o HuIFN- β . Mais recentemente, RUNKEL *et al.*, (2000), construíram uma série de mutantes de HuIFN- β , substituindo uma série de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica deste IFN, por Alaninas (A). Estas mutações de ponto serviram para estudar a importância de cada região da molécula, nas diversas atividades biológicas do HuIFN- β , como atividade antiviral e antiproliferativa, como também, estudar a interação deste IFN com seus receptores celulares e fazer um possível mapeamento das regiões envolvidas na imonogenicidade. Neste trabalho, foram determinadas as regiões compreendendo as alças **ab** e **cd** e α -hélices **B**, **C** e **D**, como regiões importantes nas propriedades antigênicas, sendo reconhecidas por alguns anticorpos monoclonais testados. Estes dados obtidos confirmaram aqueles descritos por REDLICH *et al.*, (1991), que também determinaram como regiões importantes envolvidas nas propriedades imonológicas do HuIFN- β , a alça **ab** e parte N-terminal da α -hélice **B**.

A pequena neutralização da atividade antiviral dos rHuIFN- β e HuIFN- β 97 (FIG 29), pelo anticorpo policlonal anti-IFN- α , pode ser sugestivo de uma reação cruzada entre os IFN tipo I. Para melhor determinação dos sítios imunogênicos e da existência de possíveis regiões com propriedades antigênicas comuns entre os IFN- α/β , seria necessário a utilização de vários anticorpos monoclonais ou policlonais, utilizando os híbridos de IFN- α e - β , com mutações em várias regiões da molécula.

6.5 – GENES INDUZIDOS PELOS INTERFERONS RECOMBINANTES E HÍBRIDOS

Os IFN ativam cascatas de sinalização que culminam com a expressão de genes, que são responsáveis pelos seus diversos efeitos biológicos. A via de sinalização celular JAK/STAT desencadeada, vai culminar com a transcrição de vários destes genes, cujos produtos protéicos desempenham papéis importantes nas diversas atividades biológicas dos IFN. Dentre os principais genes mais descritos, alguns são intensivamente estudados e estão relacionados com a atividade antiviral, induzida pelos IFN. Tais atividades incluem

a síntese de proteínas quinases ativadas por RNA dupla fita (PKR), 2'5' Oligoadenilato sintetase (2'5' OAS), MxA e proteína que se liga a guanilato (GBP) (BRIERLEY & FISH, 2002).

Os interferons tipo I (IFN- α e IFN- β) e o interferon tipo II, desencadeiam diferentes respostas de indução de genes. O gene 6-16, ISG 15 e ISG 54 são altamente indutíveis pelos IFN- α e IFN- β e não pelo IFN- γ . O complexo principal de histocompatibilidade classe II e alguns genes específicos de macrófagos são induzidos preferencialmente pelo IFN- γ , enquanto que os genes 2'5' OAS, 1-8 e MHC classe I são induzidos pelos IFN- α , IFN- β e IFN- γ (REID *et al.*, 1989). RANI *et al.*, (1996), descreveram um gene denominado beta-R1 que é seletivamente induzido pelo HuIFN- β . Foram necessárias quantidades 250 vezes maiores do HuIFN- α para induzir quantidades semelhantes de mRNA do gene beta-R1 induzidas pelo HuIFN- β . O estudo do mecanismo de indução do gene beta-R1 em células de fibrosarcoma mutantes deficientes em diversos componentes necessários para a transdução do sinal dos IFN tipo I, demonstrou que a expressão deste gene requer o complexo ISGF3 e um componente adicional, que é mais eficientemente formado pela indução com o HuIFN- β (RANI *et al.*, 1996). Além disso, recentemente, LEAMAN *et al.* (2003), descreveram vários genes como sendo induzidos por HuIFN- β , mas não por HuIFN- α , em alguns tipos de melanomas, e vários destes genes foram relacionados a funções regulatórias do crescimento celular.

Os genes indutíveis por IFN tipo I já são detectados em células, após uma hora de tratamento. A observação da acumulação de mRNA de genes induzidos pelos IFN recombinantes e híbridos construídos, foi observada em células Wish e L-929, após 18 horas de indução (FIGURAS 30 a 32). Todos os interferons testados, foram capazes de promover o acúmulo do mRNA dos genes MxA, 6-16 e 2'5'OAS. As células Wish não tratadas pelos IFN, apresentaram um nível basal de acumulação dos mRNA dos genes 2'5' OAS, 6-16 e MxA (FIG. 30 a 32). Entretanto, a produção de níveis basais destes mRNA sempre são observados em outros trabalhos.

O acúmulo do mRNA dos genes 2'5' OAS e MxA foi maior em células tratadas com os IFN recombinantes rHuIFN- β e rHuIFN- β 97, quando comparado ao acúmulo de mRNA de células tratadas com os IFN híbridos (rHuIFN- β 97 α e rHuIFN- α 44 β 106 α), assim como de

células tratada com o IFN controle rHuIFN- α 94 e com o IFN padrão HuIFN α_2 . Essa diferença encontrada nos níveis de acumulação dos mRNA pode ser vista, como relacionada ao desencadeamento de atividade antiviral pelas células, uma vez que os IFN recombinantes rHuIFN- β e rHuIFN- β 97, também apresentaram significativa atividade antiviral em células Wish (TABELA 2). Entretanto, somente estes resultados não são suficientes para relacionar estes genes apenas com a atividade antiviral, já que o IFN recombinante rHuIFN- α 94, apresentou maior atividade antiviral em células Wish e um menor acúmulo de mRNA dos genes 2'5'OAS e MxA, comparado com os rHuIFN- β e rHuIFN- β 97. Estas variações nos níveis de acúmulo de mRNA podem também ter sido causadas pelas variações no método de titulação (FERREIRA *et al.*, 1979), o que conseqüentemente acarretou em quantidades diferentes (U/ml) de IFN, no tratamento das células. Apesar das enzimas 2'5'OAS e MxA estarem relacionadas à atividade antiviral contra diversos vírus e também à atividade antiproliferativa (STARK *et al.*, 1998), não foi demonstrado haver uma forte correlação entre a atividade antiviral do rHuIFN- α 94 e os níveis de indução da 2'5' OAS e MxA. Na verdade, além destes sistemas, sabe-se que os IFN inibem a multiplicação viral através da indução de inúmeras outras proteínas conhecidas e outras ainda desconhecidas (STARK *et al.*, 1998). Assim, os IFN são responsáveis pela indução de diversas proteínas que em conjunto são responsáveis pelo estado antiviral.

Em células L-929, não foram observados acúmulo de mRNA do gene GBP, quando estas foram tratadas com os IFN recombinantes e híbridos. O acúmulo de mRNA deste gene só foi observado nas células tratadas com o HuIFN $\alpha_2\alpha_1$ (FIG. 32). Estes dados no entanto, evidenciam os resultados obtidos de atividade antiviral nestas células, uma vez que também nenhum dos IFN recombinantes e híbridos testados, apresentaram atividade antiviral detectável em L-929, ao contrário do HuIFN $\alpha_2\alpha_1$. A indução deste gene pelos IFN poderia ter sido observada também em células Wish, para melhor complementação destes dados. Portanto, este resultado precisa ser melhor avaliado, para de fato relacionar a atividade desta enzima com a atividade antiviral e também da interação dos IFN construídos com seus receptores celulares, uma vez que estes não apresentaram atividade antiviral e nem indução de genes nestas células.

6.6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Este estudo trouxe algumas contribuições para um melhor entendimento da estrutura e função dos IFN humanos tipo I (HuIFN- α_2 e HuIFN- β), como também levantou várias outras questões referentes à estas moléculas, o que abre perspectivas para futuros estudos relacionados com estas citocinas.

Em nosso trabalho, foi possível mapear algumas das regiões importantes na atividade biológica dos HuIFN- α_2 e HuIFN- β , abrindo várias perspectivas para o uso destes recombinantes e híbridos, no tratamento de várias doenças. Entretanto, um estudo minucioso do uso destas proteínas recombinantes “*in vivo*”, deve ser feito, para avaliar os possíveis efeitos colaterais desencadeados com o uso prolongado e em altas doses, destas citocinas. Além disso, como em nosso trabalho só foram observadas atividades biológicas destas proteínas, quando adicionado o tampão de amostra, testes de toxicidade das substâncias contidas no tampão devem ser feitos. Uma menor diluição deste reagente, poderia também ser avaliada, para tentar minimizar a quantidade utilizada.

Experimentos com estas proteínas recombinantes “*in vivo*”, podem ser dispendiosos e difíceis. A utilização de animais como o boi, poderia ser interessante, entretanto, seria um trabalho caro e pouco provável de ser feito. Mas, a facilidade da realização destes testes em camundongos abre possibilidades da obtenção dos testes “*in vivo*”. Porém, como os híbridos construídos em nosso trabalho não apresentaram atividade em células murinas, o que não significa que não possuem nenhuma atividade em camundongo, estes testes deveriam ser feitos, para no caso de realmente não apresentarem nenhuma atividades nestes animais, outras proteínas recombinantes sejam construídas. Como já mostrado anteriormente, os diferentes subtipos de HuIFN- α apresentam atividade biológica diversificada em células humanas, murinas e bovinas. Portanto, o mapeamento da região importante na atividade destes IFN em células murinas, pode ser de grande interesse, para estudos futuros, relacionados com os híbridos.

Outros testes, objetivando o mapeamento da localização dos epitopos reconhecidos por anticorpos monoclonais e policlonais (anti- α e anti- β), nas moléculas dos IFN recombinantes e híbridos construídos devem ser feitos. Em nosso trabalho, utilizamos

somente o anticorpo policlonal anti- α , o que não foi suficiente para a localização exata destes epitopos, mas permitiram comprovar dados já descritos na literatura mostrando que a maioria dos epitopos imunodominantes dos HuIFN- α , estão localizados em três regiões hidrofílicas, α -hélice **A**, a alça **ab** e a alça **cd** e α -hélice **D/E**.

Além da atividade antiviral, a atividade antiproliferativa relacionada aos híbridos deve ser avaliada. Estes testes podem ser feitos "*in vitro*", utilizando células linfoblastóides (DAUDI), nas quais estes IFN possuem atividade antiproliferativa, como já demonstrado na literatura.

Como previsto, este trabalho respondeu algumas questões referentes aos HuIFN- α_2 e HuIFN- β , entretanto também levantou várias hipóteses relacionadas ao uso destas proteínas recombinantes, como possíveis agentes terapêuticos. Além disso, algumas questões relacionadas às atividades biológicas desencadeadas por estas proteínas híbridas, precisam ainda ser avaliadas e respondidas.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOVITCH, C.; SHULMAN, L.; RATOVISK, E.; HARROCH, S.; TOVEY, M.; EID, P.R. Differential tyrosine phosphorylation of the IFNAR chain of the type I interferon receptor and of an associated surface protein in response to IFN-alpha and IFN-beta. *EMBO J.* v.13, p. 5871-5877, 1995.

ADEREM A; ULEVITCH R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nat.* v. 406(6797), p. 782-787, 2000.

ADOLF, G. R. Antigenic structure of human interferon w1 (interferon α II): comparison with other human interferons. *J. Gen. Virol.* v. 68, p.1669-1676, 1987.

ADOLF, G. R.; FRÜHBEIS, B.; HAUPTMANN, R.; KALSNER, I.; MAURER-FOGY, I.; OSTERMANN, E.; PATZELT, E.; SCHWENDENWEIN, R.; SOMMERGRUBER, W.; SÖPHEL, A. Human interferon w1: isolation of the gene, expression in chinese hamster ovary cells and characterization of the recombinant protein. *Biochem. Biophys. Acta.* v. 1089, p. 167-174, 1991.

AKIRA S.; TAKEDA K.; KAISHO T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* v. 8, p. 675-680, 2001.

ARDUINI R.M.; STRAUCH K.L.; RUNKEL L.A.; CARLSON M.M.; HRONOWSKI X.; FOLEY S.F.; YOUNG C.N.; CHENG W.; HOCHMAN P.S.; BAKER D.P. Characterization of a soluble ternary complex formed between human interferon-beta-1a and its receptor chains. *Protein Sci.* v. 8(9), p. 1867-1877, 1999.

ARNHEITER H.; FRESE M.; KAMBADUR R.; MEIER E.; HALLER O. Mx transgenic mice--animal models of health. *Curr Top Microb. Immunol.* v. 206, p. 119-47, 1996.

BARRECA, C. & O'HARE, P. Suppression of Herpes Simplex Virus 1 in MDBK cells via the interferon pathway. *J. Virol.* v. 78 (16), p. 8641-8653, 2004.

BAZAN, J. F. Shared architecture of hormone binding domains in type I and II interferon receptors. *Cell.* v. 61, p. 753-754, 1990.

BRANCA, A. A.; BAGLIONI, C. Evidence that types I and II interferons have different receptors. *Nat.* v. 294, p. 459-461, 1981.

BRIERLEY, M.M. AND FISH, E.N. IFN α/β receptor interactions to biologic outcomes: understanding the circuitry. *J. IFN Cytok. Res.* v.22, p. 835-845, 2002.

BRITO, K. S. Relação entre estrutura e função do interferon humano beta: Papel da α -hélice E. Belo Horizonte, UFMG, Tese de Mestrado, 2000.

BUJARD, H.; GENTZ, R.; LANZER, M.; STUBER, D.; MULLER, M.; IBRAHIMI, I.; HAUPTLE, M.T.; DOBBERSTEIN, B. A T5 promoter based transcription. Translation system for analysis of protein in vitro and in vivo. *Meth. Enzymol.* v.155, p.416-433, 1987.

CAJEAN-FEROLDI, C.; NOSAL, F.; NARDEUX, P.C.; GALLET, X.; GUYMARHO, J.; BAYCHELIER, F.; SEMPE, P.; TOVEY, M.G.; ESCARY, J.L.; EID, P. Identification of residues of the IFNAR1 chain of the type I human interferon receptor critical for ligand binding and biological activity. *Biochem.* v.39, p.12498-12512, 2004.

CARVALHO, A. F. Interferons humanos recombinantes e híbridos β e α_{2b} : Relação entre estrutura e função. Belo Horizonte. UFMG, Tese de Doutorado, 1998.

CLEARY, C.M.; DONNELLY, R.J.; SOH, J.; MARIANO, T.M.; PESTKA, S. Knockout and reconstitution of a functional human type I interferon receptor complex. *J. Biol. Chem.* v. 269, p. 18747-18749, 1994.

CHOMCZYNSKI, I.; SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* v.162, p.156-159, 1987.

CHURCH, G.M.; GILBERT, W. Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v.81, p.1991-1995, 1984.

COCCIA E. M.; SEVERA M.; GIACOMINI E.; MONNERON D.; REMOLI M. E.; JULKUNEN I.; CELLA M.; LANDE R.; UZE G. Viral infection and Toll-like receptor

agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol.* v. 34, p. 796-805, 2004.

COHEN, B.; NOVICK, D.; BARAK, S.; RUBINSTEIN, M. Ligand-induced association of the type I interferon receptor components. *Moll. Cell. Biol.* v. 15, p 4208-4214, 1995.

CONKLIN D.C.; GRANT F.J.; RIXON M.W.; KINDSVOGEL W. Interferon- ϵ U.S> PATENT 6329175, 2002.

COOK, J. R.; CLEARY, C. M.; MARIANO, T. M.; IZOTOVA, L.; PESTKA, S. Differential Responsiveness of a Splice Variant of the Human Type I Interferon Receptor to Interferons. *J. Biol. Chem.* v. 271, p. 13448-13453, 1996.

CROSS, J.C.; ROBERTS, R.M. Constitutive and trophoblastic-specific expression of a class of bovine interferon genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v. 88; p. 3817, 1991.

CUTRONE, E. C.; LANGER, J. A. Contributions of cloned type I interferon receptor subunits to differential ligand binding. *FEBS Lett.* v. 404 (2-3), p 197-202, 1997.

DAVID M. Transcription factors in interferon signaling. *Pharmacol. Ther.* v. 65(2), p.149-61, 1995.

DIAZ M.O.; BOHLANDER S.; ALLEN G. Nomenclature of the human interferon genes. *J. IFN. Cytok. Res.* v. 13, p. 61-62, 1993.

DIJKMANS R.; VANDENBROECK K.; BEUKEN E.; BILLIAU A. Sequence of the porcine interferon-gamma (IFN-gamma) gene. *Nucleic Acids Res.* v. 18(14), p. 4259, 1990.

DOMANSKY, P.; COLAMONICI, O. R. The type-I interferon receptor. The long and short of it. *Cytok. Growth factors rev.* v. 7, p. 143-151, 1996.

DOMANSKY, P.; WITTE, M.; KELLUM, M. Cloning and expression of a long form of the b subunit of the interferon a receptor that is required for the interferon signaling. *J. Biol. Chem.* v. 270, p. 21606-21611, 1995.

DUBE, S. & FLYNN, E. Estimating protein molecular weight using SDS-PAGE. *FOCUS*, v. 20, p. 24-25, 1998.

DUMOUTIER, L.; TOUNSI, A.; MICHIELS, T.; SOMMEREYNS, C.; KOTENKO, S.V.; RENAULD, J. C. Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/Interferon- λ 1. *J. Biol. Chem.* v. 279 (31), p.32269-32274, 2004.

FEARON, DT. Seeking wisdom in innate immunity. *Nat.* v. 388(6640), p. 323-324, 1997.

FERREIRA, P.C.P.; PEIXOTO, M.L.P.; SILVA, M.N.; GOLGHER, R.R. Assay of human interferons in Vero Cells by several methods. *J. Clinn. Microbiol.* v. 9; p. 471-475,1979.

FIDLER I.J.; HEICAPPELL R.; SAIKI I.; GRUTTER M.G.; HORISBERGER M.A.; NUESCH J. Direct antiproliferative effects of recombinant human interferon-alpha B/D hybrids on human tumor cell lines. *Cancer Res.* v. 47(8), p. 2020-7, 1987.

FITZGERALD K. A.; ROWE D. C.; BARNES B. J.; CAFFREY D. R.; VISINTIN A.; LATZ E.; MONKS B.; PITHA P. M.; GOLENBOCK D. T. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J. Exp. Med.* v. 198, p. 1043-1055, 2003.

FITZGERALD K. A.; MCWHIRTER S. M.; FAIA K. L.; ROWE D. C.; LATZ E.; GOLENBOCK D. T.; COYLE A. J.; LIAO S. L.; MANIATIS T. IKKe and TBK1 are essential components of the IRF-3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* v. 4(5), p.491-6, 2003.

FLORES, I.; MARIANO, T. M.; PESTKA, S. Hufman interferon omega binds to the a/b receptor. *J. Biol. Chem.* v. 266, p. 19875-19877, 1991.

FRESENIUS, C. S.; MEYER, T.; WASCHUTZA, G.; OTTO, B. Hydrophobic engineering of human interferon- β . *J. IFN and Cytok. Res.* v. 17, p. S110, 1997.

HAQUE S.J.; WILLIAMS B.R. Signal transduction in the interferon system. *Semin Oncol.* v. 25(1 Suppl 1), p. 14-22, 1998.

HAYASHI F.; SMITH K.D.; OZINSKY A.; HAWN T.R.; YI E.C.; GOODLETT D.R.; ENG J.K.; AKIRA S.; UNDERHILL D.M.; ADEREM A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nat.* v. 410 (6832), p. 1099-1103, 2001.

HEMMI H.; TAKEUCHI O.; KAWAI T.; KAISHO T.; SATO S.; SANJO H.; MATSUMOTO M.; HOSHINO K.; WAGNER H.; TAKEDA K.; AKIRA S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nat.* v. 408(6813), p. 740-745, 2000.

HEMMI H.; KAISHO T.; TAKEUCHI O.; SATO S.; SANJO H.; HOSHINO K.; HORIUCHI T.; TOMIZAWA H.; TAKEDA K.; AKIRA S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* v. 3(2), p. 196-200, 2002.

HISCOTT J.; CANTELL K.; WEISSMANN C. Differential expression of human interferon genes. *Nucleic Acids Res.* v. 12(9), p. 3727-46, 1984.

HORISBERGER M.A. & DI MARCO S. Interferon-alpha hybrids. *Pharmacol Ther.* v. 66(3), p. 507-34, 1995.

HU, R.; BEKISZ, J.; SCHMEISSER, H.; McPHIE, P.; ZOON, K.C. Human interferon- α protein engineering: the amino acid residues at position 86 and 90 are important for antiproliferative activity. *J. Immunol.* v.167, p. 1482-1488, 2001.

HU, R.; BEKISZ, J.; HAYES, M.; AUDET, S.; BEETER, J.; PETRICOIN, E.; ZOON, K. Divergence of binding, signaling and biological responses to recombinant human hybrid IFN. *J. Immunol.* v. 163, p. 854-860, 1999.

IJZERMANS, J. M. N.; MARQUET, R. L. Interferon gamma: a review. *Immunobiol.* v.179, p. 456-473, 1989.

IMAKAWA, K.; ANTHONY, R. V.; KAZEMI, M.; MAROTTI, H.; POLITES, H. G.; ROBERTS, R. M. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm. *Nat.* v. 330, p. 377-379, 1987.

IMLER J.L.; HOFFMANN J.A. Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol.* v. 11(7), p. 304-11, 2001.

INNIS, M. A.; GELFANO, D. H. Optimization of PCRs. in: M. A. INNIS, D. H. GELFANO, J. J. SNISNSKY, T. J. WHITE (ed.). PCR Protocols: A guide to methods and applications. New York: *Academic Press.* p. 3-12, 1990.

ISAACS, A. & LINDENMANN, J. Virus interference: the interferon. *Proc. Roy. Soc. London Ser.B.* v.147, p.258-267, 1957.

JOKLIK, W.K. Interferons. In: FIELDS, B.N., KNIPE, D.M. (Ed.). *Virology.*, 2^a Ed. - New York, Raven Press Ltd. cap. 16, p. 383-410, 1990.

JONASCH E.; HALUSKA F. G. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist.* v. 6, n.1, p.34-55, 2001.

KADOWAKI N.; HO S.; ANTONENKO S.; MALEFYT R.W.; KASTELEIN R.A.; BAZAN F.; LIU Y.J. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* v. 194(6), p. 863-869, 2001.

KAGAWA, Y.; TAKASAKIS, S.; UTSUMI, J.; HOSOI, K.; SHIMIZU, H.; KOCHIB, N.; KOBATA, A. Comparative study of the asparagin linked sugar chains of natural human interferon beta1 and recombinant human interferon beta, produced by three different mammalian cells. *J. Biol. Chem.* v. 263; p. 17508-17513, 1988.

KARPUSAS, M.; NOLTE, M.; BENTON, C. B.; MEIER, W.; LIPSCOMB, W. N.; GOELZ, S. The crystal structure of human interferon β at 2.2 Å resolution. *Proc. Acad. Sci., USA.* v. 94, p. 11813-11818, 1997.

KARPUSAS, M.; WHITTY, A.; RUNKEL, L.; HOCHMAN, T. The structure of human interferon- β : implications for activity. *Cell. Mol. Life Sci.* v. 54, p.1203-1216, 1998.

KAWAI T.; TAKEUCHI O.; FUJITA T.; INOUE J.; MUHLRADT P.F.; SATO S.; HOSHINO K.; AKIRA S. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol.* v. 167(10), p. 5887-5894, 2001.

KLAUS, W.; GSELL, B.; LABHARDT, A. M.; WIPF, B.; SENN, H. The three-dimensional high resolution structure of human interferon α -2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution. *J. Mol. Biol.* v. 274, p. 661-675, 1997.

KONTSEK, P. Human type I Interferons: Structure and function. *Acta Virol.*, v. 38, p. 345-360, 1994.

KOTENKO, S. V.; GALLAGHER, G.; BAURIN, V. V.; LEWIS-ANTES, A.; SHEN, M.; SHAH, N. K.; LANGER, J. A.; SHEIKH, F.; DICKENSHEETS, H.; DONNELLY, R. P. IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. immunol.* v.4, p.69-77, 2003.

KRAUS J.; BORNER C.; HOLLT V. Distinct palindromic extensions of the 5'-TTC...GAA-3' motif allow STAT6 binding in vivo. *FASEB J.* v. 17(2), p. 304-306, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat.* v. 227, p. 680-685, 1970.

KURLAND, C. & GALLANT, J. Errors of heterologous protein expression. *Cur. Opin. Biotechnol.* v. 7, p. 489-493, 1996.

LAFLEUR, D. W., B. NARDELLI, T. TSAREVA, D. MATHER, P. FENG, M. SEMENUK, K. TAYLOR, M. BUERGIN, D. CHINCHILLA, V. ROSHKE, G. CHEN, S. M. RUBEN, P. M.

PITHA, T. A. COLEMAN, AND P. A. MOORE. Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* v. 276, p. 39765-39771, 2001.

LEAMAN D. W.; CHAWLA-SARKARM. Novel growth and death related interferon-stimulated genes (ISGs) in melanoma: greater potency of IFN-beta compared with IFN-alpha2. *J IFN Cytok. Res.* v. 23, n.12, p.745-56, 2003.

LEVY D. E.; MARIE I.; SMITH E.; PRAKASH A. Enhancement and diversification of IFN induction by IRF-7-mediated positive feedback. *J. IFN Cytok. Res.* v. 22, p. 87-93. 2002.

LI, J.; ROBERTS, R. M. Interferon- τ and interferon- α interact with the same receptors in bovine endometrium. Use of a readily iodinated form of recombinant interferon- τ for binding studies. *J. Biol. Chem.* v. 269, p. 13544-13550, 1994.

LUTFALLA, G.; HOLLAND, S. J.; CINATO, E. Mutant U5A cells are complemented by an interferon $\alpha\beta$ receptor subunit generated by alternative processing a new member of a cytokine gene cluster. *EMBO J.* v. 14, p. 51000-51008, 1995.

MATSUMOTO M.; KIKKAWA S.; KOHASE M.; MIYAKE K.; , SEYA T. Establishment of a monoclonal antibody against human toll-like receptor 3 that blocks double-stranded rna-mediated signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 293(5), p. 1364-1369, 2002.

McINNES C.J. Current research on ovine cytokines. *Br. Vet J.* v. 149(4), p. 371-86, 1993.

MEDZHITOV R.; PRESTON-HURLBURT P.; JANEWAY CA J.R. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nat.* v. 388(6640), p. 394-397, 1997.

MEISTER A.; UZE G.; MOGENSEN K.E.; GRESSER I.; TOVEY M.G.; GRUTTER M.; MEYER F. Biological activities and receptor binding of two human recombinant interferons and their hybrids. *J Gen Virol.* v. 67, p. 1633-43, 1986.

MIERTUS S.; TOMASI J.; MAZZANTI G.; CHIellini E.E.; SOLARO R.; CHIellini E. Modelling of the 3-D structure of IFN-alpha-k and characterization of its surface molecular properties. *Int J Biol Macromol.* v. 20(2), p. 85-95, 1997.

MITSUI, Y.; SENDA, T.; SHIMAZU, T.; MATSUDA, S.; UTSUMI, J. Structural functional and evolutionary implications of the three-dimensional crystal structure of murine interferon-b. *Pharmac. Ther.* v. 58, p. 93-132, 1993.

MIZOGUCHI J.; PITHA P.M.; RAJ N.B. Efficient expression in Escherichia coli of two species of human interferon-alpha and their hybrid molecules. *DNA.* v. 4(3), p. 221-32, 1985.

MOGENSEN, K.E.; LEWERENZ, M.; REBOUL, J.; LUTFALLA, G.; UZÉ, G. The Type I Interferon Receptor: Structure, Function, and Evolution of a Family Business. *J. IFN Cytok. Res.* v. 19, p. 1069-1098, 1999.

MURGOLO, N. J.; WINDSOR, W. T.; HRUZA, A.; REICHERT, P.; TSARBOPOULOS, A.; BALDWIN, S.; HUANG, E.; PRAMANIK, B.; EALICK, S.; TROTTA, P. P. A homology model of human interferon alpha-2. *Proteins.* v. 17, p. 62-74, 1993.

NAGATA S.; TAIRA H.; HALL A.; JOHNSRUD L.; STREULI M.; ECSODI J.; BOLL W.; CANTELL K.; WEISSMANN C. Synthesis in E. coli of a polypeptide with human leukocyte interferon activity. *Nat.* v. 284(5754), p. 316-20, 1980.

NOVICK, D.; COHEN, B.; RUBINSTEIN, M. Soluble interferon- α receptor molecules are present in body fluids. *FEBS*, v. 314, p. 445-448, 1992.

NOVICK, D.; COHEN, B.; RUBINSTEIN, M. The human interferon α/β receptor: characterization and molecular cloning. *Cell.* v. 77, p. 391-400, 1994.

NYMAN T.A.; KALKKINEN N.; TOLO H.; HELIN J. Structural characterisation of N-linked and O-linked oligosaccharides derived from interferon-alpha2b and interferon-alpha14c

produced by Sendai-virus-induced human peripheral blood leukocytes. *Eur. J. Biochem.* v. 253(2), p. 485-493, 1998.

OHNO, S.; TANIGUCHI, T. Structure of a chromosomal gene for human interferon β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v.78,p. 5305-5309, 1981.

ORITANI K.; KINCADE P.W.; TOMIYAMA Y. Limitin: an interferon-like cytokine without myeloerythroid suppressive properties. *J. Mol. Med.* v. 79(4), p. 168-74, 2001.

OSHIUMI H.; MATSUMOTO M.; FUNAMI K.; AKAZAWA T.; SEYA T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol.* v. 2, p. 161-167, 2003.

OZES O.N.; REITER Z.; KLEIN S.; BLATT L.M.; TAYLOR M.W. A comparison of interferon-Con1 with natural recombinant interferons-alpha: antiviral, antiproliferative, and natural killer-inducing activities. *J. IFN Res.* v. 12(1), p.55-9, 1992.

PESTKA, S. The interferon receptors. *Semin. Oncol.* v. 24, (19), p. S9-18 S19-40, 1997.

PIEHLER, J.; SCHREIBER, G. Biophysical analysis of the interaction of human ifnr2 expressed in *E. Coli* with IFN- α 2. *J. Mol. Biol.* v. 289, p. 57-67, 1999.

PLATIS, D. & FOSTER, G.R. High yield expression, refolding and characterization of recombinant interferon α 2/ α 8 hybrids in *Escherichia coli*. *Prot. Expres. & Purif.* v. 31, p. 222-230, 2003.

PITT-RIVERS, R. & IMPIOMBATO, F. S. A. The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins. *J.Biochem.*, v. 109, p. 825-830, 1968.

RADHAKRISHNAN, R.; WALTER, L. J.; HRUZA, A.; REICHERT, P.; TROTTA, P. P.; NAGABHUSHAN, T. L.; WALTER, M. R. Zinc mediated dimer of human interferon α 2b revealed by X-ray crystallography. *Structure.* v. 4, p. 1453-1463, 1996.

RANI, M. R. S. F.; LEUNG, S.; LEAMAN, D.; STARK, G. R.; RANSOHOFF, R. M. Characterization of beta-R1, a gene that is selectively induced by interferon beta (IFN-beta) compared with IFN-alpha. *J. Biol. Chem.*, v. 271, p. 22878-22884, 1996.

REDLICH, P.N.; HOEPRICH, P.D.Jr.; COLBY, C.B.; GROSSBRG, S.E. Antibodies that neutralize human beta interferon biologic activity recognize a linear epitope: Analysis by synthetic peptide mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 88, p. 4040-4044, 1991.

REID, L. E.; BRASNETT, A. H.; GILBERT, C. S.; PORTER, A. C.; GEWERT, D. R.; STARK, G. R.; KERR, J. M. A single DNA response element can confer inducibility by both α and γ IFNs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 86, p. 840-844, 1989.

RIGBY P.W.; DIECKMANN M.; RHODES C.; BERG P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol.* v. 113(1), p. 237-251, 1977.

ROBERTS, R. M.; FARIN, C. E.; CROSS, J. C. Trophoblast proteins and maternal recognition of pregnancy. in: S. R. MILLIGAN (ed.). *Oxford reviews of reproductive biology.*, Oxford: Oxford Univ. Press. v. 12 , p. 147-180, 1990.

ROCK F. L.; HARDIMAN G.; TIMANS J. C.; KASTELEIN R. A.; BAZAN J. F. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 95, p. 588-593, 1998.

ROZWARSKI, D. A.; GRONENBORN, A. M.; CLORE, G. M.; BAZAN, J. F.; BOHM, A.; WLODAWER, A.; HATADA, M.; KARPLUS, P. A. Structural comparisons among the short-chain helical cytokines. *Structure.*,v. 2, p. 159-173, 1994.

RUNKEL, L.; DEDIOS, C.; KARPUSAS, M.; BETZENHAUSER, M.; MULDOWNNEY, C.; AFARI, M.; BENJAMIN, C, D.; MILLER, S.; HOCHMAN, P. S.; WHITTY, A. Systematic mutational mapping of sites on human interferon- β -1a that are important for receptor binding and functional activity. *Biochemistry.* v. 39, p. 2538-2551, 2000.

RUNKEL, L.; PFEFFER, L.; LEWERENZ, M.; MONNERON, D.; YANG, C.; MURTI, A.; PELLEGRINI, S.; GOELZ, S.; UZÉ, G.; MOGENSEN, K. Differences in Activity between α and β type I interferon explored by Mutational Analysis. *J. Biol. Chem.* v. 273 (14), p. 8003-8008, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.

SATO S.; NOMURA F.; KAWAI T.; TAKEUCHI O.; MUHLRADT P.F.; TAKEDA K.; AKIRA S. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J. Immunol.* v. 165(12), p. 7096-7101, 2000.

SCHMEISSER H.; HU R.; KONTSEK P.; BEKISZ J.; ZOON K. Amino acid substitutions in loop BC and helix C affect antigenic properties of helix D in hybrid IFN- α 21a/ α 2c molecules. *J IFN Cytok.Res.* v. 22(4), p. 463-472, 2002.

SENDA, T.; SHIMAZU, T.; MATSUDA, S.; KAWANO, G.; SHIMIZU, H.; NAKAMURA, K.T.; MITSUI, Y. Tree-dimensional crystal structure of recombinant murine interferon beta. *Embo J.* v. 11, p. 3193-3201(n.9), 1992.

SENDA, T., SAITOH, S.; MITSUI, Y. Refined crystal structure of recombinant murine interferon- β at 2.15Å resolution. *J.Mol. Biol.* v. 253, p. 187-207, 1995.

SHAFFERMAN A.; VELAN B.; COHEN S.; LEITNER M.; GROSFELD H. Specific residues within an amino-terminal domain of 35 residues of interferon alpha are responsible for recognition of the human interferon alpha cell receptor and for triggering biological effects. *J Biol Chem.* v. 262(13), p. 6227-37, 1987.

SHEPPARD P.; KINDSVOGEL W.; XU W.; HENDERSON K.; SCHLUTSMEYER S.; WHITMORE T. E.; KUESTNER R.; GARRIGUES U.; BIRKS C.; RORABACK J.; OSTRANDER C.; DONG D.; SHIN J.; PRESNELL S.; FOX B.; HALDEMAN B.; COOPER E.; TAFT D.; GILBERT T.; GRANT F. J.; TACKETT M.; KRIVAN W.; MCKNIGHT G.;

CLEGG C.; FOSTER D.; KLUCHER K. M. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol.* v. 4, p. 63-8, 2003.

SPRANG, S.; BAZAN, J. F. Cytoquine structural taxonomy and mechanisms of receptor engagement. *Curr. Opin. In Struc. Biol.* v. 3, p. 815-817, 1993.

STARK, G.R.; KERR, I.M.; WILLIAMS, B.R.; SILVERMAN, R.H.; SCHREIBNER, R.D. How cells respond to interferons. *Annu. Ver. Biochem.* v.67, p.227-264, 1998.

STEWART W.E.; SARKAR F.H.; TAIRA H.; HALL A.; NAGATA S.; WEISSMANN C. Comparisons of several biological and physicochemical properties of human leukocyte interferons produced by human leukocytes and by *E. coli*. *Gene.* v. 11(3-4), p. 181-6, 1980.

STREULI M.; HALL A.; BOLL W.; STEWART W.E.; NAGATA S.; WEISSMANN C.; STREULI M.; HALL A.; BOLL W.; STEWART W.E.; NAGATA S.; WEISSMANN C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 78(5), p. 2848-52, 1981.

STÜBER, D.; MATILE, H.; GAROTTA, G. System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure function analysis. *Immunol. Methods.* v. IV, p. 121-152, 1990.

TANIGUCHI, T.; FUJI-KURIYAMA, Y.; MURAMATSU, M. Molecular cloning of human interferon cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*,v. 77, p. 4003-4006, 1980.

TUITE M.F.; DOBSON M.J.; ROBERTS N.A.; KING R.M.; BURKE D.C.; KINGSMAN S.M.; KINGSMAN A.J. Regulated high efficiency expression of human interferon-alpha in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* v. 1(5), p. 603-608, 1982.

TUNG, J.S. & KNIGHT, C. A. Relative importance of some factors affecting the electrophoretic migration of protein in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Analy. Biochem.* v. 48, p. 153-163, 1972.

UZÉ, G.; DIMARCO, S.; MOUCHEL-VIELH, E.; MONNERON, D.; BANDU, M.T.; HORISBERGER, M.A.; DORQUES A.; LUTFALLA, G.; MOGENSEN, K.E. Domains of interaction between alpha and its receptor components. *J. Mol. Biol.* v. 243; p. 245-257, 1994.

UZÉ, G.; LUTFALLA, G.; MOGENSEN, K. E. a and b interferons and their receptors and their friends and relations. *J. IFN and Cytok.Res.* v. 15, p. 3-26, 1995.

VILCEK, J., SEN, GC. Interferons and Others Citokines. In: Fields Virology. B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley *et al* eds (Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia), 1996.

VILCEK, J. Novel interferons. *Nat. Immunol.* v.4 (1), p.8-9, 2003.

WALTER, M. R.; NAGABHUSHAN, T. L. Cristal structure of interleukin 10 reveals an interferon like gamma-like fold. *Biochem.* v. 34, p. 12118-12125, 1995.

WALTER, M. R. Three-dimensional models of interferon- α subtypes IFN-con1, IFN- α_8 , and α_1 derived from the crystal structure of IFN- α_{2b} . *Seminars in Oncology.* v. 24, (9), p. S9-52-S9-62, 1997.

WEBER, H.; VALENZUELA, D.; LUJBER, G.; GUBLER, M.; WEISSMANN, C. Single amino acid changes that render human IFN- α_2 biologically active on mouse cells. *EMBO J.* v. 6, p. 591-598, 1987.

WECK P.K.; APPERSON S.; MAY L.; STEBBING N.; WECK P.; APPERSON S.; MAY L.; STEBBING N. *J Gen Virol.* v. 57, p. 233-237, 1981.

ZHOU H.R.; YAN D.; PESTKA J.J. Differential cytokine mRNA expression in mice after oral exposure to the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol): dose response and time course. *Toxicol Appl Pharmacol.* v. 144(2), p. 294-305, 1997.

ZOON, K. C.; BEKISZ, J.; MILLER, D. Human interferon alpha family: Protein structure and function. in: S. BARON (ed.). *Interferon, principles and medical applications*. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston, p. 130-138, 1992.

ZUCKER K.; LU P.; ESQUENAZI V.; MILLER J. Cloning of the cDNA for canine interferon-gamma. *J. Interferon Res.* v. 12(3), p. 191-194, 1992.