

Universidade Federal de Minas Gerais  
Programa Interunidades de Pós-graduação em Bioinformática

Renata Cristina Fleith

**CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE IFITS HUMANAS E SEU  
IMPACTO NA TRADUÇÃO CELULAR**

Belo Horizonte, 2018.

Renata Cristina Fleith

**CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE IFITS HUMANAS E SEU  
IMPACTO NA TRADUÇÃO CELULAR**

Tese apresentada ao Programa Interunidades de Pós-graduação em Bioinformática da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Bioinformática.

Orientador: Daniel Santos Mansur

Belo Horizonte, 2018.



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática da UFMG  
Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
31270-901 - Belo Horizonte – MG  
Endereço eletrônico: bioinfo@icb.ufmg.br 55 31 3409-2554



## "CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE IFITS HUMANAS E SEU IMPACTO NA TRADUÇÃO CELULAR"

**Renata Cristina Fleith**

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Daniel Santos Mansur - Orientador  
UFSC

Prof. Aristóbolo Mendes da Silva  
UFMG

Profa Daniella Castanheira Bartholomeu  
UFMG

Profa Patricia Torres Bozza  
Fiocruz/RJ

Prof. Juliano Bordignon  
Fiocruz/PR

Belo Horizonte, 14 de dezembro de 2018.

Às mulheres da Ciência.



## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer especialmente meu orientador, Prof. Daniel Mansur, a quem devo boa parte da minha formação científica. Sou imensamente grata por tudo que aprendi contigo e pelo que conquistamos nesses anos de parceria. Obrigada por todos os ensinamentos, discussões e por todas as portas que você me abriu no mundo da Ciência. Você será sempre uma referência para mim.

Ao meu supervisor durante o doutorado sanduíche, Dr. Trevor Sweeney, por toda atenção na minha orientação, toda a confiança e paciência. Pela oportunidade incomparável que foi estar no seu laboratório, fazendo daquele um dos anos mais produtivos da minha carreira e em que mais cresci profissionalmente.

À Harriet, *my labmate, my roommate, my friend*. Trabalhar contigo me fez ver o quão longe podemos ir quando se tem respeito e trabalho em equipe. À Xin, que se juntou mais tarde ao *IFITeam* trazendo contribuições muito importantes. Ao Stephen, Ed e Tom, cujas contribuições foram fundamentais para o desenvolvimento deste. À Gabi, por toda paciência em me ajudar com as análises de bioinformática.

À banca, que aceitou ler e contribuir para o aperfeiçoamento deste, meu Muito Obrigada!

Ao Prof. André, e a todos os demais professores do LiDI nesses anos, que sempre enriqueceram o trabalho e as discussões. À Za, Coti Greicy e Filho pelo apoio no Lab, e em nome deles a todos os queridos colegas e amigos que ganhei após esses 8 anos no LiDI. À Cris e Maíra que se prontificaram em ler o manuscrito, contribuindo muito para o seu aperfeiçoamento.

A todo Sweeney Lab que me recebeu tão bem e onde eu literalmente me senti em casa. A todos os demais pesquisadores, colegas e funcionários da Divisão de Virologia, do Departamento de Patologia da Universidade de Cambridge.

Ao Prof. João Marques, que me recebeu no seu laboratório durante o ano em que estive em BH. A todos os queridos amigos que lá fiz e que levarei para a vida, especialmente Za, Tati, Flavinha, Manu, Roenick e Isaque.

Ao Programa Interunidades de Pós-graduação em Bioinformática. Aos seus professores pelo ensino de qualidade que ofereceram, e aos funcionários pelo apoio e a simpatia que sempre me atenderam. À CAPES pelo financiamento do meu projeto e minha bolsa, e ao *Newton Fund* pelo financiamento do projeto.

Aos Professores e colegas dos Laboratórios do MIP, Farmacologia e LAMEB da UFSC, pela ajuda em experimentos, empréstimo de reagentes e equipamentos.

Aos meus queridos Alice, Jonas e Paula, por aquele conforto que só os amigos brasileiros conseguem dar quando a saudade de casa aperta.

À Cris, minha amiga do coração, não tenho palavras para agradecer. Obrigada por estar sempre presente na minha vida e disposta a me escutar e ajudar.

À minha família como um todo, mas especialmente minha mãe, meu pai e Fon. Por serem meu exemplo e o meu porto seguro. Por nunca deixarem que eu desistisse, e muito mais que isso, por sempre me apoiarem para que eu alcançasse meus objetivos. Vocês sonharam o meu sonho, não descansaram até que fosse realidade, e muitas vezes renunciaram dos seus próprios para que isso fosse possível. Muito obrigada pelo amor incondicional, pelas críticas construtivas e por estarem sempre tão presentes. Eu amo vocês!

*“For a research worker, the unforgotten moments of his life are those rare ones, which come after years of plodding work, when the veil over nature’s secret seems suddenly to lift, and when what was dark and chaotic appears in a clear and beautiful light and pattern.”*

**Gerty Theresa Radnitz Cori**, primeira mulher a ganhar o Nobel de Fisiologia ou Medicina (1947).

## RESUMO

Entre os genes estimulados por interferon mais expressos está a família das IFITs (proteínas induzidas por interferon com repetições de tetratricopeptídeos). IFIT1 é uma molécula efetora crítica da imunidade antiviral intrínseca das células, que se liga principalmente a RNAs sem a 2'-O-metilização no primeiro e segundo nucleotídeos proximais ao *cap* (*cap0*), característica essa de RNAs não próprios. Após a ligação, IFIT1 previne a tradução desses RNAs por competir com o fator eucariótico de iniciação da tradução 4F. Mesmo IFIT1 podendo ligar-se diretamente a esses RNAs, já foi demonstrado que ela interage com muitas outras proteínas, incluindo outras IFITs, em células estimuladas por interferon. Entretanto, os detalhes moleculares dessas interações e o seu impacto na atividade de IFIT1 ainda não tinham sido mostrados. Os complexos de IFITs humanas foram aqui reconstituídos em experimentos de gel filtração utilizando proteínas recombinantes, e sua estequiometria foi determinada por SEC-MALS. IFIT1 interage fortemente com IFIT3 para formar um heterotetrâmero estável. Os homodímeros de IFIT2 e IFIT3 dissociam-se para formar um heterodímero mais estável, que interage com IFIT1 em um heterotrímero de IFIT1:IFIT2:IFIT3. A presença de IFIT3 nesses complexos aumenta sua estabilidade, como demonstrado por fluorimetria de varredura diferencial. A associação de IFIT3 e IFIT2:IFIT3 também potencializam a ligação de IFIT1 a RNAs modelo contendo *cap0* em ensaios de inibição da extensão do iniciador e a inibição da tradução desses alvos *in vitro*. Por meio de mutações, a interface de ligação IFIT1:IFIT3 foi identificada como um motivo conservado YxxxL na região C-terminal de ambas as proteínas. Alterações nessa interface anulam a potencialização da atividade de IFIT1 dependente de IFIT3. Em células, foi demonstrado que IFIT3, mas não IFIT2, estabiliza a expressão de IFIT1. Por fim, um sistema de co-precipitação *in vitro* foi desenvolvido para identificar interações do complexo IFIT1:IFIT2:IFIT3 com mRNAs celulares “próprios”. Os RNAs ligados foram sequenciados em profundidade e a sua expressão proteica avaliada no contexto da super-expressão de IFIT1. Juntos, esses dados revelam novos papéis para IFIT3, esclarecem aspectos críticos da montagem e função dos complexos de IFITs e trazem novas pistas a respeito do mecanismo de inibição da tradução celular mediado por IFIT1.

## ABSTRACT

Among the most highly expressed interferon stimulated genes are members of IFIT family (interferon-induced proteins with tetratricopeptide repeats). IFIT1 is a critical effector molecule of the antiviral cell-intrinsic immunity that binds mainly cap0 RNAs, which lack 2'-O-methylation of the first and second cap-proximal nucleotides (cap0), characteristic of non-self RNAs. After binding, IFIT1 prevents their translation by competing with the cap-binding eukaryotic translation initiation factor 4F. Despite IFIT1 can bind RNAs by itself, it was demonstrated that it interacts with several proteins, including other IFITs in cells stimulated with interferon. However, the molecular details of these interactions and the impact on IFIT1 activity wasn't shown. The human IFIT-complexes were here reconstructed in gel filtration experiments using recombinant proteins, and their stoichiometry were determined by SEC-MALS. IFIT1 strongly interacts with IFIT3 to form a stable heterotetramer. IFIT2 and IFIT3 homodimers dissociate to form a more stable heterodimer that interacts with IFIT1 in a heterotrimer of IFIT1:IFIT2:IFIT3. The presence of IFIT3 in these complexes increases their stability as demonstrated by differential scanning fluorimetry. IFIT3 and IFIT2:IFIT3 association also enhanced IFIT1 binding to model cap0 RNAs in toeprinting assays and the translation inhibition of its targets *in vitro*. By mutational analysis, the IFIT1:IFIT3 binding interface were identified as a conserved C-terminal YxxxL motif present in both proteins. Disruption of this interface abrogates IFIT3-dependent IFIT1 enhanced activity. In cells, it was demonstrated that IFIT3, but not IFIT2, stabilizes IFIT1 expression. Finally, an *in vitro* pulldown system were developed to identify IFIT1:IFIT2:IFIT3 interactions with cellular "self" mRNAs. Bound RNAs were deep sequenced and their protein expression evaluated in the context of IFIT1 overexpression. Together this work reveals new roles for IFIT3, clarifies the critical aspects of IFIT complexes assembly and function, and brings new clues to the mechanism of IFIT1-mediated cell translation inhibition.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Indução e mecanismo de ação das IFITs.....	17
Figura 2 - Organização do <i>locus</i> das IFITs no genoma de alguns mamíferos .....	19
Figura 3 - IFIT1, IFIT2 IFIT3 e IFIT5 modulam a sinalização via MAVS. ....	20
Figura 4 - Estrutura do monômero de IFIT1 ligado ao RNA. ....	23
Figura 5 - Homodímeros de IFIT1 e IFIT2. ....	24
Figura 6 - Interatoma de IFITs. ....	26
Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR para mutagênese sítio dirigida IFIT1-E450x. ....	53
Figura 8 - Amplificação e clonagem de IFIT2 e IFIT3.....	54
Figura 9 - Expressão heteróloga das IFITs in <i>E. coli</i> .....	55
Figura 10 - Clivagem da cauda de histidina de IFIT2.....	55
Figura 11 - Purificação das IFITs por FPLC. ....	57
Figura 12 - SEC-MALS de IFIT1, IFIT2 e IFIT3. ....	58
Figura 13 - Reconstituição do complexo IFIT1:IFIT3 <i>in vitro</i> . ....	59
Figura 14 - Complexo IFIT1:IFIT2 a 4 ou 30 °C. ....	60
Figura 15 - Formação e estabilidade do complexo IFIT2:IFIT3.....	61
Figura 16 - Formação do complexo IFIT1:IFIT2:IFIT3.....	62
Figura 17 - Estabilidade dos complexos de IFITs. ....	63
Figura 18 - Impacto de mutações no motivo 'YxxxL' de IFIT1 e sua interação com IFIT3. ....	65
Figura 19 - Impacto de mutações no motivo 'YxxxL' de IFIT1 e sua interação com IFIT2. ....	66
Figura 20 - Efeito de IFIT3 na capacidade de ligação a <i>cap0</i> -RNAs e inibição da tradução de IFIT1 <i>in vitro</i> . ....	68
Figura 21 - IFIT3 estabiliza e aumenta a atividade de IFIT1 em células.....	69
Figura 22 - Tratamento das células HEK293Ts com IFN-I e preparação dos RNAs utilizados no <i>pulldown</i> .. ....	71
Figura 23 - Produção dos trímeros para <i>pulldown</i> .....	71
Figura 24 - Análise <i>RNAseq</i> . ....	73
Figura 25 - Ligação de mRNAs próprios a IFIT1 em células. ....	75
Figura 26 - Efeito da super-expressão de IFIT1 na tradução celular.....	76
Figura 27 - Expressão de CXCR4 em células transfectadas com IFIT1 ou IFIT1-R38E. ....	78
Figura 28 – Modelo proposto para a formação dos complexos de IFITs em humanos. .	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores utilizados na mutagênese sítio dirigida de IFIT1.....	29
Tabela 2 - Iniciadores utilizados na amplificação das sequências codificadoras de IFIT2 e IFIT3.....	30
Tabela 3 - Iniciadores utilizados na qPCR.....	38
Tabela 4 - Condições de amplificação da qPCR (QuantStudio) .....	39
Tabela 5 - Comparações entre amostras sequenciadas do <i>pulldown</i> para o gene PELI344	
Tabela 6 - Iniciadores utilizados na qPCR.....	50
Tabela 7 - Condições de amplificação da qPCR (StepOnePlus) .....	51
Tabela 8 - Descrição das amostras do <i>RNAseq</i> .....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATF-2 - do inglês *activating transcription factor 2*.

cDNA – DNA complementar.

cpm - contagens por milhão.

Ct - do inglês *cycle threshold*.

C-terminal - carboxi-terminal.

DNA - ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*.

dNTPs - desoxinucleotídeos trifosfatados.

dsRNA – RNA de fita dupla, do inglês *double stranded RNA*.

DTT - ditioneitol.

eIF - fator de iniciação eucariótico, do inglês *eukaryotic initiation factor*.

FPLC - cromatografia líquida de proteína rápida, do inglês *fast protein liquid chromatography*.

IFIT - do inglês *interferon induced protein with tetratricopeptide repeats*.

IFN - interferon.

IKK: quinase de I $\kappa$ B.

IP - imunoprecipitação.

IPTG - Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida.

IR - índice de refração diferencial.

IRES - sítio interno de entrada de ribossomos, do inglês *internal ribosome entry sites*.

IRFs - do inglês *interferon regulatory factors*.

ISGs - genes estimulados por interferons, do inglês *interferon stimulated genes*.

ISREs - elementos de resposta estimulados por IFN, do inglês *IFN-stimulated response elements*.

I $\kappa$ B - inibidor de NF- $\kappa$ B.

JAK - do inglês *Janus kinases*.

KCl - cloreto de potássio.

MALS - dispersão de luz multi-ângulo, do inglês *multi-angle light scattering*.

mAU: mili Unidades de Absorbância.

MAVS: proteína mitocondrial de sinalização antiviral, do inglês *mitochondrial antiviral signalling protein*.

MDA-5 - do inglês *melanoma differentiation-associated protein 5*.

MgSO<sub>4</sub> - sulfato de magnésio.



mRNA - RNA mensageiro.

NF- $\kappa$ B - fator nuclear- $\kappa$ B, do inglês *factor nuclear kappa B*.

NS5 - proteína não estrutural 5, do inglês *nonstructural protein 5*.

N-terminal - amino-terminal.

PAMPs - padrões moleculares associados ao patógeno, do inglês *pathogen-associated molecular pattern*.

pb: pares de bases.

PCR - reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction*.

PMSF - do inglês *phenylmethylsulfonyl fluoride*.

PPM - Padrão de peso molecular para proteína.

PRRs - receptores de reconhecimento de padrões, do inglês *pattern recognition receptors*.

qPCR - PCR quantitativo em tempo real.

RIG-I - do inglês *retinoic acid-inducible gene 1*.

RNA - ácido ribonucleico, do inglês *ribonucleic acid*.

RT - transcrição reversa.

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, do inglês *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*.

SEC - cromatografia de exclusão de tamanho, do inglês *size exclusion chromatography*.

SFB - soro fetal bovino.

ssRNA - RNA fita simples, do inglês *single stranded RNA*.

STAT - do inglês *Signal Transducer and Activator of Transcription proteins*.

STING - estimulador de genes de interferon, do inglês *stimulator of interferon genes*.

TAP - purificação de afinidade em *tandem*, do inglês *tandem affinity purification*.

TBK1 - quinase 1 de ligação a TANK, do inglês *TANK-binding kinase 1*.

TLR3 - receptor tipo-*toll* 3, do inglês *toll-like receptor 3*.

T<sub>m</sub> - temperatura de desnaturação, do inglês *melting temperature*.

TPRs - repetições de tetratricopeptídeos, do inglês *tetratricopeptide repeats*.

TRAF: fator associado a TNFR.

tRNA - RNA transportador.

UA - unidades arbitrárias ou unidades de absorvância (de acordo com as legendas).

UTR - do inglês *untranslated region*.

WB - *Western blot*.

ZV - *Zika virus*.

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

$\mu$  - micro

Da - dáltons

g - grama

k - quilo

L - litro

m - mili

M - molar

$^{\circ}$  C - graus Celsius

p - pico

U - unidades

$\alpha$  - alfa, ou “anti” quando referente a anticorpos

$\beta$  - beta

$\gamma$  - gama

$\Delta$  - delta

$\lambda$  - lambda

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	27
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	28
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
4.1 PLASMÍDEOS.....	29
4.1.1 IFIT1.....	29
4.1.1.1 Mutagênese sítio-dirigida .....	29
4.1.2 IFIT2 e IFIT3 .....	30
4.1.2.1 PCR .....	30
4.1.2.2 Subclonagem em pET28b.....	31
4.2 SUPER-EXPRESSÃO EM <i>E. coli</i> .....	31
4.2.1 Transformação e indução.....	32
4.2.2 Lise e cromatografia de afinidade .....	32
4.2.3 Clivagem da cauda de histidinas: IFIT2 E IFIT3.....	33
4.2.4 Purificação por cromatografia de troca iônica e exclusão de tamanho .....	33
4.3 FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS DE IFITs.....	34
4.3.1 Complexos IFIT1:IFIT2 e IFIT1:IFIT3 .....	34
4.3.2 Complexo IFIT2:IFIT3.....	35
4.3.3 Complexo IFIT1:IFIT2:IFIT3.....	35
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS E COMPLEXOS POR SEC E SEC- MALS .....	35
4.4.1 SEC analítica.....	35
4.4.2 SEC-MALS.....	36
4.5 FLUORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL .....	36
4.6 <i>PULLDOWN</i> COM TRÍMEROS DE IFITs RECOMBINANTES E mRNA DE CÉLULAS TRATADAS COM IFN .....	37
4.6.1 Tratamento das células com IFN .....	37
4.6.2 Extração do RNA total .....	37
4.6.3 Síntese do DNA complementar (cDNA).....	37
4.6.4 PCR quantitativo em tempo real .....	38
4.6.5 <i>Western blot</i> (LI-CORE) .....	39

4.6.6 Purificação do mRNA .....	39
4.6.7 RNA globina-Fluc defosforilado .....	40
4.6.8 Produção dos trímeros .....	40
4.6.9 <i>Pulldown</i> com trímero purificado .....	40
4.7 PREPARAÇÃO DAS BIBLIOTECAS E <i>RNASEQ</i> .....	42
4.8 ANÁLISES DO <i>RNASEQ</i> .....	42
4.8.1 Análise do enriquecimento de mRNAs ligados a IFIT1 no <i>RNaseq</i> .....	43
4.9 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA 5' UTR DOS mRNAs ALVO DE IFIT1 .....	44
4.10 TRANSFEÇÃO HEK293 COM CLORETO DE CÁLCIO .....	45
4.11 <i>WESTERN BLOT</i> .....	46
4.11.1 Anticorpos primários .....	47
4.11.2 Anticorpos secundários .....	47
4.12 IMUNOPRECIPITAÇÃO IFIT1-FLAG E RNA CELULARES.....	47
4.12.1 Imunoprecipitação .....	48
4.12.3 Extração do RNA .....	49
4.12.4 Síntese do DNA complementar (cDNA).....	49
4.12.5 PCR quantitativo em tempo real .....	49
4.13 TESTE DE INIBIÇÃO DA TRADUÇÃO COM IFIT1 E IFIT1-R38E .....	51
4.13.1 Tradução de alvos específicos após super-expressão de IFIT1: IKBKG E CXCR4.....	51
<b>5 RESULTADOS</b> .....	53
5.1 EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DAS IFITS POR FPLC .....	53
5.1.1 Geração dos mutantes de IFIT1 .....	53
5.1.2 Amplificação e clonagem de IFIT2 e IFIT3 .....	53
5.1.3 Expressão heteróloga das IFITs em <i>E. coli</i> .....	54
5.1.4 Purificação das IFITs por FPLC .....	55
5.2 IFIT1, IFIT2 E IFIT3 FORMAM HOMODÍMEROS .....	57
5.3 IFIT1 E IFIT3 FORMAM UM TETRÂMERO ESTÁVEL .....	59
5.4 IFIT1 E IFIT2 INTERAGEM FORMANDO MÚLTIPLAS ESPÉCIES .....	59
5.5 IFIT2 E IFIT3 FORMAM UM HETERODÍMERO .....	60
5.6 IFIT1:IFIT2:IFIT3 FORMAM UM TRÍMERO ESTÁVEL .....	61
5.7 IFIT3 AUMENTA A ESTABILIDADE DOS COMPLEXOS DE IFITS .....	63
5.8 IFIT1 E IFIT3 INTERAGEM POR UM MOTIVO CONSERVADO “YxxxL” ..	64
5.9 IFIT1 E IFIT2 INTERAGEM INESPECIFICAMENTE .....	65
5.10 IFIT3 ESTABILIZA IFIT1 E AUMENTA SUA ATIVIDADE .....	67

5.10.1 IFIT3 e IFIT2:IFIT3 aumentam a capacidade de ligação e inibição da tradução de IFIT1 a <i>cap0</i> -RNAs <i>in vitro</i> .....	67
5.10.2 A co-expressão de IFIT3 estabiliza IFIT1 em células e potencializa sua atividade .....	69
5.11 O COMPLEXO IFIT1:IFIT2:IFIT3 SE LIGA A mRNAs CELULARES .....	70
5.11.1 Validação dos resultados do <i>RNAseq</i> em células.....	74
5.12 EFEITO DA SUPER-EXPRESSION DE IFIT1 NA TRADUÇÃO CELULAR.	75
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	79
6.1 OS COMPLEXOS DE IFITS.....	79
6.1.1 Impacto da oligomerização na estabilidade e atividade de IFIT1.....	84
6.1.2 Impacto da oligomerização na interação com o complexo de MAVS .....	86
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	89
<b>8 PERSPECTIVAS</b> .....	90
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	91
<b>ANEXO I</b> .....	96
<b>ANEXO II</b> .....	105
<b>ANEXO III</b> .....	107

## 1 INTRODUÇÃO

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra vírus invasores e é ativada imediatamente após a infecção. Durante a replicação viral moléculas associadas ao vírus, tais como DNA genômico, RNAs de fita dupla (dsRNA) e outros padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), acumulam-se no interior da célula. O reconhecimento dos PAMPs virais se dá através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), tais como RIG-I (do inglês *retinoic acid-inducible gene 1*), MDA-5 (do inglês *melanoma differentiation-associated protein 5*) e TLR3 (do inglês *toll-like receptor 3*) (revisado em BAUM; GARCÍA-SASTRE, 2010). Após o reconhecimento, os fatores de transcrição IRFs (do inglês *interferon regulatory factors*) 3 e 7, NF- $\kappa$ B (do inglês *factor nuclear kappa B*) e ATF-2 (do inglês *activating transcription factor 2*)/c-Jun são induzidos por diferentes vias levando à produção dos interferons do tipo I (IFN-I) (esquematizado na Figura 1). Os IFN produzidos são secretados e ligam-se aos seus receptores na superfície das células infectadas ou das vizinhas, ativando uma cascata de sinalização intracelular que envolve tirosina quinases da família JAK (do inglês *Janus kinases*) e fatores de transcrição da família STAT (do inglês *Signal Transducer and Activator of Transcription proteins*). Esses, por sua vez, induzem a transcrição de genes estimulados por interferons (ISGs), que são responsáveis pelo estabelecimento do estado celular antiviral (DARNELL; KERR; STARK, 1994; DER et al., 1998; NGUYEN; HISCOTT; PITHA, 1997; STARK et al., 1998).

Entre as ISGs mais expressas está a família de proteínas induzidas por IFN com repetições de tetratricopeptídeos (IFITs do inglês, *interferon induced protein with tetratricopeptide repeats*). Em geral, os genes dessa família apresentam sua organização conservada, contendo dois éxons. O primeiro codifica a 5' UTR e o códon de iniciação, enquanto o segundo codifica o restante do mRNA (FENSTERL; SEN, 2011). Em humanos, cinco genes estão presentes: IFIT1, IFIT1B, IFIT2, IFIT3 e IFIT5. Com exceção de IFIT1B (DAUGHERTY et al., 2016), todas as outras apresentam múltiplos elementos de resposta estimulados por IFN (ISREs) em seus promotores. Eles estão localizados a cerca de 200 pares de bases (pb) a montante da região do *TATA box*, sendo três em IFIT5 e dois nas demais (revisado por FENSTERL; SEN, 2011). A transcrição é estimulada principalmente pela indução de IFN- $\alpha/\beta$  (IFN-I) e IFN- $\lambda$ , e menos por IFN- $\gamma$

(DER et al., 1998; KOHLI et al., 2012), e pode também ser induzida diretamente por IRF3 (BANDYOPADHYAY et al., 1995; GRANDVAUX et al., 2002).

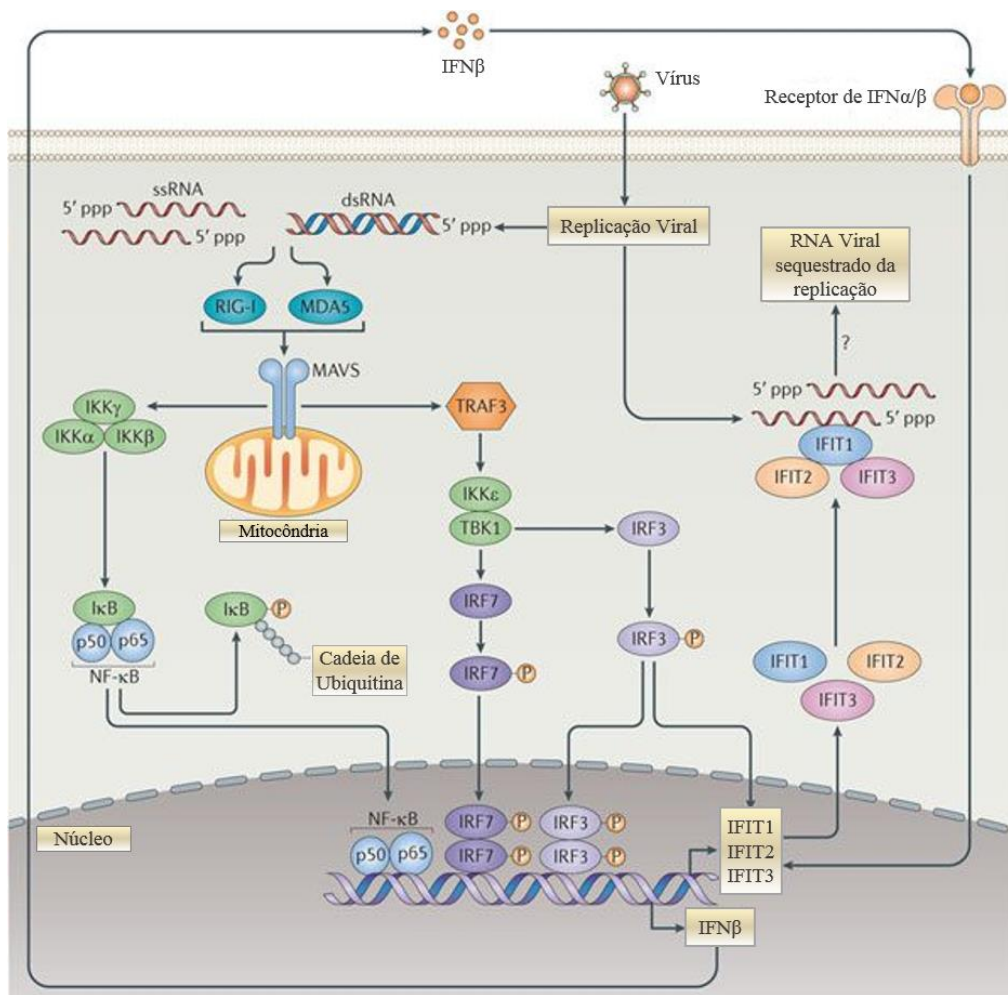


Figura 1 - Indução e mecanismo de ação das IFITs. PAMPs de vírus invasores são reconhecidos por PRRs citoplasmáticos como RIG-I e MDA5. Estes, por sua vez, induzem a expressão de ISGs, como as IFITs, por uma cascata de sinalização dependente ou não de IFN. IFIT1 associa-se com IFIT2 e IFIT3, e funciona como um sensor de RNAs virais contendo extremidades 5' trifosfatadas livres ou contendo *cap0*. Dessa forma, IFIT1 previne o espalhamento da infecção, sequestrando os RNAs de replicação e tradução viral. dsRNA: RNA fita dupla; IκB: inibidor de NF-κB; IKK: quinase de IκB; MAVS: proteína mitocondrial de sinalização antiviral; NF-κB: fator nuclear-κB; ssRNA: RNA fita simples; TBK1, quinase 1 de ligação a TANK; TRAF3: fator associado a TNFR 3. Adaptado de (DIAMOND; FARZAN, 2013).

Apesar da presença de múltiplos ISREs sugerir indução concomitante, a região promotora de cada IFIT é ligeiramente diferente, de forma que elas podem apresentar padrões de expressão diferencial de acordo com o tipo celular, a infecção, ou estímulo em questão (CHO et al., 2013; TERENCEZI et al., 2006; WACHER et al., 2007). Isso sugere que cada IFIT possui um papel antiviral não redundante em infecções virais específicas.

A expressão basal das IFITs é normalmente indetectável, ou baixa, mas induzida consideravelmente por infecções virais e tratamento com IFN-I (GUO et al., 2000). A indução é transiente e o RNA tem uma meia-vida relativamente curta (KUSARI; SEN, 1986). Dados experimentais apontam que em células HT1080 os transcritos de IFIT1 e IFIT2 são altamente induzidos após seis horas de tratamento com IFN $\beta$ . O mRNA de IFIT1 é mais expresso e o nível continua constante ao longo de 24 horas, já o nível do mRNA de IFIT2 cai abruptamente logo nas primeiras horas. Quando o indutor é dsRNA, IFIT1 também é mais induzida que IFIT2, mas nesse caso o decaimento dos níveis de mRNA se comporta de forma similar. O padrão de indução é ainda diferente quando o *Sendai virus* é utilizado, nesse caso a cinética varia de acordo com a linhagem celular (TERENZI et al., 2006). Em níveis proteicos, IFIT1 pode ser detectada em células HT1080 desde a indução com cerca de 10 U de IFN $\beta$ , quase atingindo a saturação em cerca de 100 U, e a partir de quatro horas do tratamento (detecção por *Western blot*) (GUO; PETERS; SEN, 2000). Células HeLa, 16 horas após o tratamento com IFN $\beta$  (1.000 U/mL), apresentam cerca de 216 pg de IFIT1 por  $\mu$ g de proteína total (no lisado celular), o que corresponderia a aproximadamente  $2,4 \times 10^6$  cópias da proteína por célula. Já HEK293Ts contêm cerca de 126 pg/ $\mu$ g, ou aproximadamente  $1,4 \times 10^6$  cópias nas condições experimentais testadas (PICHLMAIR et al., 2011a). No entanto, a meia-vida da proteína é curta, cerca de seis horas (GUO; PETERS; SEN, 2000).

A família de IFITs está presente em todos os vertebrados. Sua origem provável data de um ancestral vertebrado comum há cerca de 450 milhões de anos, tendo possivelmente co-evoluído com os genes da família de IFNs. Análises da estrutura genômica das IFITs revelaram uma expansão da família por duplicação gênica linhagem- e espécie-específica. O número de genes presentes varia substancialmente em pássaros, répteis, anfíbios e peixes. Já a maioria dos mamíferos possui IFIT1, IFIT1B, IFIT2, IFIT3 e IFIT5, dispostos (em geral) em um mesmo *locus in tandem* (no cromossomo 10 em humanos) (LIU et al., 2013). Apesar de camundongos serem muito utilizados como modelos para estudo dos mecanismos de ação das IFITs humanas, várias diferenças podem ser apontadas entre a família em primatas e roedores. Análises filogenéticas demonstraram que roedores perderam tanto o gene de IFIT5 como IFIT1 (Figura 2). Potencialmente compensando essa perda, em camundongos, IFIT1B sofreu duas duplicações (resultando em três parálogos: *Ifit1*, *Ifit1b* e *Ifit1c*) e *Ifit3* uma (*Ifit3* e *Ifit3b*) (DAUGHERTY et al., 2016).



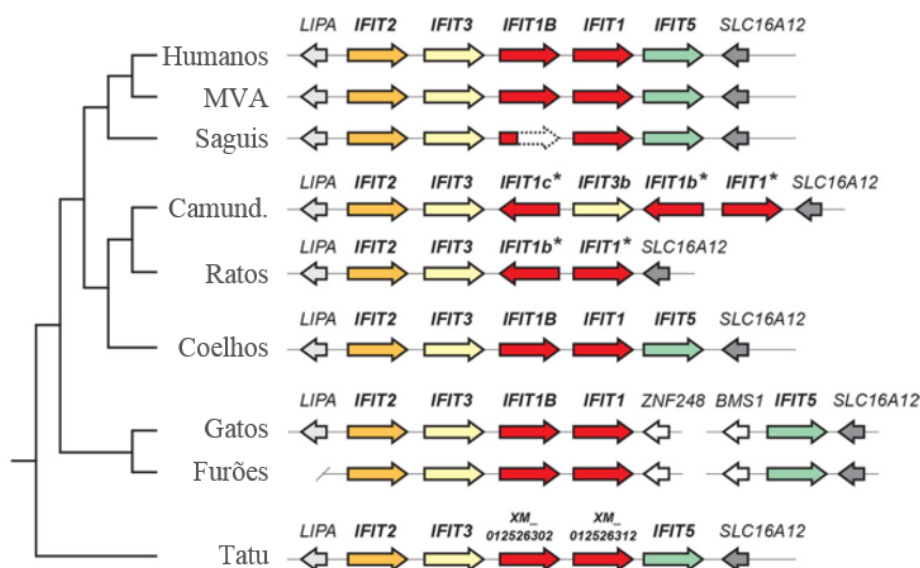


Figura 2 - Organização do *locus* das IFITs no genoma de alguns mamíferos. Setas coloridas representam os genes da família de IFITs e setas em cinza os genes sintênicos vizinhos. À esquerda a árvore filogenética representa o parentesco entre as espécies. Em carnívoros, IFIT5 encontra-se em outro *locus*. Nos saguis, IFIT1B está representado como pseudogene, por apresentar mutações modificando a fase de leitura e inserção de códon de parada (indicado pela seta branca tracejada). Os asteriscos marcam os parálogos de IFIT1B no genoma dos roedores. MVA: macaco verde africano; Camund.: camundongos. Adaptado de DAUGHERTY et al., 2016.

Em geral, esses genes codificam proteínas de 50-60 kDa (em humanos IFIT1, IFIT3 e IFIT5 têm aproximadamente 56 kDa e IFIT2 tem 54 kDa). Estruturalmente, a família é caracterizada por apresentar uma sequência de repetições de tetratricopeptídeos (TPRs), motivos hélice-volta-hélice compostos de 34 resíduos degenerados, que formam os domínios globulares carboxi (C-) e amino (N)-terminal, ligados por uma região flexível (ABBAS et al., 2013, 2017a; D'ANDREA; REGAN, 2003; KATIBAH et al., 2013; SEN; FENSTERL, 2012). Os motivos TPRs geralmente mediam interações entre proteínas e a formação de complexos multiproteicos e, por meio deles as IFITs já foram associadas a inúmeros processos biológicos, como migração (LAI et al., 2008, 2013), apoptose (STAWOWCZYK et al., 2011), sinalização por citocinas (BERCHTOLD et al., 2008; LI et al., 2009; LIU et al., 2011) e proliferação celular (FENG et al., 2014; XIAO et al., 2006).

A presença de domínios TPRs permite com que as IFITs interajam entre si e com outras proteínas celulares (Figura 3). Já foi demonstrado, por exemplo, que o domínio N-terminal de IFIT3 precipita juntamente com a proteína de sinalização mitocondrial antiviral (MAVS, do inglês *mitochondrial antiviral signalling protein*), com a quinase ligadora de TANK 1 (TBK1, do inglês *TANK-binding kinase 1*) e várias outras moléculas

desse complexo em células HEK293T transfectadas (LIU et al., 2011). Especificamente, os resíduos E164 e E165 de IFIT3 interagem com a porção N-terminal de TBK1 (K38), formando uma ponte, como molécula adaptadora, entre TBK1 e MAVS e, conseqüentemente, potencializando a sinalização via RIG-I, a produção de citocinas pró-inflamatórias e IFN-I (HOU et al., 2016; LIU et al., 2011; ZHANG et al., 2013).

Evidências sugerem que IFIT1 também modula o eixo MAVS-TBK1 mesmo não interagindo diretamente com essas proteínas. Ao invés disso, foi sugerido que IFIT1 pode ligar-se a outra proteína adaptadora de MAVS-TBK1, o estimulador de genes de interferon (STING, do inglês *stimulator of interferon genes*). A ligação de IFIT1 ocluiria os sítios de ligação dessas proteínas em STING, impedindo a interação. Estando demonstrado que a super-expressão de IFIT1 inibe a co-precipitação de MAVS-STING. Dessa forma, IFIT1 modularia negativamente a produção de IFN-I (LI et al., 2009). De forma contraditória, IFIT1 parece promover a expressão de IFN-I durante a infecção por alfavírus (REYNAUD et al., 2015).

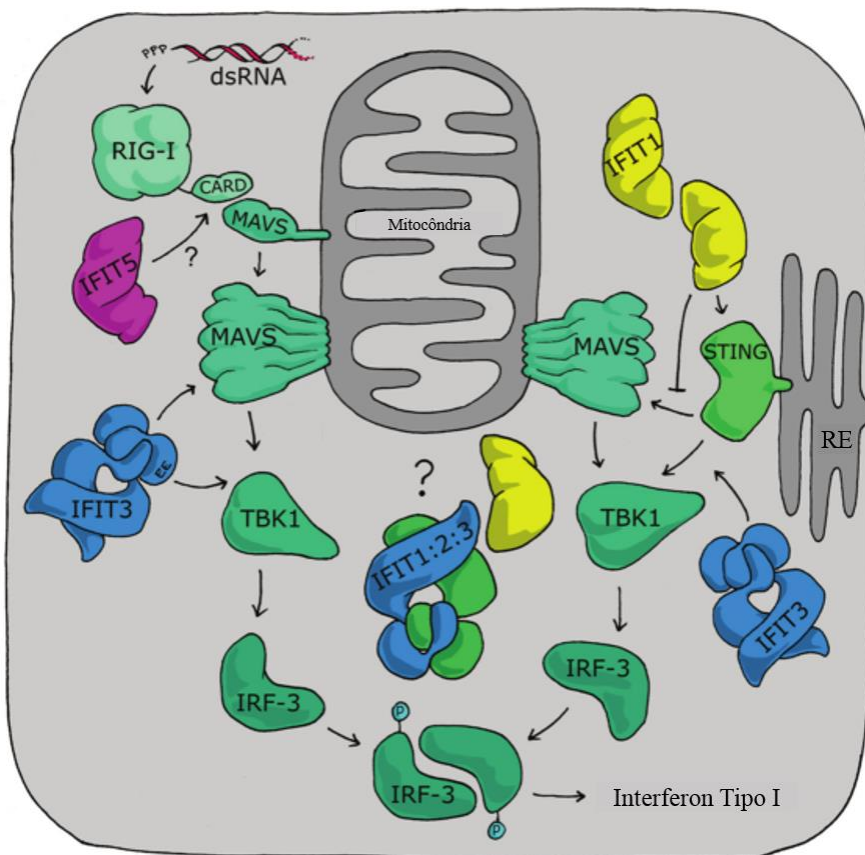


Figura 3 - IFIT1, IFIT2 IFIT3 e IFIT5 modulam a sinalização via MAVS. Representação esquemática das interações dos monômeros ou homodímeros de IFITs com proteínas do complexo MAVS-STING-TBK1. Os pontos de interrogação destacam que o papel dos heterocomplexos de IFITs na interação com essas proteínas celulares ainda não foi demonstrado. Adaptado de: MEARS; SWEENEY, 2018.

IFIT2 e IFIT3 também interagem com STING. No caso de IFIT2, a interação tem pouco efeito na sinalização via MAVS, sugerindo outra forma de associação, diferente de IFIT1 (LI et al., 2009). Já IFIT3, parece atuar também como proteína adaptadora, ao ligar-se a STING e promover o recrutamento de TBK1, após o reconhecimento de DNA no citoplasma (WANG et al., 2018). Como os detalhes moleculares dessa interação ainda não foram definidos, não está claro se IFIT3 pode ligar a MAVS e STING simultaneamente para o recrutamento de TBK1. Em ensaios de *pulldown*, foi demonstrado também, que IFIT5 interage com MAVS, TRAF6 e RIG-I de forma independente das demais proteínas da família. Sendo proposto que essa atuaria recrutando RIG-I para o complexo de MAVS (ZHENG et al., 2015).

Além de modular essas vias de sinalização, IFITs são proteínas efetoras do sistema imune inato e estão envolvidas em vários mecanismos antivirais, como, inibição da iniciação da tradução, sequestro de proteínas virais, ligação a RNA virais e prevenção da sua tradução entre outros (revisado em DIAMOND; FARZAN, 2013).

A atividade antiviral dessas proteínas foi primeiramente atribuída a capacidade de IFIT1 e IFIT2 interagirem com uma subunidade do fator de iniciação eucariótico (eIF, do inglês *eukaryotic initiation factor*) 3 (GUO et al., 2000). eIF3 é um complexo proteico envolvido em várias etapas da iniciação da tradução dependente de *cap*, tais como: recrutamento do mRNA, varredura para identificação do códon de iniciação e entrega do tRNA para a maquinaria de tradução (MERRICK, 2004). Segundo esse modelo, IFIT1 e IFIT2 humanas ligariam a subunidade eIF3e e, dessa forma, impediriam a entrega do tRNA na etapa de formação do complexo ternário de iniciação da tradução (GUO et al., 2000; HUI et al., 2003). Isso levaria a um decaimento na taxa de tradução como um todo, impactando tanto mRNAs celulares quanto alguns mRNAs virais (coronavírus e flavivírus, por exemplo). Nesse contexto, foi demonstrado que a expressão exógena de IFIT1 em células HT1080 leva a um decréscimo de até 40% na taxa de tradução proteica total (GUO et al., 2000). eIF3 é importante também na tradução de RNAs virais contendo sítios internos de entrada de ribossomos (IRESs, do inglês *internal ribosome entry sites*) (MERRICK, 2004). Nesse aspecto, os dados sobre a ação de inibição da tradução por IFIT1 são contraditórios. Enquanto, diferentes efeitos foram relatados com relação a tradução do vírus da hepatite C (ABBAS et al., 2017a; RAYCHOUDHURI et al., 2011),

nenhum efeito foi observado para o vírus da encefalomiocardite (HUI et al., 2003), sugerindo que as IFITs poderiam agir por diferentes mecanismos.

Outro mecanismo de ação antiviral relatado envolve a inibição direta de proteínas virais. Estudos demonstraram que IFIT1 pode ligar-se e sequestrar a helicase E1 do papilomavírus humano no citoplasma, impedindo a sua translocação para o núcleo e, conseqüentemente, a replicação viral (SAIKIA; FENSTERL; SEN, 2010; TERENCEZI; SAIKIA; SEN, 2008).

Mais recentemente foi descoberto, que as IFITs poderiam restringir infecções virais ligando diretamente RNAs não próprios para inibir sua tradução e/ou replicação. A capacidade de IFIT1 ligar-se a RNAs foi inicialmente demonstrada por Pichlmair *et al.* (2011a). Nesse estudo, o grupo identificou proteínas em lisados de células estimuladas com IFN, que interagiam com RNAs contendo extremidades trifosfatadas livres. Mais tarde foi demonstrado, que IFIT1 se liga com mais alta afinidade, a RNAs capeados sem metilação no primeiro nucleotídeo transcrito (*cap0*) (HABJAN et al., 2013; KIMURA et al., 2013; KUMAR et al., 2013). Assim como IFIT1, IFIT5 também liga RNAs com extremidades trifosfato livre. A estrutura cristalizada de IFIT1 e IFIT5 mostra que as proteínas contêm um “túnel” formado entre os domínios N- e C-terminal, que interage com a cadeia trifosfato e os primeiros nucleotídeos dos RNAs de fita simples (Figura 4B-D) (ABBAS et al., 2013, 2017b). No entanto, somente IFIT1 possui uma cavidade hidrofóbica larga o suficiente, ao final desse túnel, capaz de acomodar o *cap* (ABBAS et al., 2017a). Esses achados corroboram o modelo de que IFIT1 compete com outro fator eucariótico de iniciação, eIF4E/4F, na ligação a mRNAs contendo *cap0* e, dessa forma, inibe a tradução destes.

Uma vez que, os mRNAs do hospedeiro são geralmente metilados na sua primeira ou primeira e segunda bases transcritas (*cap1* e *cap2*, respectivamente), a seletividade de IFIT1 ofereceria um mecanismo de reconhecimento e bloqueio da tradução de RNAs não-próprios. No entanto, trabalhos mais recentes apontam que IFIT1 pode também ligar-se a RNAs contendo *cap1* em algumas condições (ABBAS et al., 2017a; DAUGHERTY et al., 2016). Essa ligação tem afinidade bem menor que àquela ao *cap0*, depende da concentração de IFIT1 e da estrutura presente na extremidade 5' do RNA, mas possibilitaria a IFIT1 modular a expressão de mRNAs próprios ou virais, contendo *cap1* e 5' UTRs menos estruturados.

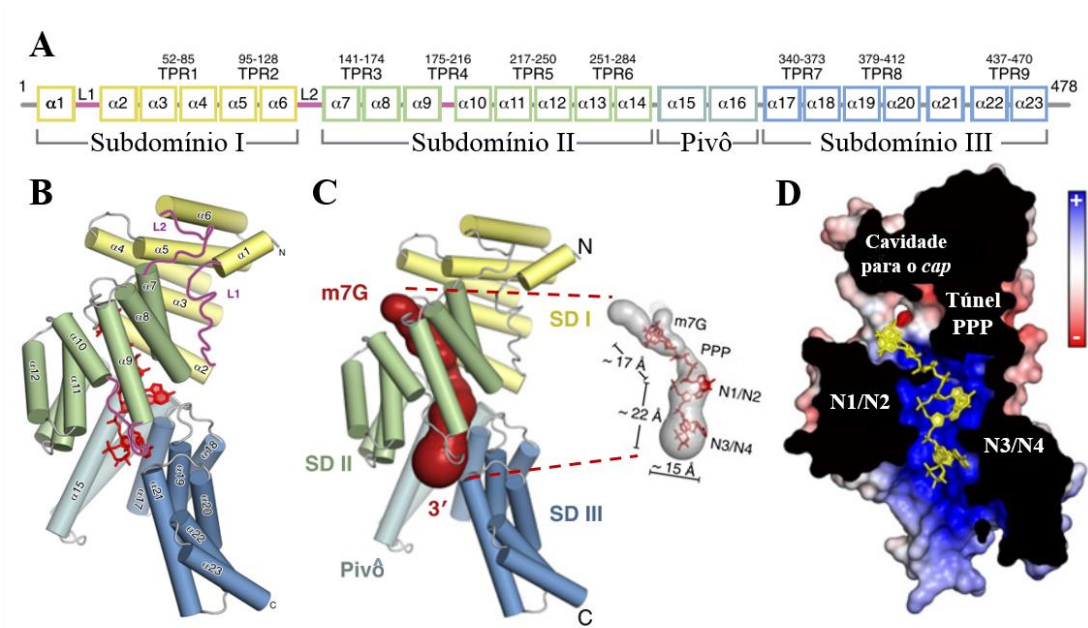


Figura 4 - Estrutura do monômero de IFIT1 ligado ao RNA. (A) representação esquemática dos subdomínios de IFIT1, organizados em TPRs, e região do pivô de acordo com a sequência. (B) estrutura do monômero de IFIT1 mostrando a disposição das hélices e subdomínios de acordo com as cores em “A”. L: loop (C) representação do monômero de IFIT1, destacando o túnel (vermelho escuro) formado entre os domínios. No detalhe as dimensões do túnel (cinza) acomodando um RNA *cap0* (vermelho). m7G: *cap0*, SD: subdomínio. (D) Seção transversal do monômero, colorido de acordo com o potencial eletrostático da superfície (de negativo ( $-10 \text{ kTe}^{-1}$ , vermelho) a positivo ( $+10 \text{ kTe}^{-1}$ ; azul)) acomodando um RNA *cap0* (amarelo). As posições dos quatro primeiros nucleotídeos (N1-4) e da cadeia trifosfato (PPP) no túnel estão indicadas, assim como a cavidade ao final que aloja o *cap0*. Adaptado de ABBAS et al., 2017a.

Os vírus, por outro lado, desenvolveram mecanismos de escape para evadir o reconhecimento por IFIT1. Vírus das famílias *Flaviviridae* e *Coronaviridae*, que replicam no citoplasma e utilizam a maquinaria celular de tradução dependente de *cap*, expressam a suas próprias 2'-O-metiltransferases e, conseqüentemente, apresentam RNAs com *cap1*. Mutações que impactem a atividade metiltransferase de NS5, aumentam a susceptibilidade de *West Nile virus*, *Japanese encephalitis virus* e *Dengue virus* à restrição por IFIT1 (DAFFIS et al., 2010; KIMURA et al., 2013; LI et al., 2013; SZRETTTER et al., 2012; ZÜST et al., 2013). Da mesma forma que mutações ou a deleção de *nsp16* para os coronavírus da hepatite murina e síndrome respiratória aguda grave (MENACHERY et al., 2014; ZÜST et al., 2011). Mesmo vírus que não possuem 2'-O-metiltransferases evoluíram frente a pressão de seleção de IFIT1. Alfavírus, como o vírus da encefalite equina venezuelana, apresentam uma estrutura secundária adjacente na extremidade 5' do RNA, a qual impede que IFIT1 acesse a região do *cap0* (HYDE et al., 2014). Já o vírus da encefalomiocardite não é inibido por IFIT1, mesmo não possuindo

qualquer tipo de *cap*. A explicação seria que esse picornavírus codifica uma pequena proteína viral, que protege a região 5' do seu mRNA da inibição por IFIT1 (FENSTERL et al., 2012).

Embora IFIT1 possa inibir diretamente a tradução dos seus RNAs alvo, estudos apontam que a formação de um complexo com IFIT2 e IFIT3 é necessária para sua máxima atividade antiviral (HABJAN et al., 2013; PICHLMAIR et al., 2011a). De fato, com exceção de IFIT5, a capacidade de se (homo e hetero) oligomerizar é uma característica importante das proteínas dessa família.

Recentemente foi demonstrado, que IFIT1 pode formar homodímeros em solução. Dependendo da concentração, IFIT1 forma um dímero alongado e anti-paralelo (Figura 5A). No entanto, o papel da formação desses dímeros *in vivo* ainda não está claro, já que mutações na interface de dimerização não interferem na capacidade de ligação a RNAs e inibição da tradução por IFIT1 (ABBAS et al., 2017b).

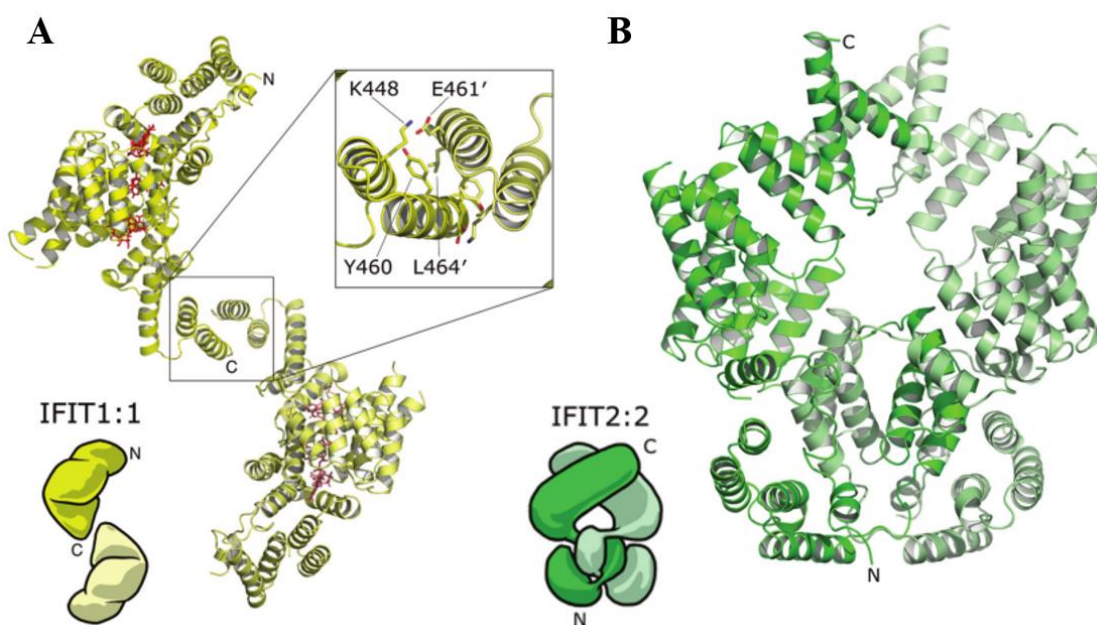


Figura 5 - Homodímeros de IFIT1 e IFIT2. (A) IFIT1 forma um dímero anti-paralelo, cujas moléculas interagem por meio de uma pequena interface C-terminal no TPR9, em destaque no detalhe. (B) Já IFIT2 forma um dímero paralelo por meio da intersecção de domínios idênticos (*domain swapping*) na região N-terminal. Adaptado de: MEARS; SWEENEY, 2018; PDBs: 5W5H e 4G1T.

Por outro lado, IFIT2 forma um homodímero paralelo estável, através da intersecção (*domain swapping*) de três alfa hélices que constituem um TPR e meio do domínio N-terminal de cada molécula (Figura 5B) (YANG et al., 2012). A porção C-



terminal se dobra em uma estrutura super helicoidal, formando um extenso canal carregado que permite a interação da proteína com RNA ricos em adenilato-uridilato (YANG et al., 2012). Experimentos de *pulldown*, com lisados de células HeLa super-expressando IFITs com diferentes caudas de afinidade, Stawowczyk *et al.* (STAWOWCZYK et al., 2011) demonstraram que as moléculas de IFIT2 interagem entre si, com IFIT1 e IFIT3. Quando analisado por sedimentação em gradiente de glicerol, o complexo contendo IFIT1, IFIT2 e IFIT3 migrou entre 150 e 200 kDa, sendo compatível portanto, com um trímero ou tetrâmero de IFITs, respectivamente. O mesmo grupo demonstrou, por meio da super-expressão de versões truncadas de IFIT2, que a interação com IFIT3 ocorre nos quatro primeiros TPRs de IFIT2. Já a interação com IFIT1 parece ser mais inespecífica, ocorrendo em diversos TPRs (STAWOWCZYK et al., 2011). Foi também demonstrado que IFIT1 interage com IFIT2 ou IFIT3 em experimentos de cromatografia por exclusão de tamanho utilizando proteínas recombinantes purificadas (SEC, do inglês, *size exclusion chromatography*) (PICHLMAIR et al., 2011b).

IFIT1, IFIT2 e IFIT3 também foram identificadas como integrantes de um complexo multiproteico maior, referido como interatoma de IFITs (Figura 6), em células tratadas com IFN-I. Pichlmair, et al. (2011b) utilizaram lisados de células HEK293 super-expressando IFIT1, IFIT2, e IFIT3, tratadas ou não com IFN-I em ensaios de purificação de afinidade em *tandem*, conjugada a espectrometria de massas, utilizando essas mesmas proteínas como iscas. Nas amostras de células estimulados com IFN-I, IFIT2 e IFIT3 precipitaram juntamente com IFIT1, com cobertura alta o suficiente para sugerir quantidades equimolares entre as proteínas. Dentre as outras proteínas que interagiram com mais de uma IFIT, estão ribonucleoproteínas, proteínas de ligação a RNA envolvidas no seu processamento e proteínas que se ligam à cauda de poli-adeninas (PICHLMAIR et al., 2011a). Esse resultado em particular, chamou a atenção de que a interação entre as proteínas no interatoma pudesse ser indireta, ou seja, mediada por RNAs que simultaneamente ligam às IFITs.

Nesse contexto, dados anteriores do nosso grupo demonstraram, por meio de técnicas de proteômica, que a interação entre IFIT1:IFIT2:IFIT3 em células é independente da presença de RNAs. Resumidamente, células HEK293T foram cultivadas na presença de aminoácidos isotópicos, transfectadas para super-expressar IFIT1, tratadas ou não com IFN $\alpha$  e então lisadas após 16 horas. IFIT1 continuou sendo capaz de ligar IFIT2 e IFIT3 mesmo quando os lisados foram tratados com nucleases previamente ao *pulldown* (Figura 1 do Anexo IIIa).

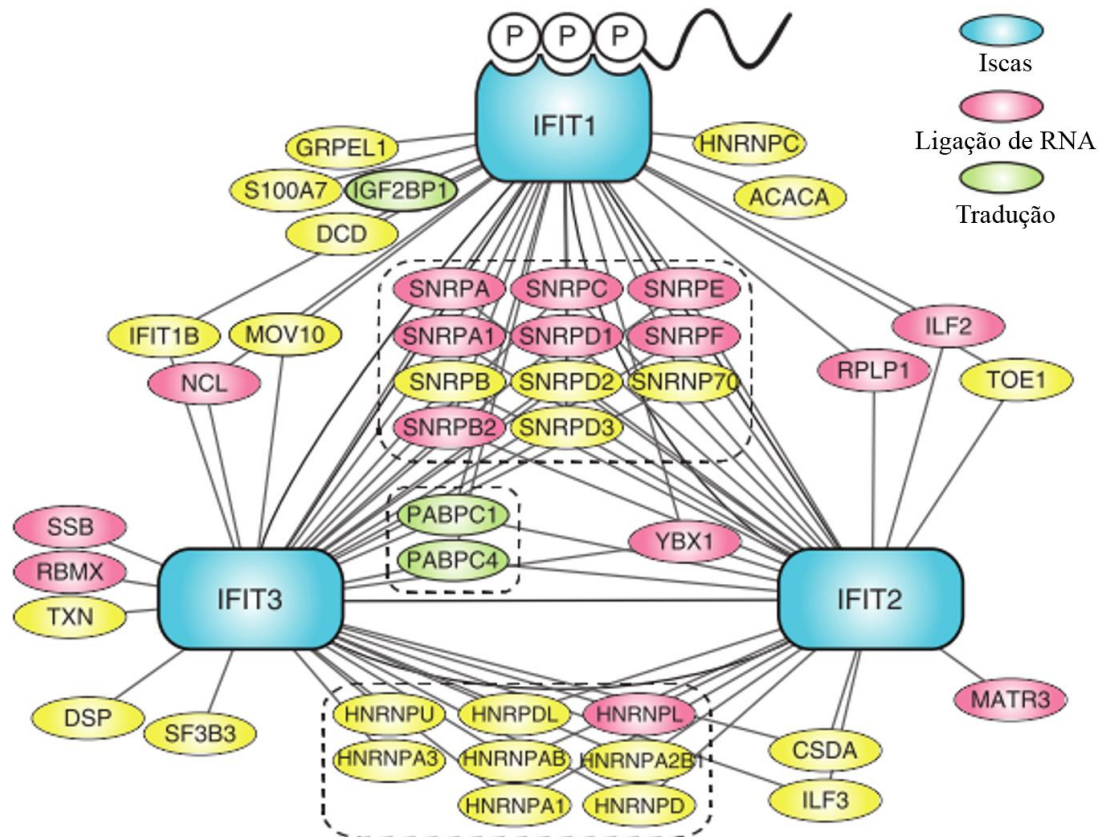


Figura 6 - Interatoma de IFITs. Rede de interação proteica de células tratadas com IFN do tipo I, tendo IFIT1, IFIT2 e IFIT3 como iscas na TAP (nós em azul). Nós em rosa representam proteínas que ligam RNAs e também interagem com IFITs. Em verde as proteínas que interagem com IFITs e estão envolvidas na tradução de mRNA. Adaptado de Pichlmair et al. (2011b).

Apesar dos dados experimentais em células demonstrarem a existência do interatoma de IFITs, os detalhes sobre a interação entre essas proteínas ainda eram pouco conhecidos. Após uma série de otimizações das condições de associação, está aqui demonstrada a primeira reconstituição *in vitro* dos complexos IFIT2:IFIT3 e IFIT1:IFIT2:IFIT3 de que temos conhecimento. Além disso, foi demonstrado o impacto de IFIT3 nos complexos reconstituídos, aumentando a estabilidade, atividade de ligação a RNAs *cap0* e inibição da tradução de IFIT1 *in vitro* e em células.

Por fim, a capacidade de IFIT1 de ligar-se a RNAs próprios foi evidenciada. O complexo IFIT1:IFIT2:IFIT3, recombinante purificado, foi utilizado em um ensaio de *pull-down* com mRNAs de células HEK293Ts tratadas com IFN-I. Os RNAs ligados foram identificados por *RNAseq*. A ligação foi validada em ensaios de imunoprecipitação e o impacto da super-expressão de IFIT1 na tradução desses alvos foi avaliado por diferentes técnicas.



## 2 JUSTIFICATIVA

As IFITs estão entre as proteínas mais expressas durante a resposta celular à infecção viral e, mesmo que seu papel na regulação da tradução celular tenha sido sugerido por anos, os mecanismos pelos quais essas proteínas funcionam foram só recentemente revelados (ABBAS et al., 2013, 2017a; DAUGHERTY et al., 2016; KUMAR et al., 2013; PICHLMAIR et al., 2011b). Acredita-se hoje que muitas das funções desempenhadas por IFIT1 são potencializadas, ou mesmo moduladas, por outras proteínas da mesma família. Alguns trabalhos postularam a existência de um grande complexo contendo IFITs e outras proteínas, o interatoma de IFITs, em células tratadas com IFN-I (PICHLMAIR et al., 2011a; STAWOWCZYK et al., 2011). Contudo o complexo de IFIT1:IFIT2:IFIT3 ainda não havia sido caracterizado *in vitro*, restringindo as possibilidades de testes funcionais e mesmo da resolução por cristalografia.

Um outro conceito relacionado à família tem sido hoje revisado. Por muitos anos acreditava-se que IFIT1 ligava, e inibia a tradução, somente de RNAs contendo extremidades 5' trifosfatadas ou contendo *cap0* (HABJAN et al., 2013; KIMURA et al., 2013; KUMAR et al., 2013). Como em eucariotos superiores os mRNA são normalmente modificados pela adição de grupos metil no primeiro e/ou segundo nucleotídeo transcrito (revisado em: RAMANATHAN; ROBB; CHAN, 2016), IFIT1 foi tida como uma proteína chave no reconhecimento e inibição de RNA não-próprios. Contudo, recentemente foi demonstrado que a proteína pode ligar-se também a RNAs contendo *cap1* (ABBAS et al., 2017a; DAUGHERTY et al., 2016).

Mais experimentos serão necessários para definir a relevância biológica desse achado. Nesse contexto, foi hipotetizado que IFIT1 liga-se também, e modula a tradução, de mRNAs próprios contendo *cap1* e 5' UTR pouco estruturada.

Sabe-se que em humanos, as metilações em *cap0* e *cap1* estão presentes em todas as moléculas de mRNA, enquanto metade das moléculas capeadas e poliadeniladas, são também metiladas no segundo nucleotídeo transcrito (FURUICHI et al., 1975). Essa metilação adicional que se dá pela ação da metiltransferase 2 humana, conferiria uma proteção adicional aos mRNAs próprios contra a inibição de IFIT1. Dessa forma, o repertório de mRNAs protegidos ou disponíveis para inibição poderia estar relacionado com a atividade intrínseca de metilação dessa enzima, e com a estruturação das 5' UTRs dos diferentes mRNAs celulares.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a capacidade de ligação do complexo de IFIT1, IFIT2 e IFIT3 humanas a mRNAs celulares.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reconstituir e caracterizar os complexos de IFIT1, IFIT2 e IFIT3 humanas *in vitro*.
- Definir a interface de ligação de IFIT1 com IFIT2 e IFIT3.
- Verificar se a formação dos complexos modifica a estabilidade, expressão e atividade de IFIT1 *in vitro* e em células.
- Identificar mRNAs celulares que interagem com o complexo IFIT1:IFIT2:IFIT3 *in vitro*.
- Validar o impacto da ligação de IFIT1 na inibição expressão de seus mRNAs alvo em células.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 PLASMÍDEOS

#### 4.1.1 IFIT1

O plasmídeo (pET28b) para expressão heteróloga de IFIT1 em *Escherichia coli* (*E. coli*) foi previamente descrito (KATIBAH et al., 2013), assim como o para IFIT1-R38E (KUMAR et al., 2013). O primeiro foi usado como molde para gerar os demais mutantes de IFIT1 por mutagênese sítio-dirigida.

O plasmídeo (pCDNA3.1) para expressão de IFIT1-FLAG em células de mamíferos já estava disponível no laboratório, e foi utilizado como molde para gerar o mutante de IFIT1-R38E.

##### 4.1.1.1 Mutagênese sítio-dirigida

Anteriormente à PCR, as amostras foram preparadas com 1 U KOD polimerase (Merck), 1x de tampão KOD, 0,2 mM de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 1-1,5 mM de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>), 0,25 µM de cada iniciador, 20 ng de DNA molde e água livre de nucleases para completar 50 µL. O DNA molde utilizado foi o pET28b-IFIT1 ou pCDNA3.1-IFIT1 (item 4.1.1) para mutações pontuais de um único resíduo, e para o mutante duplo Y460E/L464E o plasmídeo pET28b-IFIT1-L464E foi utilizado como molde para inserção da segunda mutação. Os iniciadores utilizados encontram-se na Tabela 1. A PCR se deu pela desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, então 16 ciclos de desnaturação (30 segundos a 95 °C), anelamento (45 segundos a 45 ou 48 ou 51 °C) e extensão (4 minutos a 70 °C) e então, extensão final (70 °C por 10 minutos). Três temperaturas de anelamento foram testadas, já que os primers contendo as mutações não anelam completamente ao molde.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados na mutagênese sítio dirigida de IFIT1.

Mutante	Par de iniciadores
Y460E	5' GAATGAAGCCCTGGAGTACGAAGAGCGGGCC 3' 5' GGCCCGCTCTTCGTACTIONCCAGGGCTTCATTC 3'
L464E	5' GTACTATGAGCGGGCCGAGAGACTGGCTGCTGAC 3' 5' GTCAGCAGCCAGTCTCTCGGCCCGCTCATAGTAC 3'

E450X	5' CGTCTACAAATTGTAATGAAATATGAATGAAGC 3' 5' GCTTCATTCATATTTTCATTACAATTTGTAGACG 3'
R38E	5' CCTGATTTAGAAAACGAAGTCTTGGATCAGATTG 3' 5' CAATCTGATCCAAGACTTCGTTTTCTAAATCAG 3'

Os produtos da PCR foram avaliados em gel de agarose 1 % (Figura 7) e amostras representativas positivas enviadas para sequenciamento no Departamento de Bioquímica da Universidade de Cambridge. Para insertos em pET28b foram utilizados os primers padrão *T7 promoter* e *T7 terminator*, para insertos em pCDNA3.1 foram utilizados os primers *T7 promoter* e BHG, conforme indicação do fabricante. Após a confirmação das mutações, as amostras foram tratadas com DpnI por uma hora a 37 °C.

#### 4.1.2 IFIT2 e IFIT3

As seqüências das regiões codificantes de IFIT2 e IFIT3 (NM\_001547.4 e NM\_001549.5 respectivamente) foram amplificadas por PCR a partir de outro plasmídeo. Os iniciadores utilizados foram modificados de forma a inserir sítios de restrição para NdeI (5') e XhoI (3') para a clonagem em pET28b (Novagen).

##### 4.1.2.1 PCR

As amostras continham 1 U KOD polimerase (Merck), 1x de tampão KOD, 0,2 mM de dNTPs, 1 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0,25 µM de cada iniciador, 50 ng de DNA molde e água livre de nucleases para completar 50 µL. O DNA molde utilizado foi o vetor pCDNA3.1 contendo a seqüência codificante de cada proteína. Os iniciadores utilizados encontram-se na Tabela 2. A PCR se deu pela desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, então 28 ciclos de desnaturação (30 segundos a 95 °C), anelamento (20 segundos a 48 ou 53 ou 58 °C) e extensão (2 minutos a 70 °C) e então, extensão final a 70 °C por 5 minutos.

Tabela 2 - Iniciadores utilizados na amplificação das seqüências codificadoras de IFIT2 e IFIT3.

<b>Proteínas</b>	<b>Par de iniciadores*</b>
IFIT2	5' CAACAACATATGAGTGAGAACAATAAGAATTCC 3' 5' CAACAAC <b>TCGAG</b> TTTCATTCCCCATTCCAGCTTGATG 3'
IFIT3	5' CAACAACATATGAGTGAGGTCACCAAGAATTC 3' 5' CAACAAC <b>TCGAG</b> CTCAGTTCAGTTGCTCTGAGTTAG 3'

\*Em negrito estão destacadas as seqüências para inserção de sítios de restrição para NdeI e XhoI.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1 % (Figura 8A). Aqueles com temperaturas de anelamento mais alta (58 °C) foram purificados utilizando colunas a base de sílica e de acordo com as recomendações do fabricante.

#### 4.1.2.2 Subclonagem em pET28b

As sequências codificantes de IFIT2 ou IFIT3 foram subclonadas em pET28b (Novagen) entre os sítios de restrição de NdeI e XhoI. De acordo com essa construção, a expressão desse plasmídeo gera a produção das proteínas inteiras com um sítio de clivagem para trombina e uma cauda de (seis) histidinas na região N-terminal.

Para digestão, 6 µg de cada produto de PCR purificado ou 10 µg de vetor pET28b foram misturados a 15 U de XhoI, 15 U de NdeI, 1x de tampão 3.1 (todos New England BioLabs - NEB) e água livre de nucleases para completar 60 µL. As amostras foram incubadas por duas horas a 37 °C.

O vetor digerido foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1 % e a banda correspondente foi cortada do gel. Cada reação dos produtos de PCR digeridos foi tratada com 5 U de DpnI (NEB) por 30 minutos, a 37 °C. Logo após a enzima foi inativada pela incubação da amostra a 75 °C por 15 minutos. Os produtos de PCR digeridos e tratados, e também o fragmento de gel contendo o vetor digerido, foram purificados em colunas a base de sílica.

Para ligação foram utilizados 50 ng de vetor digerido, e inserto na proporção de 6:1. Estes foram misturados a 400 U de T4 ligase (NEB), 1x de tampão T4, e água livre de nucleases para completar 20 µL. Foram feitos também controles sem inserto e sem ligase. As reações foram incubadas a 16 °C por 30 minutos e então, 30 minutos a temperatura ambiente. 2 µL de cada ligação foram utilizados para transformar 20 µL de células Dh5α. As colônias obtidas foram expandidas em meio líquido e o DNA plasmidial extraído a partir de minipreparações. Uma pequena alíquota dessas minipreparações foi usada em um teste de restrição, pela digestão com NdeI e XhoI (Figura 8B). As amostras positivas no teste foram sequenciadas.

## 4.2 SUPER-EXPRESSÃO EM *E. coli*

#### 4.2.1 Transformação e indução

As IFITs recombinantes foram expressas em *Rosetta 2 (DE3) pLysS* (Novagen). 100 ng de DNA (pET28b-IFITs) foi adicionado e gentilmente misturado a 50 µL de células competentes. A mistura foi incubada no gelo por dois minutos, submetida a choque térmico (42 °C, por 45 segundos), e novamente incubada no gelo por dois minutos. Foram então adicionados 500 µL de meio líquido LB sem antibiótico e a amostra incubada por 30 minutos, a 37 °C, 200 rpm.

As células foram então recuperadas por centrifugação e espalhadas em meio LB-ágar, contendo canamicina e cloranfenicol (concentração final de 25 e 35 µg/mL respectivamente). As placas permaneceram em estufa a 37 °C, por 15 horas.

As colônias foram então raspadas da placa e homogeneizadas em 1 L de meio 2x TY (Sigma) líquido, contendo canamicina e cloranfenicol (concentração final de 25 e 35 µg/mL respectivamente), e incubadas 37 °C, 200 rpm. Quando as células atingiram OD<sub>600</sub> de aproximadamente 1, foram resfriadas a 4°C. A expressão foi então induzida pela adição de 1 mM de Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG). A cultura induzida foi incubada a 22 °C, 200 rpm, por 15 horas. Uma alíquota das células, antes e após a indução e incubação, foi coletada e analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE, do inglês *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) (Figura 9A).

As células foram sedimentadas por centrifugação a 5.000 x g, a 4 °C, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células mantidas a -80 °C até o momento da lise.

#### 4.2.2 Lise e cromatografia de afinidade

As células induzidas foram homogeneizadas em tampão de lise (20 mM Tris-Cl pH 7,5, 400 mM de cloreto de potássio (KCl), 5 % glicerol, 1 mM de ditioneitol (DTT), 0,5 mM *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF) e 0,5 mg/mL lisozima (Sigma), e submetidas a sonicação. Logo após, os lisados foram centrifugados a 40k x g, 4° C por 30 minutos. O sobrenadante foi então coletado para purificação. Uma alíquota dos lisados após sonicação (fração total) e do sobrenadante após centrifugação (fração solúvel), foi coletada e analisada por SDS-PAGE (Figura 9B).

As IFITs foram então pré-purificadas por cromatografia de afinidade para suas caudas de histidina, usando microesferas de agarose revestidas com níquel (*Ni-NTA Agarose Beads* - Qiagen). A fração solúvel dos lisados foi adicionada a uma coluna contendo as microesferas previamente equilibradas com tampão de lise. Após a ligação, as microesferas foram lavadas em três etapas, com tampão de lise (sem PMSF e lisozima) contendo concentrações crescentes de imidazol (5, 10 e 20 mM). A eluição foi feita em seguida com 200 mM de imidazol em tampão de lise (sem PMSF e lisozima). Uma alíquota da fração não ligada e eluições foi coletada e analisada por SDS-PAGE (exemplo na Figura 9B).

#### 4.2.3 Clivagem da cauda de histidinas: IFIT2 E IFIT3

Após a pré-purificação, as caudas de histidina de IFIT2 e IFIT3 foram clivadas. As eluições foram inicialmente diluídas em um tampão de lise sem KCl, até reduzir a concentração desse sal para 200 mM. As eluições foram então tratadas com trombina, (de plasma bovino, Sigma) aproximadamente 5 U dependendo da concentração de cada eluição, e incubadas a 4 °C por 15 horas. Uma alíquota de cada amostra foi coletada antes da adição da enzima, no momento do tratamento e após a incubação, para comparação e confirmação da clivagem por SDS-PAGE (exemplo na Figura 10).

#### 4.2.4 Purificação por cromatografia de troca iônica e exclusão de tamanho

IFIT1, mutantes, IFIT2 e IFIT3 foram purificados adicionalmente por cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC, do inglês *fast protein liquid chromatography*), utilizando coluna de troca aniônica MonoQ 5/50 (GE Healthcare).

Inicialmente, as eluições (tratadas com trombina no caso de IFIT2 e IFIT3, (ver item 4.2.3)) foram diluídas em tampão de lise modificado, até a concentração final aproximada de 20 mM Tris-Cl pH 7,5, 150 mM KCl e 5 % glicerol. As amostras foram injetadas na coluna a um fluxo de 0,5 mL/minuto. A eluição se deu por gradiente entre os tampões A e B (0 a 100% de B em 50 minutos). Os tampões utilizados continham 20 mM Tris-Cl pH 7,5, 5 % glicerol, 1 mM DTT e 100 (A) ou 500 (B) mM KCl. Foram coletadas frações de 0,5 mL e alíquotas das frações principais foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 11A, C e D).

IFIT1 e mutantes passaram por uma segunda etapa de purificação, utilizando uma coluna de troca catiônica MonoS 5/50 (GE Healthcare). As frações da corrida em MonoQ, dos picos correspondentes a IFIT1, foram misturadas, concentradas e submetidas a troca do tampão, para um contendo 30 mM HEPES pH 7,5, 150 mM KCl e 5 % glicerol. A corrida foi feita exatamente como para MonoQ, exceto pela composição dos tampões A e B: 30 mM HEPES pH 7,5, 5 % glicerol, 1 mM DTT e 100 (A) ou 500 (B) mM KCl (exemplo na Figura 11B).

Quando necessário, IFIT2 e IFIT3 foram ainda purificadas por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC, do inglês *size exclusion chromatography*), utilizando uma coluna Superdex 200 increase 10/300 GL ou HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare). As proteínas foram injetadas e eluíram a um fluxo contínuo de 0,3 (10/300) ou 0,75 (16/600) mL/min, utilizando tampão SEC (20 mM Tris-Cl pH 7,5, 150 mM KCl e 1 mM DTT) (exemplo na Figura 11E).

Todas as purificações por FPLC foram realizadas em ÄKTA Pure e os dados analisados em *software Unicorn 7* (ambos GE Healthcare).

Após estas etapas, as frações contendo as proteínas purificadas foram misturadas e concentradas para uso nos demais experimentos.

#### 4.3 FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS DE IFITs

Vários protocolos para a formação dos complexos de IFITs foram testados, até que as melhores condições de temperatura, concentração, tempo de incubação e tampão fossem definidas. Foi testada inclusive, a co-expressão em sistema heterólogo de IFIT2 e IFIT3, mas os resultados obtidos não foram satisfatórios.

Assim sendo, encontra-se aqui descrita somente a metodologia das figuras mostradas nos Resultados.

Todos os complexos foram formados em tampão SEC (20 mM Tris-Cl pH 7,5, 150 mM KCl e 1 mM DTT). A temperatura para o teste inicial de formação dos complexos foi 4 °C, para evitar a precipitação enquanto da manipulação das proteínas *in vitro*. Quando as proteínas não interagem nessas condições, a temperatura foi elevada a 30 ou 37 °C, de acordo com as condições de precipitação de cada proteína.

##### 4.3.1 Complexos IFIT1:IFIT2 e IFIT1:IFIT3



As proteínas purificadas foram incubadas juntas (concentração final de 1 mg/mL cada), por uma hora a 4 ou 30 °C e analisadas por SEC-MALS (Figuras 13 e 14).

#### 4.3.2 Complexo IFIT2:IFIT3

Para o experimento inicial, as proteínas purificadas foram incubadas juntas (concentração final de 1 mg/mL cada), a 4 °C por uma hora (Figura 15B). As proteínas foram também incubadas em excesso de IFIT2 (0,28 mg/mL de IFIT2 e 0,14 mg/mL de IFIT3), a 30 °C e diferentes tempos de incubação (90 minutos, 6 e 15 horas) (Figura 15A).

Finalmente, as proteínas foram misturadas em menor concentração (0.18 mg/mL cada), a 37 °C por uma hora. O complexo foi concentrado (usando filtro Amicon Ultra 10 kDa – Millipore) previamente à análise por SEC-MALS, para concentração final de 1 mg/mL de cada proteína no momento da injeção (Figura 15B).

#### 4.3.3 Complexo IFIT1:IFIT2:IFIT3

Para formação do trímero, o complexo IFIT2:IFIT3 purificado (Figura 15C) e IFIT1 foram incubados (0,20 ng/mL de cada proteína) a 30 °C, por uma hora. O complexo foi concentrado para 1,3 mg/mL de cada proteína antes da injeção (Figura 16A).

Para formação do tetrâmero, o complexo IFIT2:IFIT3 purificado foi incubado com duas vezes excesso de IFIT1 (0,4 mg/mL de IFIT1, 0,2 mg/mL de IFIT2 e IFIT3), a 30 °C, por uma hora. O complexo foi concentrado para 2,6 mg/mL de IFIT1 e 1,3 mg/mL de IFIT2 e IFIT3 antes da injeção (Figura 16B). Os complexos foram concentrados usando filtros Amicon Ultra de 0.5 mL (10 kDa - Millipore).

### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS E COMPLEXOS POR SEC E SEC-MALS

#### 4.4.1 SEC analítica

A avaliação dos perfis de eluição de IFIT1 selvagem e seus mutantes individualmente, ou combinados com IFIT2 e IFIT3, foi feita por SEC em coluna de gel filtração *Superdex 200 increase 10/300 GL* (GE Healthcare). 200 µL de cada amostra foram injetados em uma alça de 150 µL. As proteínas foram injetadas e eluíram a um

fluxo contínuo de 0,3 mL/min, utilizando tampão SEC, e a absorbância a 280 nm monitorada. O equipamento de FPLC utilizado foi o *ÄKTA Pure* e os dados analisados com o programa *Unicorn 7* (ambos GE Healthcare). Foram coletadas frações de 0,5 mL, que foram analisadas por SDS-PAGE e coloração com *Comassie* (Figuras 18 e 19).

#### 4.4.2 SEC-MALS

Na técnica de SEC-MALS (do inglês, *size-exclusion chromatography with multi-angle light scattering*), a cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) é associada a uma técnica de “dispersão de luz multi-ângulo” (MALS), que permite aferir a massa molar absoluta das espécies que eluem da coluna de gel filtração.

A SEC foi feita em fluxo contínuo de 0,4 mL/min. As proteínas ou complexos foram injetados (100 µL, nas concentrações descritas no item 4.3) em uma coluna de gel filtração *Superdex 200 increase 10/300 GL* (GE Healthcare). As análises de MALS foram feitas pela aferição (em linha/sequência) da dispersão de luz estática (DAWN 8+, Wyatt Technology), índice de refração diferencial (Optilab T-rEX, Wyatt Technology) e absorbância a 280 nm (Agilent 1260 UV, Agilent Technologies). As massas molares foram calculadas usando o programa ASTRA6 (Wyatt Technology) (Figura 12, 13, 14B, 15B e C, 16).

#### 4.5 FLUORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL

A técnica de fluorimetria de varredura diferencial (do inglês *differential scanning fluorimetry*) foi utilizada para determinar a temperatura de desnaturação ( $T_m$ , do inglês *melting temperature*) e, com isso, estimar a estabilidade das IFITs isoladamente ou em complexo (Figura 17). Esse experimento foi realizado em colaboração com a doutoranda Harriet Mears do Laboratório de Regulação da Tradução Viral, da Universidade de Cambridge.

Em uma placa de 96 poços para qPCR (Applied Biosystems), foram adicionados 1:500 de *Protein Thermal Shift dye* (Life Technologies), 0,1 mg/mL de proteína ou complexo, e tampão (concentração final de 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM KOAc, 2,5 mM MgOAc, 5% glicerol, e 1 mM DTT), para um volume final de 20 µL. Foram quatro réplicas técnicas por amostra. Os experimentos foram feitos utilizando *Vii7 Real-Time PCR system* (Applied Biosystems). A emissão de fluorescência a 623 nm foi mensurada

enquanto as amostras eram submetidas a um gradiente de elevação de temperatura, de 25 a 95 °C, e taxa de aumento de 1 °C a cada 20 segundos. Para determinar a  $T_m$ , os dados foram analisados por regressão não linear, utilizando a equação de Boltzmann  $y = LL + (UL - LL)/(1 + \exp((T_m - x)/a))$  onde LL e UL são as intensidades de fluorescência mínima e máxima, respectivamente (NIESEN; BERGLUND; VEDADI, 2007).

#### 4.6 PULLDOWN COM TRÍMEROS DE IFITs RECOMBINANTES E mRNA DE CÉLULAS TRATADAS COM IFN

##### 4.6.1 Tratamento das células com IFN

As células de linhagem HEK293T foram mantidas e propagadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM - Sigma) 1X completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco), 1% de L-glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco)), à temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

Um dia antes do tratamento, as células (33ª passagem) foram distribuídas em placas de cultura celular de 15 cm de diâmetro, ou placas de 6 poços. Ao atingirem 80 % de confluência o sobrenadante das células foi removido e substituído por meio DMEM suplementado (células não tratadas) ou meio DMEM suplementado contendo 1.000 UI/mL de IFN $\alpha$ 2a (Roche) (células tratadas). As células foram então incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, por 12 horas.

##### 4.6.2 Extração do RNA total

Após 12 horas do tratamento, o RNA total das células (placas de 15 cm de diâmetro) foi extraído com *TRI reagent* (Sigma) de acordo com o protocolo de “preparação de amostras” e “isolamento de RNA” do fabricante. As amostras de RNA extraídas foram homogeneizadas em água e a quantidade e qualidade mensuradas no *NanoDrop* (Thermo Fischer) e por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 22A).

O RNA total obtido foi dividido em alíquotas e armazenado a -80 °C, para confirmação da indução por RT qPCR e purificação do mRNA para *pulldown*.

##### 4.6.3 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para cada reação de transcrição reversa (RT), 500 ng de RNA total e 50 µM de iniciadores hexâmeros randômicos foram misturados e diluídos em água livre de nucleases, para um volume final de 10 µL. As amostras foram incubadas a 70 °C por cinco minutos, e depois resfriadas no gelo.

Às amostras de RNA, previamente incubadas com os iniciadores, foram adicionados 15 µL de uma solução de RT, contendo na sua concentração final: tampão M-MLV 1X, 0,4 mM de dNTPs, 20 U de RNaseOUT, 100 U de enzima transcriptase reversa M-MLV e água livre de nucleases para completar o volume (M-MLV e tampão: Promega, demais reagentes: Thermo). As amostras foram incubadas novamente por uma hora a 37 °C, e então cinco minutos a 95 °C. Ao final da RT, elas foram diluídas quatro vezes em água livre de nucleases e mantidas a -20 °C.

#### 4.6.4 PCR quantitativo em tempo real

Todas as reações foram preparadas em placas do tipo *MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate* (Applied Biosystems). Cada reação de PCR foi preparada com 5 µL de cDNA diluído (conforme item 4.6.3) 0,1 µM de cada iniciador (concentração final), 12,5 µL de 2x EGTP e água livre de nucleases para completar 25 µL. O reagente “2x EGTP” é preparado no laboratório, contendo *qPCR core kit SybrGreen (no Rox)* (Eurogentec), *SybrGreen* (Molecular Probes), Betaina 5 M (Sigma) e *ROX Passive Reference* (Eurogentec). Os iniciadores utilizados podem ser observados na tabela a seguir.

Tabela 3 - Iniciadores utilizados na qPCR

Gene	Par de iniciadores
ACTB: β-actina (humana)	5' TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTG 3' 5' GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA 3'
RSAD2: viperin (humana)	5' CCT GTC CGC TGG AAA GTG TT 3' 5' GAC ACT TCT TTG TGG CGC TC 3'
IFIT1 (humana)	5' GCG CTG GGT ATG CGA TCT C 3' 5' CAG CCT GCC TTA GGG GAA G 3'

A PCR foi realizada no *Vii7 Real-Time PCR system* (Applied Biosystems), de acordo com as condições de amplificação descritas na Tabela 4, seguida da curva de

dissociação dos iniciadores. Os dados de *threshold*, *baseline* e *Ct*, foram obtidos e analisados inicialmente através do programa *QuantStudio Real-Time PCR*.

Tabela 4 - Condições de amplificação da qPCR (QuantStudio)

<b>Etapa</b>	<b>Número de ciclos</b>	<b>Temperatura/Tempo</b>
Ativação inicial	1	55 °C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos.
PCR	40	95° C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto.

O gene de  $\beta$ -actina, foi utilizado como controle endógeno. A análise da expressão relativa dos genes foi feita pelo método do  $\Delta\Delta C_t$ , sendo que nos gráficos, os dados estão plotados de acordo com a expressão relativa de cada gene em relação à amostra não tratada, ao qual foi atribuído o valor de 1 (Figura 22B).

#### 4.6.5 *Western blot* (LI-CORE)

Uma parte das células tratadas e não tratadas com interferon (item 4.6.1 – placas de 6 poços) foi utilizada para extração proteica e *Western blot* (WB).

Após 12 horas de tratamento, as células foram lavadas com PBS 1X, e lisadas com tampão de lise RIPA (Thermo), contendo inibidores de protease (Merck). A concentração proteica de cada amostra foi avaliada por *BCA Protein Assay Kit* (Thermo), de acordo com as recomendações do fabricante.

As proteínas (40  $\mu$ g de cada amostra) foram resolvidas por SDS-PAGE (12,5 %) e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada e, então incubada com anticorpo de rato anti-tubulina (abcam). Após as lavagens, foi adicionado o anticorpo secundário de cabra anti-rato IRDye® 680RD (LI-CORE). A membrana foi novamente lavada, incubada com anticorpo primário de coelho, anti-IFIT1 (Pierce) e secundário de burro, anti-coelho IgG (H+L) IRDye® 800CW (LI-CORE). As proteínas marcadas foram visualizadas em *Odyssey CLx Imaging System* (LI-CORE) (Figura 22C).

#### 4.6.6 Purificação do mRNA

O mRNA foi purificado a partir do RNA total de células tratadas com interferon (item 4.6.2) pelo uso de Dynabeads® Oligo (dT)<sub>25</sub> (Thermo), de acordo com as

recomendações do fabricante. O procedimento foi repetido, com o RNA proveniente da primeira purificação, para garantir o enriquecimento de mRNA. Em seguida, o mRNA foi avaliado por *NanoDrop* e eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 22D, canaleta da esquerda).

#### 4.6.7 RNA globina-Fluc defosforilado

Uma construção existente no Laboratório, contendo o gene da (*firefly*) luciferase (Fluc), flanqueado pelas sequências 5' e 3' UTR da  $\beta$ -globina humana (NM\_000518.4), e um promotor T7 na região 5', clonados em pUC57, foi utilizada como molde para transcrição *in vitro*.

O plasmídeo foi inicialmente linearizado com FspI. O RNA foi transcrito usando uma polimerase recombinante T7 (concentração final de 50 ng/ $\mu$ L) em tampão de transcrição (40 mM HEPES pH 7.5, 32 mM MgOAc, 40 mM DTT, 2 mM espermidina, 10 mM NTPs, 0,2 U/ $\mu$ L RNaseOUT (Invitrogen)) por 4 horas a 37 °C. O RNA foi tratado com DNaseI e purificado por extração com fenol e precipitação com etanol. Nucleotídeos residuais foram removidos usando colunas *Illustra MicroSpin G-50* (GE Healthcare).

O RNA foi então tratado com *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (NEB) (3U/ $\mu$ g de RNA) em tampão CutSmart 1x (NEB) acrescido de 0,35 U/ $\mu$ L de RNaseOUT (Thermo), por 4 horas a 37 °C. Em seguida, o RNA de  $\beta$ -globina defosforilado (RNA OH-globina) foi novamente extraído com fenol, precipitado com etanol e avaliado por eletroforese em gel de agarose (Figura 22D, canaleta da direita).

#### 4.6.8 Produção dos trímeros

O complexo IFIT2:IFIT3 foi produzido como descrito no item 4.3.2, em larga escala, e purificado por SEC em *HiLoad 16/600 Superdex 200 pg* (GE Healthcare). Este foi então utilizado para produção do complexo trimérico IFIT1:IFIT2:IFIT3 ou IFIT1-R38E:IFIT2:IFIT3, conforme descrito no item 4.3.3. Os trímeros foram purificados em várias repetições do experimento descrito no item 4.4.1 (Figura 23).

#### 4.6.9 *Pulldown* com trímero purificado

Diversos experimentos foram feitos, utilizando diferentes controles, reagentes, concentrações, e RNAs sintéticos com diferentes tipos de *cap* e 5' UTR mais ou menos estruturados (dados não mostrados). Está descrito aqui somente o protocolo final, otimizado para mRNA, que foi utilizado para preparação das amostras para *RNAseq*.

Foram 14 amostras no *pulldown*, testando a ligação de IFIT1:IFIT2:IFIT3 ou IFIT1-R38E:IFIT2:IFIT3 com mRNA de células HEK293T tratadas com IFN $\alpha$  2a, na presença ou ausência de um RNA bloqueador (OH-globina). Foram feitos também controles sem proteína. Cada condição foi testada em triplicata como esquematizado na Tabela 8.

Inicialmente, 11,2  $\mu$ g de IFIT1 (ou IFIT1-R38E), na forma do trímero IFIT1:IFIT2:IFIT3, em tampão PDB (150 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-Cl pH 7,5), foram incubados com 40 U RNaseOUT, por 2 minutos a 30 °C (mesmo volume em tampão ao invés de proteína para amostras 5 e 6). Metade das amostras foram incubadas com 1  $\mu$ g de RNA OH-Globina por 10 minutos a 30 °C (amostras 2, 4 e 6). Por fim, todas as amostras receberam 1  $\mu$ g de mRNA de células HEK293T tratadas com interferon, e permaneceram incubadas por 30 minutos a 30 °C. Nesse estágio de ligação, o volume total das amostras era 100  $\mu$ L e a concentração de IFIT1 (ou -R38E) 1  $\mu$ M.

Após a ligação, foram adicionados 1  $\mu$ g de anticorpo anti cauda de (6x) histidinas (Thermo) em cada amostra, seguido de incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. Para completar o *pulldown*, foi adicionado 1 mg de microesferas magnéticas recobertas com proteína A (*Dynabeads Protein A* - Thermo), por reação. As amostras foram incubadas por 45 minutos, a temperatura ambiente, e homogeneizadas por pipetagem de 10 em 10 minutos.

As microesferas foram lavadas três vezes num processo que consistia da disposição dos tubos com amostras em uma estante magnética, descarte do sobrenadante e lavagem com tampão PDB contendo 0,02% de Tween 20. Após o descarte do sobrenadante da última lavagem, foram adicionados 50  $\mu$ L de solução de proteinase K (1,5 % SDS e 0,125 U de proteinase K (Thermo) em tampão Tris-Cl 10 mM, pH 7,5) às microesferas, e estas foram incubadas por 30 minutos a 42 °C, com uma homogeneização por pipetagem após os 15 minutos iniciais. Ao final da digestão, as microesferas foram sedimentadas por centrifugação e o sobrenadante transferido para novos tubos.

O RNA foi extraído do sobrenadante com fenol, em duas etapas, e então com clorofórmio. Permaneceu precipitando em solução contendo 1  $\mu$ g de *GlycoBlue* (Thermo), 0,1 volumes de 3M NaOAc pH 5,0 e 3 volumes de etanol 100%, por 15 horas

a -80 °C. Após a precipitação, o RNA foi recuperado por centrifugação, lavado em etanol 70 % e homogeneizado em tampão TE (5 µl por amostra).

#### 4.7 PREPARAÇÃO DAS BIBLIOTECAS E *RNASEQ*

As amostras de RNA provenientes do *pulldown* (Tabela 8), assim como uma alíquota do mRNA original foram enviadas para o Departamento de Bioquímica da Universidade de Cambridge (Cambridge-UK), para preparação das bibliotecas e sequenciamento.

As bibliotecas foram preparadas com o *TruSeq RNA Library Prep Kit v2* (Illumina), tratando as amostras como mRNA, isto é, o enriquecimento para mRNA (primeira etapa do protocolo) não foi realizado. O sequenciamento de alto rendimento foi realizado em plataforma Illumina NextSeq500, 75 ciclos para *single-end reads* (800 M).

#### 4.8 ANÁLISES DO *RNASEQ*

Todas as análises *in silico* foram feitas em um servidor linux com as seguintes configurações: Intel(R) Xeon(R) CPU E5-2670 2.60GHz, 24 processadores e 50 Gb de memória RAM.

Para avaliar a qualidade do sequenciamento base a base, as *reads* brutas de cada amostra foram submetidas a análise utilizando a ferramenta *FastQC* (exemplo na Figura 24A) (ANDREWS, 2010). Logo após, os adaptadores e as bases com baixa qualidade foram excluídos, utilizando o *Trimmomatic* (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). Esse algoritmo permite alinhar a lista de adaptadores com as *reads* e, então, descartar a porção da *read* correspondente ao adaptador. Em seguida as bases são filtradas a partir da qualidade e de acordo com um tamanho mínimo de comprimento da *read*. Nesse caso, foram utilizados os seguintes parâmetros: pontuação *phred33* mínima de 20 nas primeiras e últimas bases, mínima de 25 quando analisando uma janela de leitura de 5 em 5 bases; e comprimento mínimo da *read* filtrada de 38 bases (equivalente a 50% do tamanho da *read* original).

Em seguida, as *reads* foram mapeadas no genoma de referência (Figura 24B). Para tal foi utilizada a versão do genoma humano disponível no *Ensembl* na época (montagem GRCh38.p10). Ao arquivo do genoma, foi adicionada a sequência do gene do RNA bloqueador utilizado no *pulldown* (OH-globina), previamente à indexação. O



mapeamento foi feito utilizando o STAR (do inglês: *Spliced Transcripts Alignment to a Reference*) (DOBIN et al., 2013). Esse mapeador apresenta a vantagem de ter sido desenvolvido especificamente para lidar com dados de *RNAseq*, que apresentam particularidades como *reads* que não alinham de forma contínua no genoma, devido ao processamento dos mRNAs nas junções de *splicing*. O programa inicialmente busca pelo melhor alinhamento para o prefixo das *reads* utilizando a estratégia de *Maximal Mappable Prefix*, até atingir um sítio de *splicing* ou o final da *read*. Caso a *read* não tenha sido alinhada totalmente, ele reinicia o processo, buscando alinhar a parte restante no genoma. Foram utilizados os parâmetros de alinhamento padrão do algoritmo (que são otimizados para genomas de mamíferos). Após o mapeamento, as *reads* que mapeavam em cada posição do genoma, dentro do subgrupo de “genes”, foram contadas com o *featureCounts* do pacote *Subread* (LIAO; SMYTH; SHI, 2014).

A variabilidade entre as *lanes* de cada amostra foi verificada em uma análise de componentes principais (PCA, dados não mostrados). Os dados das *lanes* de cada amostra foram agrupados nas réplicas que, por sua vez, também foram analisadas por PCA (Figura 24C). Essas análises foram feitas excluindo as contagens para o gene OH-globina. Por fim, as bibliotecas foram normalizadas por tamanho, obtendo assim o número de contagem por milhão (cpm) dos transcritos sequenciados. Nessa etapa, foram excluídos da análise todos os genes sem contagem e a amostra 2C, que teve poucas *reads* mapeadas.

#### 4.8.1 Análise do enriquecimento de mRNAs ligados a IFIT1 no *RNAseq*

Nesta etapa o resultado do sequenciamento das amostras foi comparado com o objetivo de encontrar possíveis alvos dentre os mRNAs celulares, que se ligariam ao *binding pocket* de IFIT1. Dessa forma, foram comparados os RNAs recuperados e sequenciados do *pulldown* contendo IFIT1 selvagem *versus* aqueles contendo IFIT1-R38E. Como a amostra 2 continha o trímico com IFIT1 selvagem, tratado com RNA de bloqueio e, dessa forma, com menor possibilidade interações inespecíficas, essa foi a amostra escolhida para a comparação com as demais.

As amostras 2A e 2B foram comparadas com todas as réplicas das amostras 1, 3 e 4. Uma tabela foi feita com o resultado de cada divisão do valor de cpm das amostras 2, pelo valor de cpm das demais amostras para todos os genes (exemplo para o gene PELI3 na Tabela 5, abaixo).

Tabela 5 - Comparações entre amostras sequenciadas do *pulldown* para o gene PELI3

<b>PELI3</b>	<b>2A/1A</b>	<b>2A/1B</b>	<b>2A/1C</b>	<b>2A/3A</b>	<b>2A/3B</b>	<b>2A/3C</b>	<b>2A/4A</b>	<b>2A/4B</b>	<b>2A/4C</b>
	2.4921	0.8546	2.1542	5.8897	11.204	1.2566	1.3835	2.8773	3.1817
	<b>2B/1A</b>	<b>2B/1B</b>	<b>2B/1C</b>	<b>2B/3A</b>	<b>2B/3B</b>	<b>2B/3C</b>	<b>2B/4A</b>	<b>2B/4B</b>	<b>2B/4C</b>
	1.7673	0.6061	1.5277	4.1767	7.9456	0.8911	0.9811	2.0405	2.2563

Os dados foram então filtrados, mantendo somente os genes que possuíam valor maior ou igual a dois em pelo menos duas comparações entre as réplicas de 2 e as réplicas de 3 e 4. No exemplo da tabela acima, o gene foi mantido, pois:

- apresentou pelo menos dois valores maiores que dois na comparação de 2A dividido pelas réplicas de 3 e 4 (células sombreadas);

E

- apresentou pelo menos dois valores maiores que dois na comparação de 2B dividido pelas réplicas de 3 e 4 (células sombreadas).

Após a filtragem, foram excluídos da lista de genes, aqueles com contagens nas amostras 5 e 6 (possíveis interações inespecíficas). A tabela final ficou com 168 genes, sendo que todos apresentavam contagens nas réplicas da amostra 1. Os dados de contagem para esses genes por amostra foram visualizados e agrupados em um *heatmap* de acordo com a distância euclidiana entre eles (Figura 24D).

Esses 168 genes foram analisados quanto ao enriquecimento funcional para termos de ontologia gênica com a ferramenta GOSEq (YOUNG et al., 2010), utilizando parâmetros padrão (Anexo I).

A partir dos valores de cpm, da taxa de enriquecimento na amostra 2 (*versus* 3 e 4), e da análise de enriquecimento funcional, foram escolhidos alguns genes para avaliação *in silico* da estrutura do mRNA na 5' UTR, e para ensaios adicionais de validação dos dados obtidos na *RNAseq*.

#### 4.9 ANÁLISE *IN SILICO* DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA 5' UTR DOS mRNAs ALVO DE IFIT1

Como mencionado no item anterior, alguns genes candidatos a alvos de ligação por IFIT1 foram escolhidos para a análise da estrutura secundária da extremidade 5' UTR dos seus mRNAs. Os 50 primeiros nucleotídeos de cada transcrito foram analisados. Como um mesmo gene poderia dar origem a diferentes transcritos, com variações nesses

primeiros nucleotídeos, um alinhamento de sequências foi feito comparando essa região nos transcritos do mesmo gene (dados não mostrados). A avaliação da estrutura secundária foi feita para todas as variações dessa região, quando em número reduzido, ou utilizando somente as regiões presentes nos transcritos mais abundantes ou a sequência de referência no NCBI.

Esses 50 nucleotídeos iniciais da extremidade 5' UTR de cada transcrito foram analisados por meio da ferramenta *mFold* (ZUKER, 2003), utilizando parâmetros padrão para dobramento de RNAs.

#### 4.10 TRANSFECCÃO HEK293 COM CLORETO DE CÁLCIO

As células de linhagem HEK293 foram mantidas e propagadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM - Sigma) 1X completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco), 1% de L-glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco)), à temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

Dois dias antes da transfecção, as células (2<sup>a</sup> ou 3<sup>a</sup> passagem pós descongelamento) foram distribuídas em placas de cultura celular de 6 poços (2 mL meio/poço). A transfecção foi feita quando as células atingiram 95 % de confluência. O protocolo aqui descrito refere-se a transfecção de um poço, de uma placa de 6 poços, e foi proporcionalmente ajustado quando mais poços foram transfectados ao mesmo tempo.

Inicialmente foi preparada uma mistura contendo 25 µL de cloreto de cálcio 2M, 3,3 µg de plasmídeo e 0,1X de tampão Tris-EDTA (pH 7,6) em volume suficiente para completar 50 µL. Essa solução foi incubada em temperatura ambiente por 20 minutos e, então misturada gota a gota com um volume igual de uma solução de 2X HBS (NaCl 0,28 M, HEPES 0,05 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 mM, em pH final de 7,05 ajustado com 5 N NaOH). A mistura resultante foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente.

Após a incubação, 1 mL do sobrenadante foi retirado do poço e, a este foram adicionados 100 µL da mistura de transfecção. As células foram então incubadas à temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por três horas. Depois, o sobrenadante foi removido, substituído por meio DMEM completo fresco (com 5% de SFB) e as células recolocadas na incubadora.

#### 4.11 WESTERN BLOT

O protocolo aqui descrito foi utilizado para todos os *Western blots*, com exceção daquele utilizado para confirmação da indução por IFN, no protocolo de *pulldown* descrito no item 4.6.5.

As células foram lavadas com salina, soltas da placa por pipetagem e coletadas em microtubos. Após centrifugação (420 x g, temperatura ambiente, por 5 minutos) o sobrenadante foi descartado e as células lisadas pela adição de tampão de lise (50 mM de Tris HCl pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 % de Triton X-100, contendo inibidores de protease (Merck)), e o lisado incubado em gelo por 30 minutos. O lisado foi então centrifugado (12.000 x g, 4° C, por 10 minutos) e o sobrenadante coletado. O sobrenadante foi mantido a -80° C até o momento do uso. A concentração proteica de cada amostra foi avaliada pelo uso do *BCA Protein Assay Kit* (Thermo), de acordo com as recomendações do fabricante.

As proteínas (40 µg de cada amostra) foram resolvidas por eletroforese em gel de poliacrilamida caseiro (10 %) desnaturante ou em géis comerciais tipo gradiente (NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels – Thermo). As proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (GE), que foi então bloqueada em solução de leite desnatado 5% em TBST 1X, por uma hora, sob agitação, a temperatura ambiente.

Após o bloqueio as membranas foram transferidas para tubos de centrífuga de 50 mL, e incubadas com uma solução contendo anticorpo primário, por uma hora a temperatura ambiente, ou overnight a 4° C, em rotação lenta.

Após retirada da solução de anticorpo primário, as membranas foram lavadas três vezes com TBST 1X, por 5 minutos em temperatura ambiente, e então incubadas com anticorpo secundário por uma hora, temperatura ambiente, sob rotação lenta. A solução foi então retirada, e a membrana lavada três vezes com TBST 1X, e uma vez com TBS 1X.

A solução de revelação caseira foi preparada pela adição de 22 µL de ácido p-cumárico, 50 µL de luminol e 3 µL de peróxido de hidrogênio (nessa ordem) a 10 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8.6. Essa solução foi colocada sobre a membrana e permaneceu em contato por 90 segundos, sob agitação e ao abrigo da luz. Em seguida, a membrana foi colocada em um cassete fotográfico. Filmes fotográficos foram expostos à membrana em diferentes tempos e então revelados.

#### 4.11.1 Anticorpos primários

Todos os anticorpos primários foram diluídos em TBST contendo 1% de soroalbumina bovina.

- anti IFIT1: anticorpo policlonal de coelho, anti ISG56 humana (Thermo, PA3-848) na diluição de 1:1.000.

- anti IFIT3: anticorpo policlonal de coelho, anti IFIT3 humana (ProteinTech, 15201-1-AP), na diluição de 1:500.

- anti  $\beta$ -actina: anticorpo monoclonal de camundongo (AC-15), anti  $\beta$ -actina humana (abcam, ab6276), na diluição de 1:2.000.

- anti FLAG: anticorpo monoclonal de camundongo (M2), anti peptídeo FLAG (Sigma, F3165), na diluição de 1:500.

- anti IKBKG: anticorpo monoclonal de camundongo (DA10-12), anti IKK $\gamma$  humana (Cell Signalling, 2695) na diluição de 1:1.000.

- anti puromicina: anticorpo monoclonal de camundongo (12D10), anti puromicina (Merck MABE343), na diluição de 1:20.000.

#### 4.11.2 Anticorpos secundários

Anticorpos secundários também foram diluídos em TBST contendo 1% de soroalbumina bovina.

- anti coelho: anticorpo de cabra, anti IgG de coelho, conjugado a HRP (Cell Signalling, 7074), na diluição de 1:5000.

- anti camundongo: anticorpo de cavalo, anti IgG de coelho, conjugado a HRP (Cell Signalling, 7076), na diluição de 1:10.000.

#### 4.12 IMUNOPRECIPITAÇÃO IFIT1-FLAG E RNA CELULARES

Células HEK293 foram transfectadas com cloreto de cálcio conforme descrito no item 4.10. Uma placa de 6 poços foi transfectada com o vetor vazio (vv, pCDNA3.1), uma com o vetor para expressão de IFIT1 selvagem e uma com o vetor para IFIT1-R38E.

Após 36 horas de transfecção, as células foram soltas da placa por pipetagem, homogeneizadas no sobrenadante e coletadas (todos os 6 poços de uma mesma amostra)

em um tubo de centrífuga de 15 mL. As células foram centrifugadas (420 x g, por 5 minutos a temperatura ambiente), e o sobrenadante descartado. As células foram homogeneizadas em 1 mL de salina, transferidas para um microtubo de 1,5 mL e centrifugadas (420 x g, por 5 minutos a 4° C). O sobrenadante foi descartado e as células lavadas novamente com 1 mL de salina, seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante.

As células foram então homogeneizadas em 1 mL de tampão de lise gelado (50 mM Tris HCl pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 % de Triton X-100, contendo 100U RNaseOUT/mL (Thermo) e inibidores de protease (Merck)), e incubadas a 4° C, sob rotação lenta, por uma hora. O lisado foi então centrifugado (12.000 x g, 4° C, por 10 minutos) e o sobrenadante coletado e mantido a 4° C até a imunoprecipitação. Alíquotas do lisado total (LT) foram coletadas para *Western blot*.

#### 4.12.1 Imunoprecipitação

A imunoprecipitação (IP) de IFIT1-FLAG foi feita usando microesferas de agarose conjugadas a anticorpo anti-FLAG M2 (*ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel*, Sigma, A2220), seguindo as orientações do fabricante, com adaptações.

Resumidamente, 40 µL de microesferas (volume líquido) foram utilizados para cada reação de IP. As microesferas foram lavadas duas vezes com TBS (Tris HCl 50 mM e NaCl 150 mM, pH 7,4), uma vez com solução de glicina-HCl 0,1M (pH 3,5) para remoção de anticorpos não ligados, e novamente lavadas três vezes com TBS. Exatamente 1 mL de cada lisado (proveniente de uma placa de 6 poços de células transfectadas) foi adicionado às microesferas e estas permaneceram incubadas a 4° C, sob rotação lenta, durante 12 horas para ligação. Depois as microesferas foram sedimentadas por centrifugação e o sobrenadante recolhido. Uma alíquota de sobrenadante foi coletada para *western blot* (fração não ligada, “NL”). As microesferas, por sua vez, foram lavadas cinco vezes com 1 mL de TBS.

Após as lavagens, a eluição da proteína ligada às microesferas se deu pela adição de uma solução de eluição contendo 150 ng/µL de peptídeo 3X FLAG, em TBS. A solução de eluição permaneceu em contato com as microesferas durante 30 minutos, a 4° C e sob rotação lenta e constante. As microesferas foram então sedimentadas por centrifugação e o sobrenadante coletado. Parte do sobrenadante foi coletada para *western blot* (fração ligada, “Lig”), e o restante utilizado para extração de RNA e RT-qPCR.

Para o *western blot* das frações provenientes da IP (Figura 25B e C), a concentração proteica não foi mensurada. Ao invés disso, foram aplicados no gel volumes iguais de cada fração, permitindo observar caso houvesse quantidades diferentes das proteínas (selvagem ou mutante) nas respectivas IPs. Foram utilizados 20  $\mu\text{L}$  de lisado total (LT), 20  $\mu\text{L}$  da fração não ligada (NL) e 10  $\mu\text{L}$  da fração ligada (L) (os dois primeiros correspondendo a 2% do volume total/ IP, e o último a 10% respectivamente). Em geral, o protocolo utilizado foi aquele descrito no item 4.11. As bandas resultantes das frações ligadas de IFIT1 selvagem e IFIT1-R38E foram avaliadas quanto a intensidade com o programa *ImageJ*.

#### 4.12.3 Extração do RNA

Alíquotas da fração ligada das IPs foram utilizadas para extração de RNA. Para servir como controle endógeno do processo de extração, foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de norovírus murino (titulação  $6,75 \times 10^6$  unidades formadoras de placa/mL) às amostras. A extração foi feita com TRIzol (Thermo) de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras de RNA extraídas foram homogeneizadas em água e a quantidade e qualidade mensuradas no *NanoDrop* (Thermo Fischer). O RNA total obtido foi armazenado a  $-80^\circ\text{C}$ .

#### 4.12.4 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para cada reação de transcrição reversa (RT) das frações ligadas, foram utilizados 11,5  $\mu\text{L}$  de RNA, sem normalização pela concentração.

Às amostras de RNA foram adicionados 8,5  $\mu\text{L}$  de uma solução de RT, contendo na sua concentração final: tampão M-MLV caseira 1X, 0,625 mM de dNTPs, 10 mM de DTT, 100 ng de iniciadores randômicos e 0,25  $\mu\text{L}$  de enzima transcriptase reversa M-MLV purificada no laboratório. As amostras foram submetidas a um ciclo de incubação tempo/temperatura em termociclador, conforme segue:  $25^\circ\text{C}$  por 10 minutos,  $37^\circ\text{C}$  por duas horas e  $87^\circ\text{C}$  por cinco minutos. Ao final da RT, as amostras foram diluídas duas vezes, em água livre de nucleases, e mantidas a  $-20^\circ\text{C}$ .

#### 4.12.5 PCR quantitativo em tempo real

Todas as reações foram preparadas em placas do tipo *MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate* (Applied Biosystems). Cada reação de PCR foi preparada com 2 µL de cDNA diluído (conforme item 4.12.4) 0,1 µM de cada iniciador (concentração final, ou 0,25 µM para os iniciadores de norovírus), 5 µL de 2x *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega) e água livre de nucleases para completar 10 µL. Os iniciadores utilizados podem ser observados na tabela a seguir.

Tabela 6 - Iniciadores utilizados na qPCR

Gene	Par de iniciadores
hCXCR4	5' CTCCTCTTTGTCATCACGCTTCC 3' 5' GGATGAGGACACTGCTGTAGAG 3'
hDAD1	5' CAGTTCGGTACTGTCTCCTCG 3' 5' GGAGATGCCTTGGAAATCCGCT 3'
hZNF584	5' TGTGACTCCAGTCAGCAGAGCA 3' 5' TGAGTGTCTGGTGCTGGATGA 3'
hCLU	5' ACGAAGAGCGCAAGACACTG 3' 5' ATGGTCTCATTGCACACTCCT 3'
hLARP6	5' TGAAAACCTGGAGAAGGACGCC 3' 5' ATGTGCTGTGGTTCTCCAGTCC 3'
hIKBKG (NEMO)	5' GCACCTGCCTTCAGAACAGG 3' 5' ATCTGGTTGCTCTGCCGG 3'
hFRS3	5' CTATGGCTACGACTCCAACCTC 3' 5' GCACTGCATCAGATCCTGAAGG 3'
hPELI3	5' CATCTATGCCGCTGGCTTCGAT 3' 5' GTGCATCACCAGGACTCCATTG 3'
hTOP1	5' GAACAAGCAGCCCGAGGATGAT 3' 5' TGCTGTAGCGTGATGGAGGCAT 3'
hUQCC1	5' CCGAGCATGTGGTGGATCAGAA 3' 5' ACCTTCTCCTCAACAGGCTGTG 3'
Norovírus murino	5' CAC GCC ACC GAT CTG TTC TG 3' 5' GCG CTG CGC CAT CAC TC 3'

A PCR foi realizada no *StepOnePlus PCR system* (Applied Biosystems), de acordo com as condições de amplificação descritas na Tabela 7, seguida da curva de dissociação dos iniciadores. Os dados de *threshold*, *baseline* e *Ct*, foram obtidos e analisados inicialmente através do programa *StepOne Software v2.3*.



Tabela 7 - Condições de amplificação da qPCR (StepOnePlus)

<b>Etapa</b>	<b>Número de ciclos</b>	<b>Temperatura/Tempo</b>
Ativação inicial	1	95°C por 2 minutos.
PCR	40	95° C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto.

A amplificação do gene do norovírus murinho foi utilizada como controle interno da eficiência de extração e RT-qPCR. A análise da expressão relativa dos genes foi feita pelo método do  $\Delta\Delta C_t$ , sendo os resultados apresentados de acordo com a expressão relativa do norovírus (gene de referência) na amostra transfectada com o vetor vazio (amostra calibradora), ao qual foi atribuído o valor de 1. Os resultados da fração ligada (taxa de ligação) foram normalizados de acordo com a quantidade de proteína (intensidade da banda) no lisado total das respectivas amostras.

#### 4.13 TESTE DE INIBIÇÃO DA TRADUÇÃO COM IFIT1 E IFIT1-R38E

Células HEK293 foram cultivadas em placas de seis poços e transfectadas com vetor vazio, ou para expressão IFIT1 ou IFIT1-R38E, conforme descrito no item 4.10. Três horas após a transfecção o meio contendo cálcio foi retirado e substituído por meio DMEM completo (células não tratadas) ou meio contendo 1.000 U de IFN $\beta$  1a/mL (tratadas IFN $\beta$ ). As células foram novamente incubadas (37° C, 5% CO $_2$ ) por 13 horas e, então, tratadas com puromicina (Gibco) na concentração final de 1  $\mu$ g/mL de meio. Após duas ou três horas, as células foram lisadas e as proteínas avaliadas por WB (protocolo item 4.11, Figura 26A).

##### 4.13.1 Tradução de alvos específicos após super-expressão de IFIT1: IKBKG E CXCR4

Da mesma forma, células HEK293 foram transfectadas com vetor vazio, IFIT1 ou IFIT1-R38E, conforme descrito no item 4.10. Vinte e quatro horas após a transfecção metade dos poços foi tratado com 1.000 U de IFN $\beta$  1a/mL de meio e as células novamente incubadas (37° C, 5% CO $_2$ ).

Para avaliar a expressão de IKGKB, as células foram lisadas 40 ou 48 horas após a transfecção (16 e 24 horas após o tratamento com IFN $\beta$ , respectivamente) e a fração proteica analisada por WB (protocolo no item 4.11, Figura 26B).

Para avaliar a expressão de CXCR4, as células foram analisadas por citometria de fluxo. Trinta e seis horas após a transfecção (e 12 horas após o tratamento com IFN $\beta$ ) as células foram lavadas com solução salina, transferidas para microtubos de 1,5 mL e, então, sedimentadas por centrifugação (todas as centrifugações foram feitas 460 x g por 5 minutos, 4° C). A lavagem foi repetida pela adição de 500  $\mu$ L de solução salina e centrifugação. Logo após, o sobrenadante foi descartado e as células homogeneizadas em 50  $\mu$ L de solução salina. A esta suspensão foram adicionados 5  $\mu$ L de anticorpo de camundongo anti CXCR4 humana (FAB170F, *R&D Systems*) conjugado a isotiocianato de fluoresceína (exceto para amostra não marcada: células HEK293 não transfectadas e não tratadas com IFN $\beta$ , da mesma passagem das demais amostras). As células permaneceram incubadas com anticorpo por uma hora em geladeira (4° C, no escuro). Após a marcação, as células foram lavadas duas vezes pela adição de 500  $\mu$ L de solução salina/microtubo, seguida de centrifugação e descarte do sobrenadante. Por fim, as células foram homogeneizadas em 1 mL de solução salina e analisadas por citometria de fluxo utilizando *FACSVerse* (BD). Cinquenta mil eventos foram adquiridos por amostra e a análise dos dados foi feita pelo programa *FlowJo* (Figura 27).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DAS IFITS POR FPLC

Para a reconstituição dos complexos de IFIT1, IFIT2 e IFIT3 *in vitro*, as proteínas recombinantes foram inicialmente expressas em *Escherichia coli* e purificadas por diferentes técnicas de cromatografia. Anteriormente, porém, plasmídeos para expressão heteróloga de IFIT2, IFIT3, e para mutantes de IFIT1 foram gerados.

#### 5.1.1 Geração dos mutantes de IFIT1

Plasmídeos para expressão de IFIT1 com mutações na região C-terminal, e no *binding pocket*, foram utilizados nos experimentos a seguir. Esses plasmídeos foram construídos por mutagênese sítio-dirigida de pET28b-IFIT1 e pCDNA3.1-IFIT1 por PCR. Os produtos de PCR foram analisados em géis de agarose 1 %. No exemplo abaixo (Figura 7) a mutagênese de IFIT1-E450x, isto é, a inserção de um códon de parada após o resíduo 450. Amostras representativas foram sequenciadas, confirmando a presença das mutações.

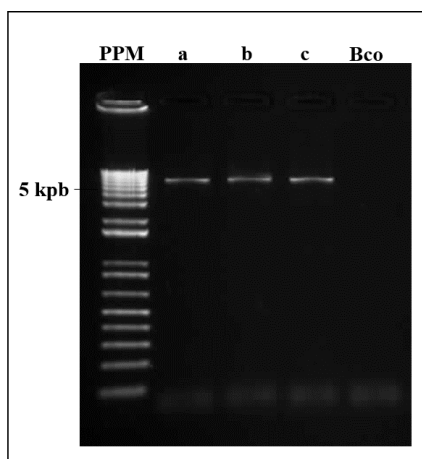


Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR para mutagênese sítio dirigida IFIT1-E450x. Foram testadas três diferentes temperaturas de anelamento: 45 (a), 48 (b) e 51 (c) °C. PPM: Padrão de peso molecular para DNA; Bco: branco, PCR sem DNA; kpb: quilo pares de bases.

#### 5.1.2 Amplificação e clonagem de IFIT2 e IFIT3

As regiões codificadoras de IFIT2 e IFIT3 foram amplificadas por PCR e analisadas por eletroforese em gel de agarose 1 % (Figura 8a). As sequencias amplificadas

foram subclonadas em pET28b (Novagen) entre os sítios de restrição de NdeI e XhoI. Uma alíquota das minipreparações obtidas foi digerida com NdeI e XhoI para verificar a presença do inserto (Figura 8b).

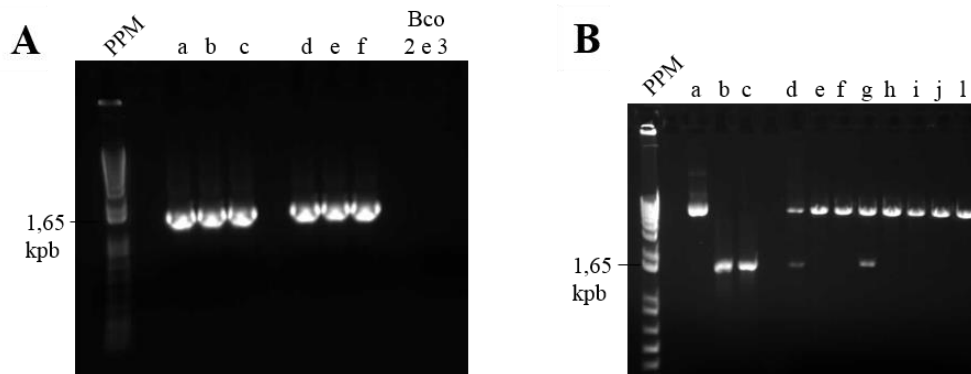


Figura 8 - Amplificação e clonagem de IFIT2 e IFIT3. (A) eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR para amplificação das sequências de IFIT2 (a-c) e IFIT3 (d-f). Foram testadas três diferentes temperaturas de anelamento: 45 (a, d), 48 (b, e) e 51 (c, f) °C. (B) teste de restrição para verificar clonagem de IFIT2 ou IFIT3 em pET28b. (a) pET28b original, não digerido. (b, c) Produtos de PCR da amplificação das sequências de IFIT2 (b) ou IFIT3(c). (d-l) Uma alíquota das minipreparações resultantes da subclonagem de IFIT2 (d-f) ou IFIT3 (g-l) foi digerida com NdeI e XhoI e analisada por eletroforese em gel de agarose (1%). PPM: Padrão de peso molecular para DNA; Bco: branco, PCR sem DNA; kpb: quilo pares de bases.

As minipreparações positivas no teste de restrição (canaletas “d” e “g”, no gel da Figura 8b) foram sequenciadas para confirmar a presença das sequências de IFIT2 ou IFIT3.

### 5.1.3 Expressão heteróloga das IFITs em *E. coli*

Para expressão das IFITs humanas recombinantes, células competentes foram transformadas com os plasmídeos para expressão de cada IFIT. Antes e após a indução da expressão pela adição de IPTG, uma alíquota das células foi coletada e analisada por SDS-PAGE (exemplo na Figura 9A). Todas as IFITs de interesse foram super-expressas no sistema heterólogo, com exceção de IFIT1-E450x que apresentou baixa expressão. As células foram então lisadas e a fração solúvel usada para purificação das IFITs por cromatografia utilizando microesferas com afinidade à cauda de histidinas. Uma alíquota de cada fração do processo de lise e purificação foi coletada e analisada por SDS-PAGE (Figura 9B).

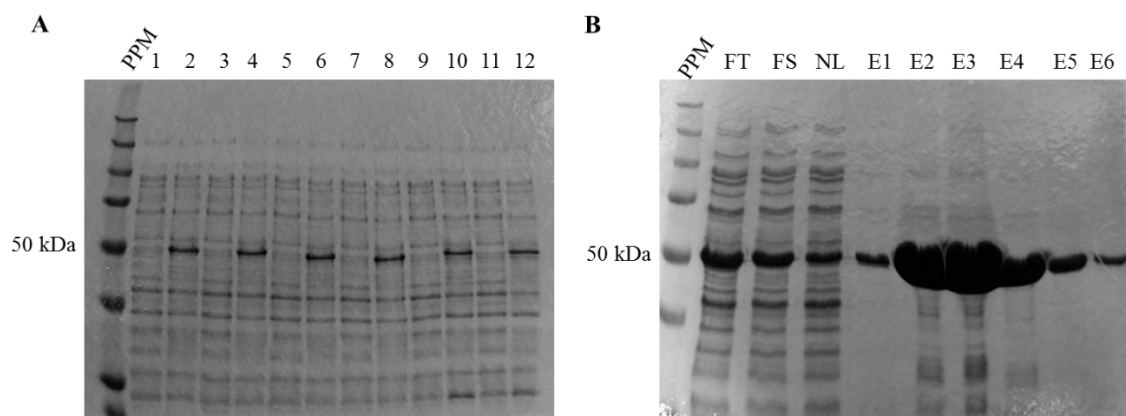


Figura 9 - Expressão heteróloga das IFITs in *E. coli*. (A) células transformadas com plasmídeos para expressão de IFIT1 (1-8) ou IFIT1-R38E (9-12). Os números ímpares representam as amostras não induzidas analisadas por SDS-PAGE. Os pares mostram as amostras induzidas com IPTG após 15 horas. (B) Após indução, as culturas foram lisadas e, nesse exemplo, IFIT2 foi purificada por cromatografia de afinidade. FT: fração total; FS: fração solúvel; NL: fração não ligada; E1-E6: eluições 1-6; PPM: Padrão de peso molecular para proteína; kDa: quilo Dáltons

Após a purificação por afinidade, IFIT2 e IFIT3 tiveram suas caudas de histidina clivadas pelo tratamento com trombina (exemplo na Figura 10).

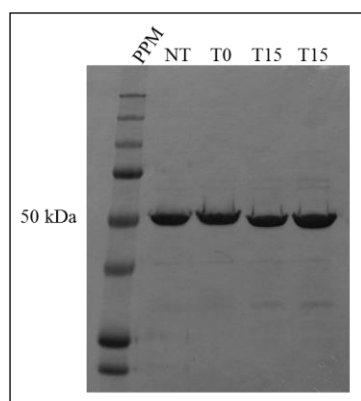
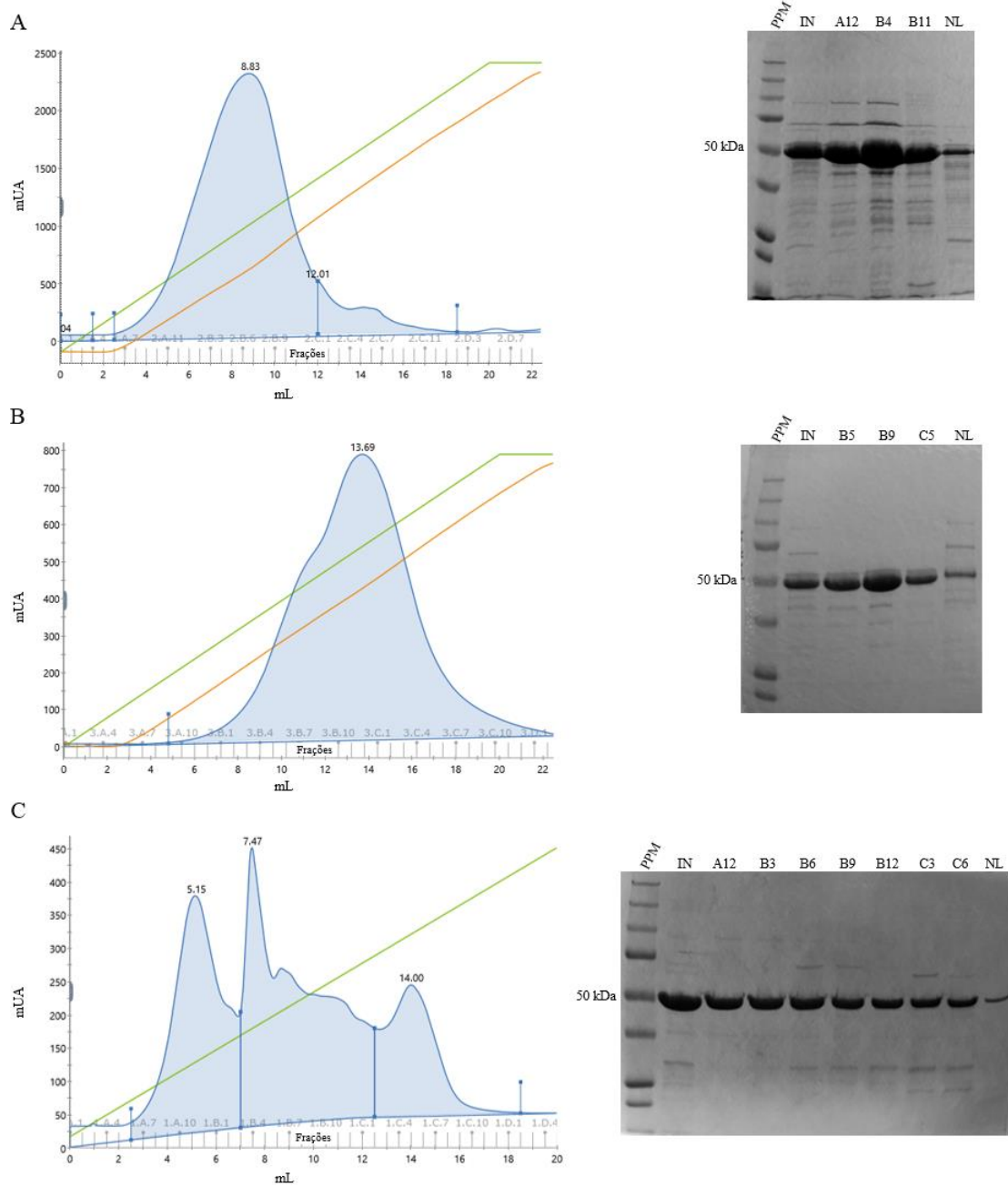


Figura 10 - Clivagem da cauda de histidina de IFIT2. As eluições de IFIT2 foram diluídas e tratadas com trombina. NT: amostra não tratada; T0: amostra tratada com trombina, tempo 0; T15: amostras tratadas com trombina, após 15 horas de incubação a 4 °C; PPM: Padrão de peso molecular para proteína; kDa: quilo Dáltons.

#### 5.1.4 Purificação das IFITs por FPLC

Na próxima etapa de purificação, por FPLC, diferentes estratégias e colunas foram utilizadas de acordo com as propriedades de cada IFIT. IFIT1 selvagem e mutantes foram purificados em duas etapas de cromatografia de troca iônica (Figura 11A e B). Como a expressão do mutante IFIT1-E450x foi muito baixa, este não pode ser purificado em quantidade e qualidade suficientes para utilização posterior.

IFIT2 e IFIT3 foram purificadas por cromatografia de troca aniônica, seguida de exclusão de tamanho quando necessário (exemplos na Figura 11C-E), já que não interagiam com a resina da coluna de troca catiônica.



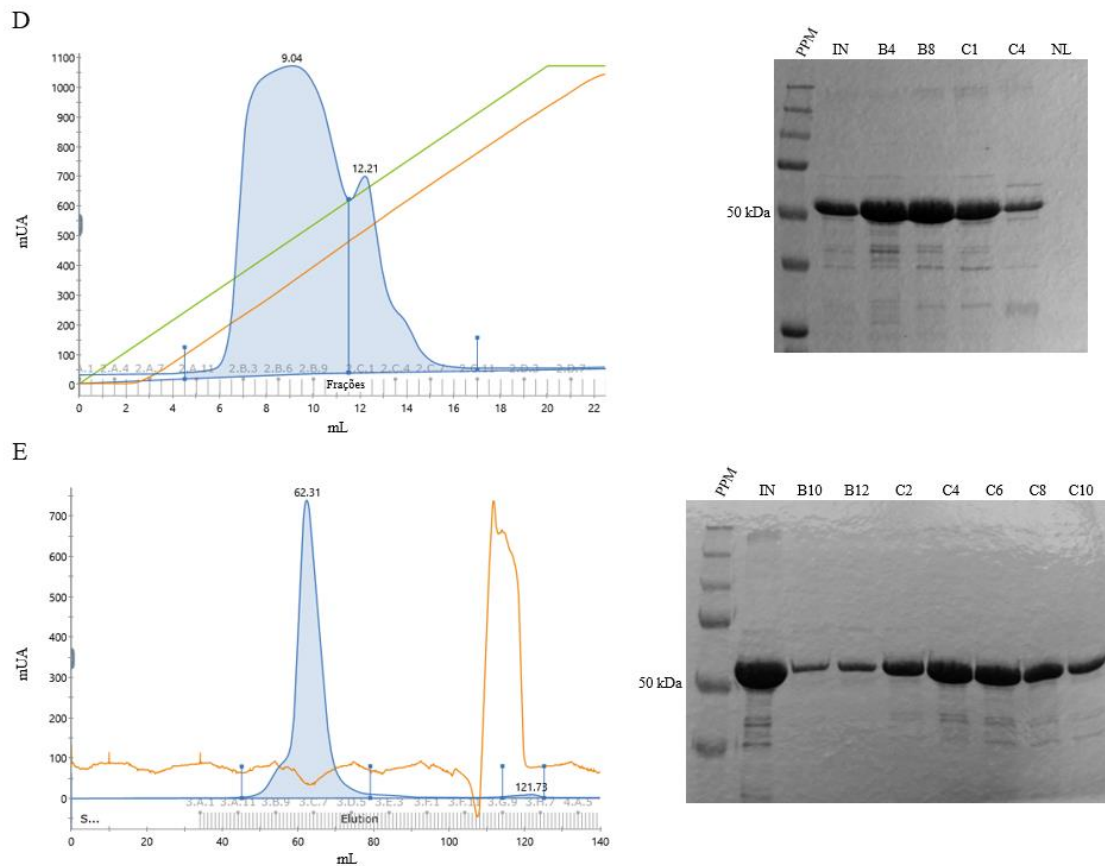


Figura 11 - Purificação das IFITs por FPLC. IFIT1 foi purificada por cromatografia de troca iônica em MonoQ 5/50 GL (A), seguida de MonoS 5/50 GL (B). IFIT2 e IFIT3 foram purificadas por cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ 5/50 GL (C e D, respectivamente), seguida por exclusão de tamanho em coluna HiLoad 16/600 Superdex 200 pg quando necessário (exemplo para IFIT3 em D). Nos cromatogramas as linhas azuis representam a absorvância a 280 nm, as linhas verdes a concentração do tampão B, e as laranjas a variação de condutividade. Aliquotas das amostras injetadas (IN), frações representativas dos picos (A12-C10) e frações não ligadas (NL) foram analisadas por SDS-PAGE (géis ao lado dos respectivos cromatogramas). mUA: mili unidades de absorvância; PPM: Padrão de peso molecular para proteína; kDa: quilo dalttons. Todas as colunas de FPLC eram GE Healthcare.

Após a purificação, as frações contendo as proteínas purificadas foram concentradas para utilização nos experimentos posteriores.

## 5.2 IFIT1, IFIT2 E IFIT3 FORMAM HOMODÍMEROS

Para avaliar a forma oligomérica preferencial das IFITs purificadas em solução, IFIT1, IFIT2 e IFIT3 foram individualmente analisadas por SEC-MALS.

IFIT1 apresentou uma variação no perfil de eluição, de forma concentração dependente. Conforme o aumento da concentração, a proteína eluiu num estado

oligomérico de massa maior. Analisando a variação da massa molar nos picos, conclui-se que IFIT1 alterna entre o estado de monômero e dímero em solução, caracterizando uma dimerização reversível de baixa afinidade (Figura 12A).

Em contraste, IFIT2 eluiu como duas espécies bem distintas, correspondendo a um homodímero estável, e um tetrâmero menos abundante (Figura 12B). Surpreendentemente, o dímero de IFIT2 apresentou um volume de retenção similar a uma forma monomérica de IFIT1 (se comparado às menores concentrações na Figura 12A). Isso demonstra a importância do uso da SEC-MALS para determinar diretamente a massa molecular, ao invés da comparação com padrões de peso molecular.

Quando analisada individualmente, IFIT3 também eluiu majoritariamente na forma de dímero, apresentando também um pico menor correspondente a um monômero (Figura 12C).

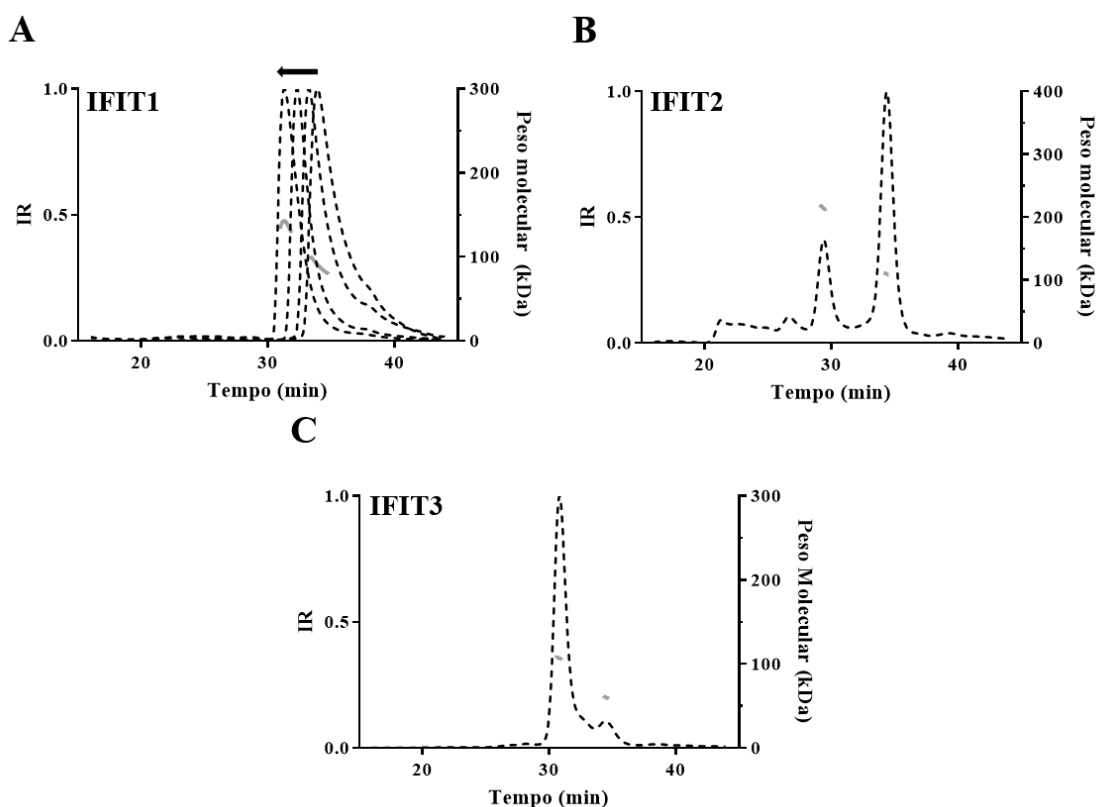


Figura 12 - SEC-MALS de IFIT1, IFIT2 e IFIT3. As proteínas purificadas foram injetadas em uma coluna de cromatografia de exclusão de tamanho (Superdex 200 10/300) e, de acordo com sua eluição, as espécies resultantes foram monitoradas por MALS. (a) IFIT1 (0,5, 1, 2,8 ou 8 mg/mL, a concentração aumenta na direção da seta), (b) IFIT2 (1 mg/mL) e (c) IFIT3 (1 mg/mL). As linhas pretas descontínuas representam o índice de refração diferencial normalizado (IR) e os pontos ou linhas em cinza são as massas moleculares calculadas experimentalmente para cada pico. As massas moleculares teóricas dos monômeros são: IFIT1 (com uma cauda de 6 histidinas)- 58,6 kDa, IFIT2- 54,9 kDa e IFIT3- 56,2 kDa.



### 5.3 IFIT1 E IFIT3 FORMAM UM TETRÂMERO ESTÁVEL

O estado oligomérico dos complexos formados a partir das proteínas individualmente expressas também foi avaliado. Quando incubadas a 4 °C por uma hora, IFIT1 e IFIT3 formaram um tetrâmero estável, com massa molecular de 221 kDa (Figura 13, pico a) e concentrações equimolares das duas proteínas (SDS-PAGE da Figura 13). Um segundo pico, correspondente a um estado dimérico, também foi observado (Figura 13, pico b). O tetrâmero purificado permaneceu estável mesmo após sucessivas passagens pela coluna de gel filtração (dados não mostrados).

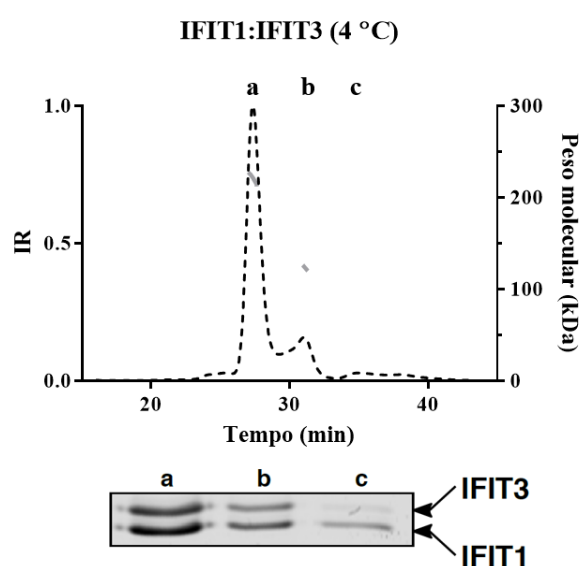


Figura 13 - Reconstituição do complexo IFIT1:IFIT3 *in vitro*. Após a incubação a 4 °C, o complexo foi analisado por SEC-MALS. A linha preta descontínua representa o índice de refração diferencial normalizado (IR) e os pontos ou linhas em cinza são as massas moleculares calculadas experimentalmente para cada pico. O quadro na parte inferior mostra o conteúdo de cada pico analisado por SDS-PAGE. As massas moleculares teóricas dos monômeros são: IFIT1 (com uma cauda de 6 histidinas)- 58,6 kDa e IFIT3- 56,2 kDa.

### 5.4 IFIT1 E IFIT2 INTERAGEM FORMANDO MÚLTIPLAS ESPÉCIES

A associação entre a IFIT1 e IFIT2 foi discreta a 4 °C (Figura 14, pico a) e a maioria das moléculas eluiu na forma de homodímeros (Figura 14, pico b). Entretanto, a interação entre as proteínas aumentou quando aquecidas a 30 °C. O complexo IFIT1:IFIT2 foi menos definido, que o de IFIT1:IFIT3, eluindo como múltiplas espécies entre 148 e 234 kDa (Figura 14B). Esse tipo de interação é consistente com o fato de IFIT2 apresentar múltiplos estados oligoméricos por si só (Figura 12B). Devido a

sobreposição dos picos, para esse complexo a massa molecular não pôde ser determinada, no entanto o pico principal “c”, corresponde a um tetrâmero.

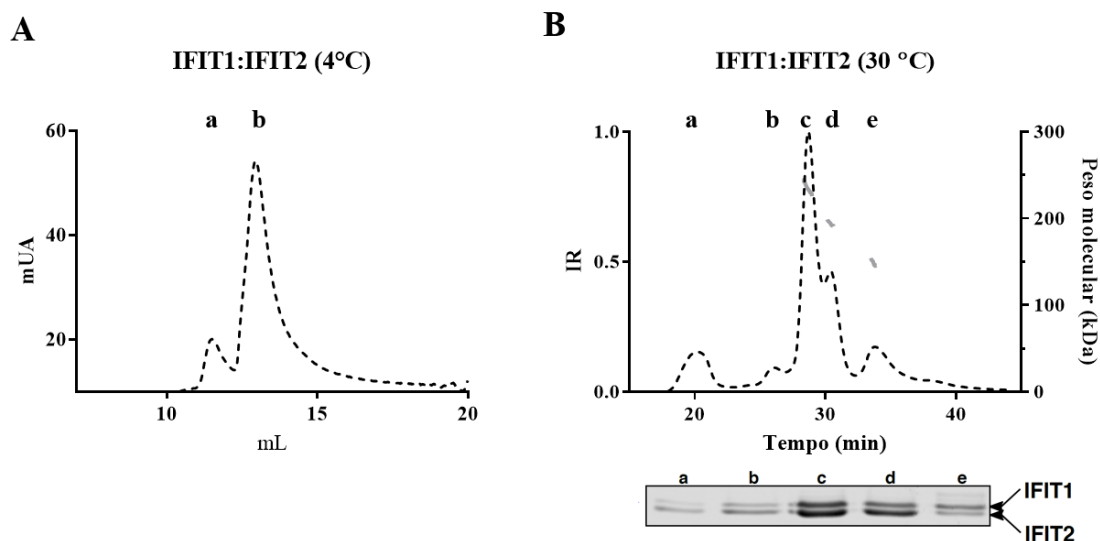


Figura 14 - Complexo IFIT1:IFIT2 a 4 ou 30 °C. As proteínas foram incubadas 4 (A) ou 30 (B) °C por uma hora, e o complexo analisado por SEC (A) ou SEC-MALS (B). mAU: mili Unidades de Absorbância. Em “B” a linha preta descontínua representa o índice de refração diferenciado normalizado (IR) e os pontos ou linhas em cinza são as massas moleculares calculadas experimentalmente para cada pico. O quadro na parte inferior mostra o conteúdo de cada pico analisado por SDS-PAGE. As massas moleculares teóricas dos monômeros são: IFIT1 (com uma cauda de 6 histidinas)- 58,6 kDa e IFIT2- 54,9 kDa.

### 5.5 IFIT2 E IFIT3 FORMAM UM HETERODÍMERO

Apesar dos dados na literatura sugerirem a interação entre IFIT2 e IFIT3, esse complexo ainda não havia sido reconstituído *in vitro*. Inicialmente, nenhuma interação entre as proteínas foi observada quando incubadas a 4 °C por uma hora e, na análise por SEC-MALS, os homodímeros eluíram separadamente (Figura 15B preenchido cinza).

Já a 30 °C, foi observada a formação de um pico entre os homodímeros de IFIT2 e IFIT3, que aumentou conforme o tempo de incubação (Figura 15A). Finalmente, um complexo heterodimérico de 110 kDa tornou-se a espécie predominante quando as proteínas foram incubadas, em menor concentração, a 37 °C (Figura 15B, linha preta descontínua). Para testar a estabilidade do complexo IFIT2:IFIT3, as frações correspondentes ao pico “c” (Figura 15B) foram concentradas, reanalisadas por SEC-MALS. Como pode-se observar na Figura 15C, não houve dissociação do complexo, que permaneceu estável em um pico principal.

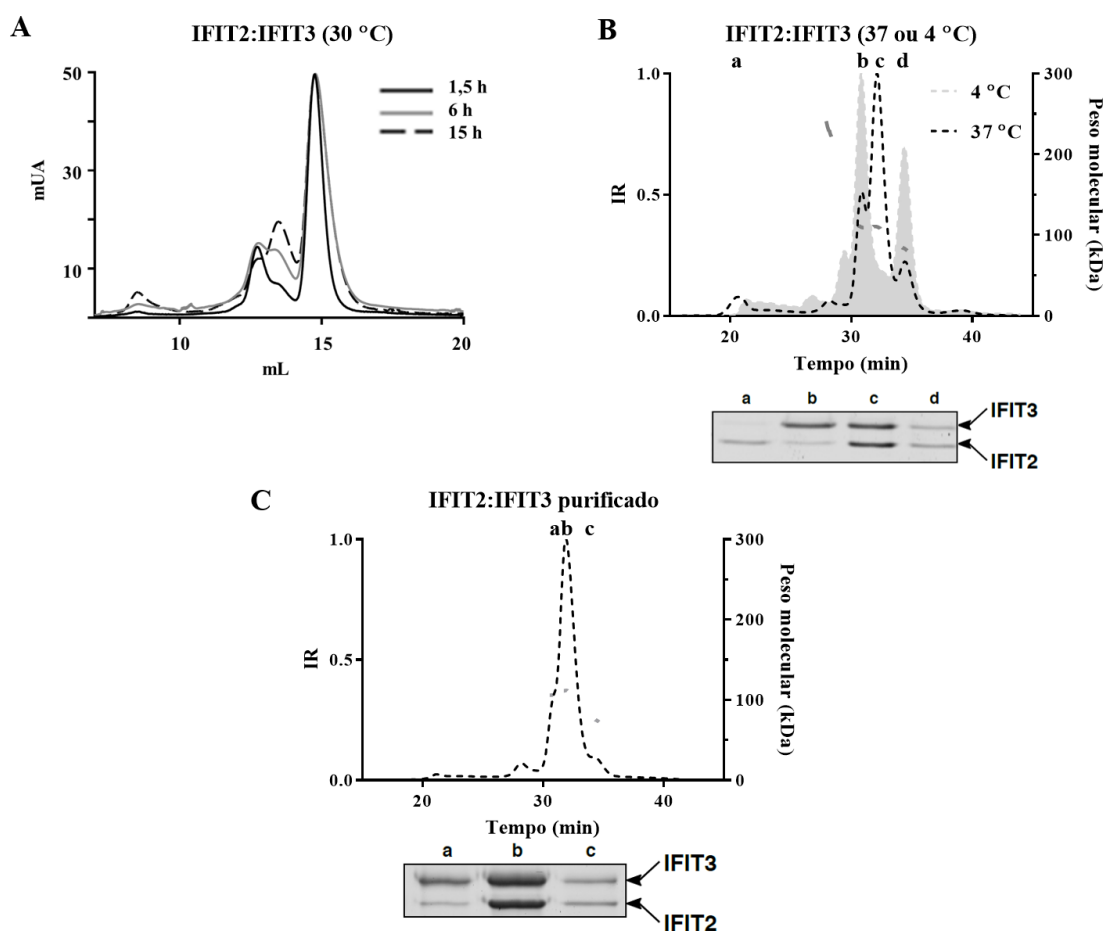


Figura 15 - Formação e estabilidade do complexo IFIT2:IFIT3. As proteínas foram incubadas juntas (A) em excesso de IFIT2, 30 °C e tempo variável, e analisadas por SEC ou (B) em quantidades equimolares, a 4 ou 37 °C por uma hora, e analisadas por SEC-MALS. O pico correspondente ao complexo (“c” em “B”) foi concentrado e reanalisado por SEC-MALS (C) mUA: mili Unidades de Absorbância. Em “B” e “C” as linhas descontínuas representam o índice de refração normalizado (IR) e os pontos e linhas em cinza são as massas moleculares calculadas experimentalmente para cada pico. Os quadros na parte inferior mostram o conteúdo de cada pico analisado por SDS-PAGE. As massas moleculares teóricas dos monômeros são: IFIT2- 54,9 kDa e IFIT3- 56,2 kDa.

## 5.6 IFIT1:IFIT2:IFIT3 FORMAM UM TRÍMERO ESTÁVEL

As primeiras tentativas para formar o complexo entre IFIT1, IFIT2 e IFIT3 consistiram da mistura e incubação das três proteínas ao mesmo tempo. Em todas as condições de temperatura e concentração testadas IFIT1 e IFIT3 associaram em um heterotetrâmero (mesmo mostrado na Figura 13), e IFIT2 permaneceu não ligada (dados não mostrados). Tendo caracterizado o complexo IFIT2:IFIT3, este foi utilizado para reconstituição do complexo IFIT1:IFIT2:IFIT3. IFIT1 foi incubada em concentrações

equimolares com o complexo IFIT2:IFIT3 previamente purificado, a 30 °C por uma hora. A maioria das moléculas de IFIT1 foi incorporada em um complexo maior, com massa molecular de 165 kDa, correspondente a um trímero (Figura 16A, pico b). A análise de frações representativas dos picos por SDS-PAGE revelou que este trímero apresentava concentrações equimolares de IFIT1, IFIT2 e IFIT3. As moléculas remanescentes de IFIT1 complexaram com IFIT3 livre, contaminante da purificação do dímero IFIT2:IFIT3, e eluíram um pouco antes, como um heterotetrâmero de massa molecular 218 kDa (Figura 16A, pico a).

Interessantemente, quando o complexo IFIT2:IFIT3 foi incubado com IFIT1 em excesso (duas vezes em excesso, a 30 °C, por uma hora), foi observado uma mudança no perfil de eluição. Dessa vez, a espécie principal foi um tetrâmero formado por IFIT1:IFIT2:IFIT3 de 236 kDa. Devido ao excesso de IFIT1 observado na análise desse pico por SDS-PAGE trata-se, provavelmente, de duas moléculas de IFIT1, uma de IFIT2 e uma de IFIT3 (Figura 16B). O complexo tetramérico IFIT1:IFIT2:IFIT3 demonstrou-se menos estável que o trímero, precipitando parcialmente quando incubado a 4 °C. Dessa forma, somente o trímero foi utilizado para os demais experimentos.

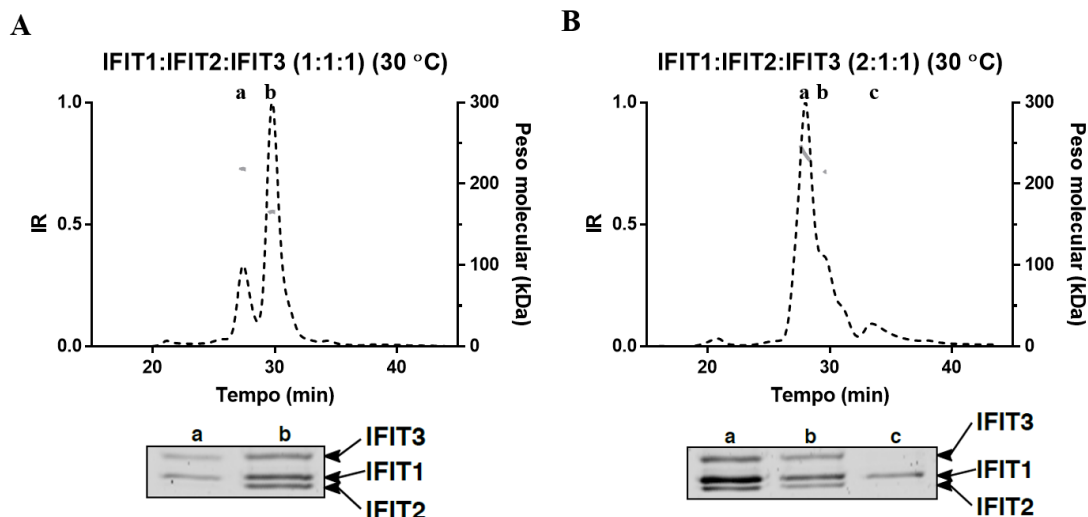


Figura 16 - Formação do complexo IFIT1:IFIT2:IFIT3. O complexo purificado IFIT2:IFIT3 foi incubado com quantidades equimolares (A) ou com duas vezes excesso (B) de IFIT1, por uma hora, a 30 °C e então analisados por SEC-MALS. As linhas pretas descontínuas representam o índice de refração diferencial normalizado (IR) e os pontos ou linhas em cinza são as massas moleculares calculadas experimentalmente para cada pico. Os quadros na parte inferior mostram o conteúdo de cada pico analisado por SDS-PAGE. As massas moleculares teóricas dos monômeros são: IFIT1 (com uma cauda de 6 histidinas)- 58,6 kDa, IFIT2- 54,9 kDa e IFIT3- 56,2 kDa.

## 5.7 IFIT3 AUMENTA A ESTABILIDADE DOS COMPLEXOS DE IFITS

Para testar se os complexos formados eram realmente produtos de uma interação estável, de alta afinidade, cada complexo purificado foi comparado às proteínas isoladas em ensaios de fluorimetria de varredura diferencial (Figura 17). Nessa técnica, conforme aumenta a temperatura, o desdobramento das moléculas proteicas é monitorado pela mensuração de um fluoróforo, que fluoresce em condições hidrofóbicas. Proteínas mais estáveis desdobram a temperaturas mais altas e, assim sendo, suas regiões hidrofóbicas são expostas ao solvente (e ao fluoróforo) mais tardiamente em relação a proteínas menos estáveis.

Quando comparadas isoladamente, IFIT3 demonstrou menor termoestabilidade em relação a IFIT1 e IFIT2 (traço preto *versus* cinza nas Figuras 17A e B, respectivamente). No entanto, a associação entre IFIT3 e IFIT1 aumentou a estabilidade dos complexos em geral (traços vermelhos na Figuras 17A e C).

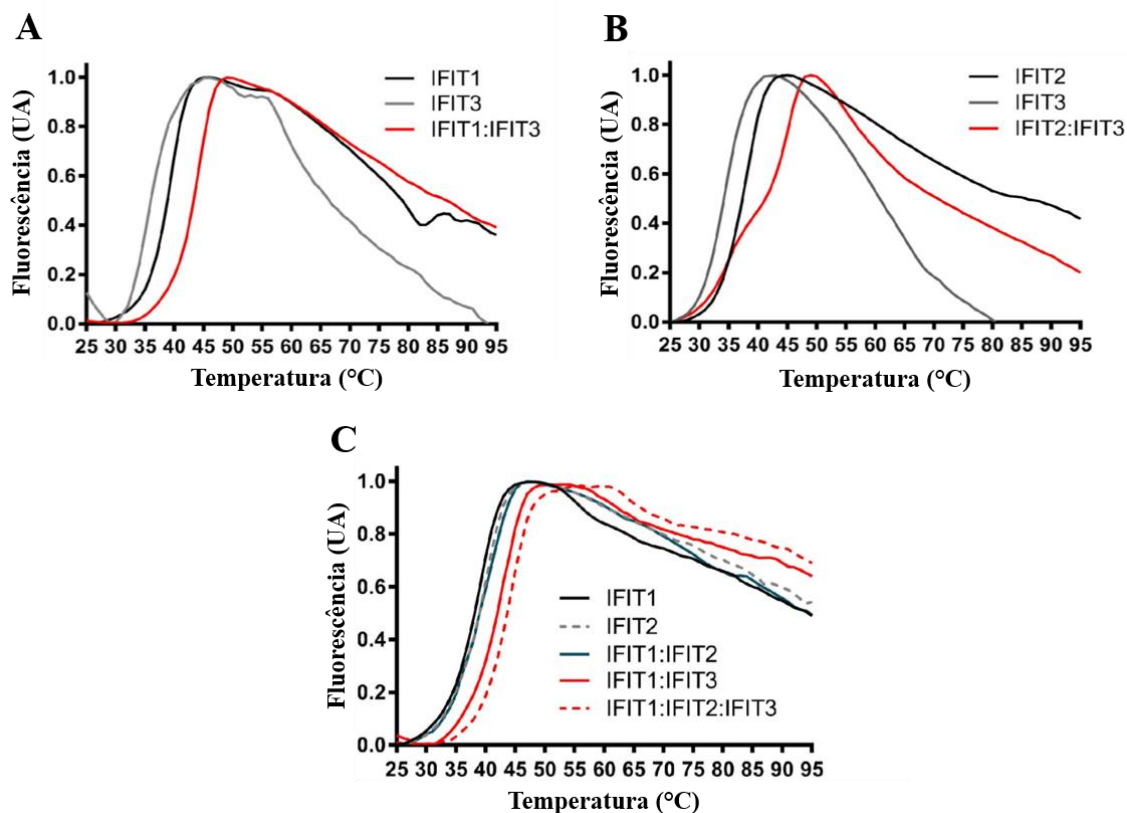


Figura 17 - Estabilidade dos complexos de IFITs. As proteínas isoladas ou os complexos purificados IFIT1:IFIT3 (A e C), IFIT1:IFIT2 (B e C) e IFIT1:IFIT2:IFIT3 (C) foram analisadas por fluorimetria de varredura diferencial. UA: Unidades Arbitrárias.

Na comparação de IFIT2 e IFIT3 (Figura 17B) os homodímeros apresentaram uma curva de desnaturação monofásica com  $T_m$  de 37,3 °C para IFIT2 e 34,1 °C para IFIT3. Já o complexo IFIT2:IFIT3 exibiu uma curva bifásica e, por esse motivo o  $T_m$  não pode ser calculado com confiança.

## 5.8 IFIT1 E IFIT3 INTERAÇÃO POR UM MOTIVO CONSERVADO “YxxxL”

A interação entre as moléculas de IFITs, nos complexos foi então avaliada em detalhes. A interface de dimerização de IFIT1 foi comparada com a região correspondente em IFIT3 por um alinhamento de sequências. Múltiplos resíduos dessa interface permaneceram conservados também na região C-terminal de IFIT3 (Figura 18A). Uma vez que, a homodimerização de IFIT1 é de baixa afinidade, foi investigado se essa região seria na realidade importante para a interação com IFIT3.

Um painel de IFIT1 com mutações na interface de dimerização, foi gerado com base no seu cristal (PDB: 5W5H e Figura 5), e sua interação com IFIT3 avaliada. Todos os mutantes eluíram como espécies monoméricas em ensaios de SEC (Figura 18B), consistente com a prevenção da homodimerização de IFIT1 previamente relatada (ABBAS et al., 2017b).

L464E teve um efeito modesto na prevenção da interação entre IFIT1 e IFIT3 (Figura 18C). Após a incubação das proteínas juntas e análise por SEC, uma pequena porção de IFIT1-L464E eluiu como monômero, mas a espécie predominante foi um tetrâmero estável, assim como observado anteriormente no complexo com IFIT1 selvagem (mostrado na Figura 13).

A substituição Y460E desestabilizou a oligomerização entre IFIT1 e IFIT3 de forma mais pronunciada, com menos IFIT1-Y460E sendo sequestrada no complexo IFIT1:IFIT3 (Figura 18D). No entanto IFIT1-Y460E ainda foi capaz de interagir com IFIT3, como fica claro na análise do conteúdo dos picos por SDS-PAGE.

O mutante duplo Y460E/L464E-IFIT1 (IFIT1-YL) também eluiu como um monômero na SEC (Figura 18A). Entretanto, em contraste com as duas mutações de ponto simples, IFIT1-YL não interagiu com IFIT3 durante a SEC (Figura 18E). Demonstrando que o motivo YxxxL é, de fato, importante para a formação do complexo IFIT1:IFIT3.

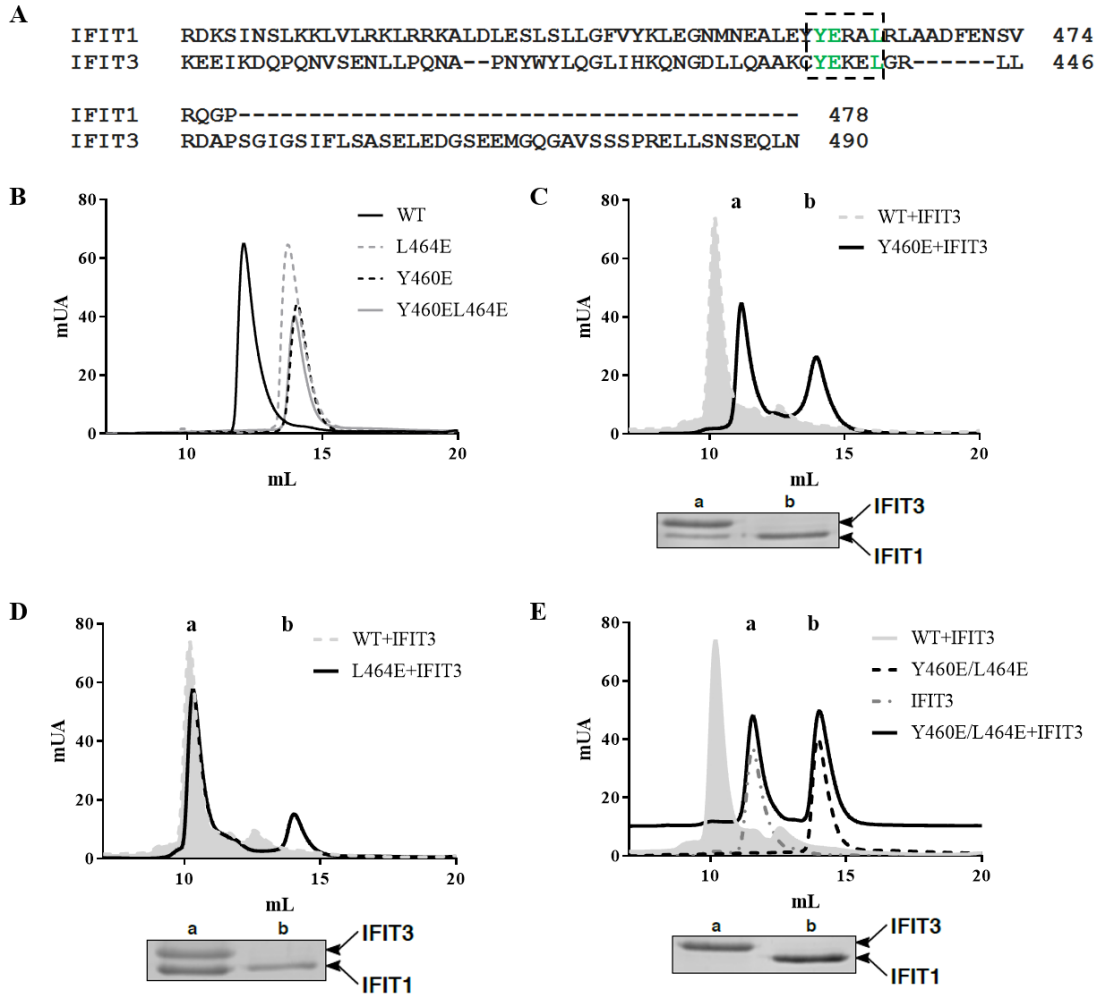


Figura 18 - Impacto de mutações no motivo ‘YxxxL’ de IFIT1 e sua interação com IFIT3. (A) alinhamento das sequências das regiões C-terminal de IFIT1 e IFIT3, com *Clustal Omega*. O motivo ‘YxxxL’ está destacado no detalhe. (B) perfil dos mutantes de IFIT1 quando analisados por SEC. (C, D e E) análise por SEC de IFIT1 selvagem (WT) ou mutante quando incubada com IFIT3. O traço para Y460E/L464E+IFIT3 em “E” está ajustado para + 10 mAU, para facilitar a visualização dos demais traços. mAU: mili Unidades de Absorbância. Os quadros na parte inferior mostram o conteúdo de cada pico (do traço preto contínuo) analisados por SDS-PAGE. As posições de IFIT1 e IFIT3 nos géis estão indicadas.

## 5.9 IFIT1 E IFIT2 INTERAGEM INESPECIFICAMENTE

O complexo IFIT1:IFIT2 demonstrou-se menos definido que IFIT1:IFIT3, eluindo como múltiplas espécies na análise de SEC-MALS. Mesmo assim, o papel da interface de homodimerização de IFIT1 na interação com IFIT2 foi também avaliado.

IFIT2 selvagem tem diferenças no motivo “YxxxL”. O primeiro resíduo, tirosina, foi substituído por uma serina, mas o segundo, um ácido glutâmico é conservado entre IFIT2 e IFIT1 (Figura 19A).

A mutação do resíduo L464E em IFIT1 não alterou sua interação com IFIT2, sendo que o complexo eluiu de forma muito semelhante com aquele formado pela IFIT1 selvagem (Figura 19B). Já a mutação do resíduo Y460E resultou numa mudança do perfil de eluição do complexo, e menos IFIT1 foi incorporada (Figura 19C). Mudança ainda maior foi observada quando o mutante IFIT1-YL foi incubado com IFIT2. Apesar da sobreposição dos picos dificultar a análise, fica claro que essas mutações não foram suficientes para impedir a associação entre as proteínas, já que IFIT1 pôde ser observada eluindo em picos precoces como “a” e “b” da Figura 19D.

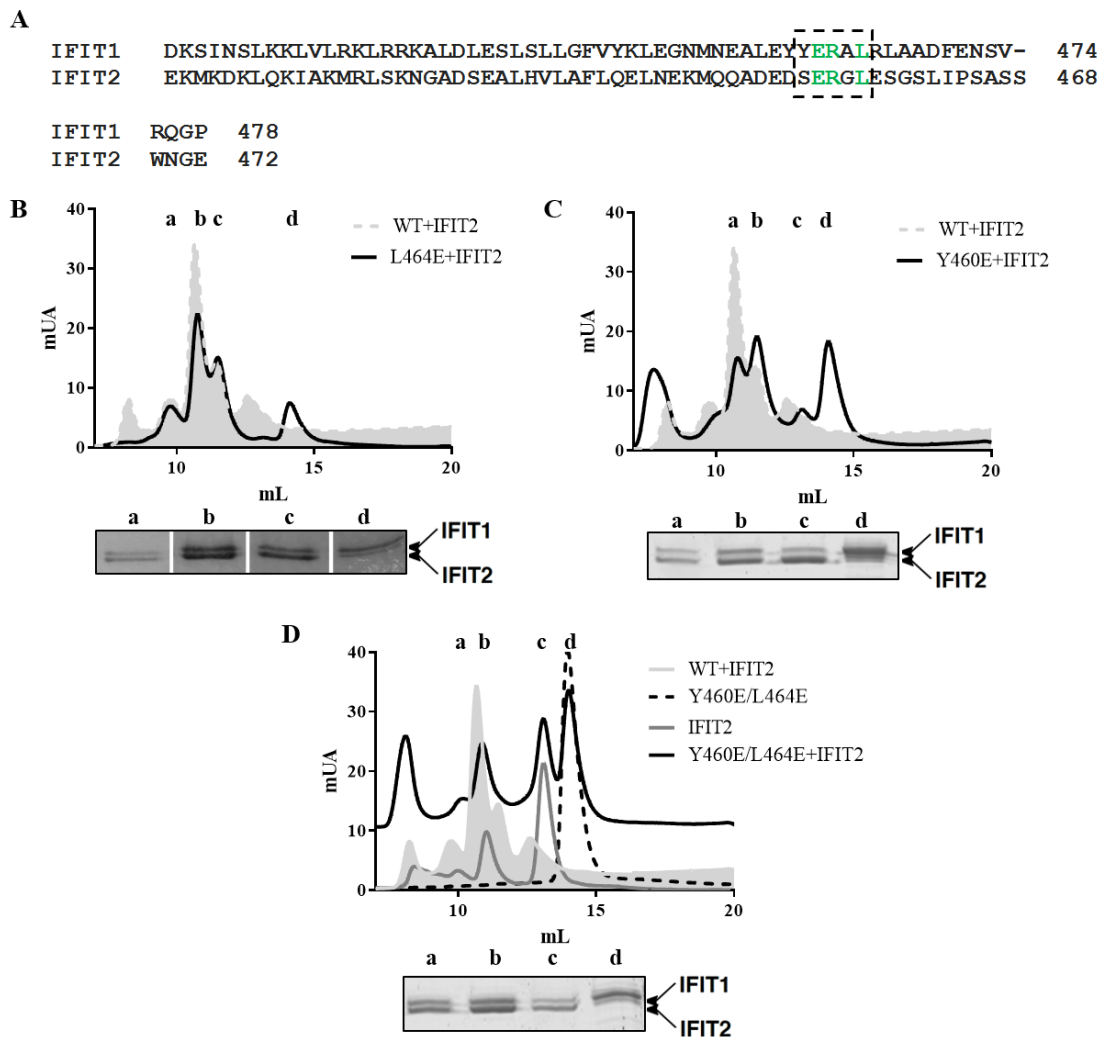


Figura 19 - Impacto de mutações no motivo ‘YxxxL’ de IFIT1 e sua interação com IFIT2. (A) alinhamento das sequências das regiões C-terminal de IFIT1 e IFIT2, com *Clustal Omega*. O motivo ‘YxxxL’ de IFIT1 está destacado no detalhe. (B, C e D) análise por SEC de IFIT1 selvagem (WT) ou mutante quando incubada com IFIT2. O traço para Y460E/L464E+IFIT2 em “D” está ajustado para + 10 mAU, para facilitar a visualização dos demais traços. mAU: mili Unidades de Absorbância. Os quadros na parte inferior mostram o conteúdo de cada pico (do traço preto contínuo) analisados por SDS-PAGE. As posições de IFIT1 e IFIT2 nos géis estão indicadas.



## 5.10 IFIT3 ESTABILIZA IFIT1 E AUMENTA SUA ATIVIDADE

A capacidade dos complexos de IFIT1 e IFIT3 se ligarem a RNAs e inibirem a tradução foi testada *in vitro* e em células. A maioria desses experimentos foi realizada por colegas do laboratório (Dr Trevor Sweeney, Harriet Mears e Xin Leong), por esse motivo os resultados estão aqui sumarizados e a metodologia descrita no artigo do Anexo IIIa.

### 5.10.1 IFIT3 e IFIT2:IFIT3 aumentam a capacidade de ligação e inibição da tradução de IFIT1 a *cap0*-RNAs *in vitro*

Para investigar a inibição da tradução dependente de *cap*, IFIT1 ou seus complexos foram incubados com RNAs transcritos e capeados *in vitro*, antes da adição de lisado de reticulócitos de coelho (RRL, do inglês *rabbit reticulocyte lysate*). Conforme esquematizado na Figura 20A, os RNAs utilizados compreendiam o gene repórter *Firefly luciferase* (Fluc) flanqueado pelas regiões 5' e 3' UTR da  $\beta$ -globina humana (*cap0*- $\beta$ -globina) ou do *Zika virus* (*cap0*-ZV), e representam RNAs com extremidade 5' pouco e altamente estruturada, respectivamente. A tradução foi mensurada pela luminescência de Fluc.

IFIT1, foi suficiente para inibir a tradução de ambos os repórteres (Figura 20B e C). Nenhuma diferença detectável foi observada quando o complexo IFIT1:IFIT2 foi utilizado (dados não mostrados). Por outro lado, a presença de IFIT3 aumentou o efeito inibitório da IFIT1 selvagem na tradução dos repórteres (Figura 20B e C). O mutante IFIT1-YL (que não interagiu com IFIT3 nos ensaios de SEC-MALS) também foi avaliado nesses ensaios. Apesar de manter a capacidade inibitória de tradução, tal qual a proteína selvagem, o mutante não tem sua atividade influenciada significativamente pela adição de IFIT3 no sistema.

Para determinar se a formação dos complexos com IFIT3 impactava a afinidade de ligação de IFIT1 aos RNAs alvo, foram utilizados ensaios de inibição da extensão do iniciador (do inglês *primer extension inhibition assay* ou *toeprinting*). IFIT1 e seus complexos foram incubados com os mesmos RNAs utilizados no ensaio de tradução, e então iniciadores radio-marcados (complementares a uma região no mRNA de Fluc) foram adicionados. Quando submetidos à transcrição reversa, um cDNA completo foi produzido na ausência de IFIT1, ou um cDNA truncado (menos 7 nucleotídeos,

correspondente a região de ligação de IFIT1 ao RNA) na presença de IFIT1. Os cDNAs foram separados por PAGE, detectados por autorradiografia e a fração ligada (correspondente ao cDNA truncado) foi quantificada. A presença de IFIT3 nos complexos com IFIT1 também aumentou sua afinidade de ligação aos RNAs, com efeito ainda mais pronunciado quando *cap0-ZV* foi utilizado (Figura 20D e E). Além disso, as reações contendo IFIT1:IFIT3 ou IFIT1:IFIT2:IFIT3 atingiram a saturação de ligação.

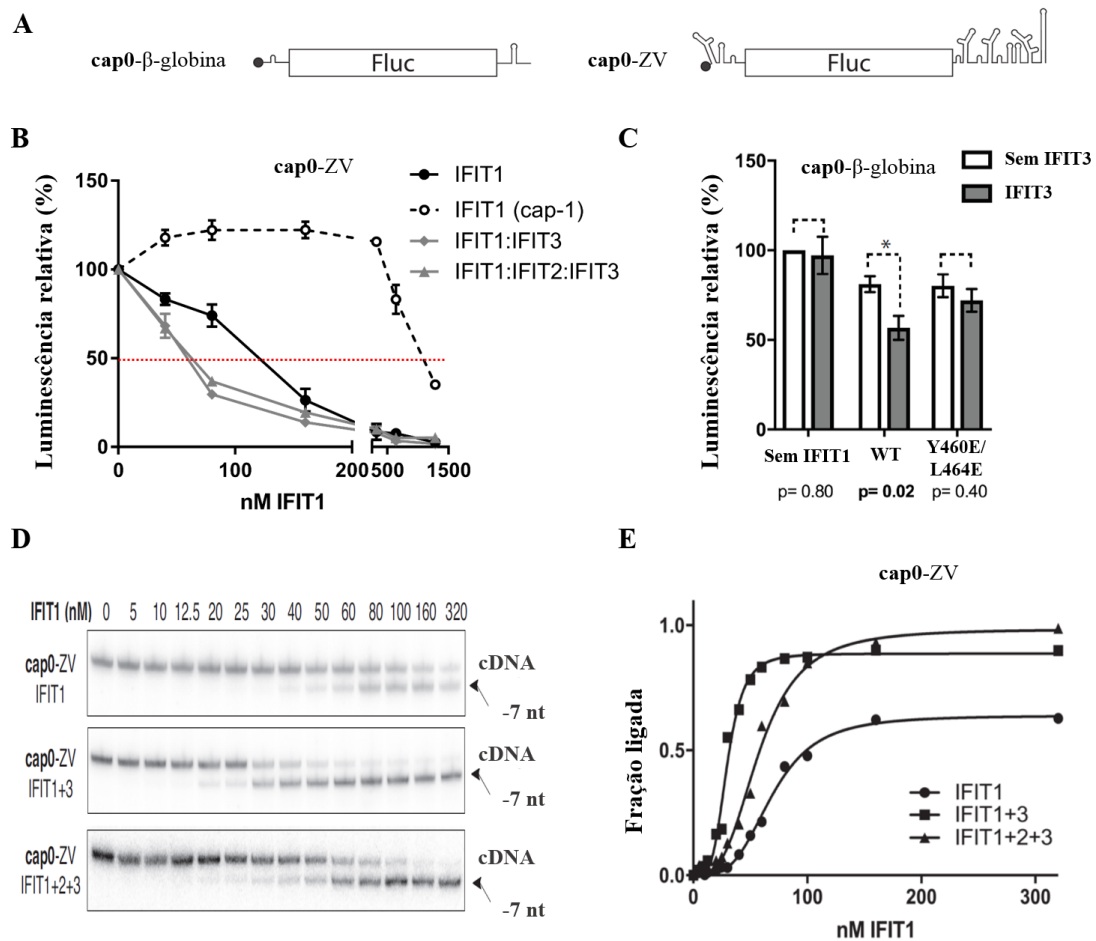


Figura 20 - Efeito de IFIT3 na capacidade de ligação a *cap0*-RNAs e inibição da tradução de IFIT1 *in vitro*. (A) representação esquemática dos *cap0*-RNAs utilizados. (B) luminescência relativa de RRL incubado com *cap0*-ZV, na presença de concentrações crescentes de IFIT1, ou dos seus complexos contendo IFIT3. O efeito de IFIT1 sob a versão *cap*1 do RNA também está demonstrado. (C) luminescência relativa de RRL incubado com *cap0*-β-globina, na presença de IFIT1 selvagem (WT) ou mutante, com ou sem IFIT3 (conforme indicado pela cor das barras). (D) análise de *toeprinting* da interação de IFIT1 e seus complexos com *cap0*-ZV. Os cDNAs completo e truncado (menos sete nucleotídeos) estão indicados. (E) as frações de RNA ligadas por IFIT1 (ou complexos) de três experimentos independentes de *toeprinting* foram quantificadas e as curvas ajustadas pela equação não linear de Hill. Em B e C os dados foram normalizados pela luminescência relativa na ausência de IFIT1 e estão representados como a média ± erro padrão de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada utilizando um teste t de Student, não pareado, bicaudal. Os valores-p estão indicados e os asteriscos indicam significância estatística.

### 5.10.2 A co-expressão de IFIT3 estabiliza IFIT1 em células e potencializa sua atividade

A influência de IFIT3 na expressão e atividade de IFIT1 em células também foi investigada. Interessantemente, a presença de IFIT3, (mas não IFIT2, dados não mostrados) estabilizou a concentração de IFIT1 (Figura 21A). Esse efeito de estabilização é dependente da conservação do motivo YxxxL em IFIT1 (dados não mostrados).

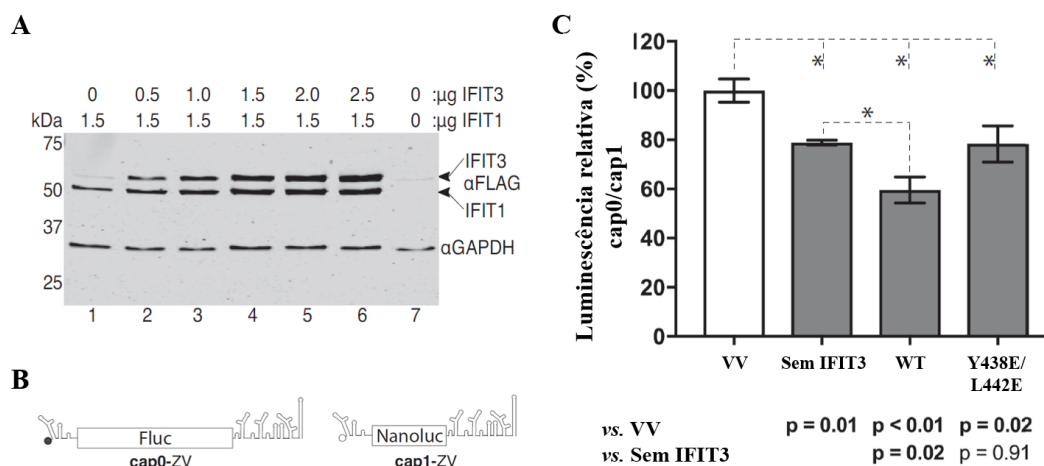


Figura 21 - IFIT3 estabiliza e aumenta a atividade de IFIT1 em células. (A) células HEK293T foram transfectadas com as quantidades indicadas dos plasmídeos para expressão de FLAG-IFIT1 e IFIT3. 24 horas após a transfecção, as células foram lisadas e a expressão dessas IFITs avaliada por *Western blot*. Resultado representativo de três experimentos independentes. (B) representação esquemática dos mRNAs sintetizados e capeados *in vitro*, que foram utilizados no experimento em “C”. O RNA contendo *cap1* é resistente a ligação por IFIT1 (dados não mostrados) e foi utilizado como controle interno da transfecção. (C) células HEK293T foram transfectadas com vetor vazio (VV), ou com plasmídeo para expressão de IFIT1 selvagem isoladamente (Sem IFIT3), ou em conjunto com plasmídeo para expressão de IFIT3 selvagem (WT) ou contendo mutações no motivo YxxxL (Y438E/L442E). Após 24 horas os repórteres esquematizados em “B” foram co-transfectados nas células. A luminescência relativa dos repórteres nas células transfectadas é dada pela taxa de luminescência de Fluc (*cap0*) sobre a luminescência da nanoluciferase (Nanoluc - *cap1*), normalizada pela luminescência das células transfectadas com controle do vetor vazio, e representada como a média  $\pm$  o erro padrão de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada utilizando um teste t de Student, não pareado, bicaudal. Os valores-p estão indicados e os asteriscos indicam significância estatística.

A presença de IFIT3 também aumentou a inibição da tradução de RNA *cap0* mediada por IFIT1 em células (comparar barra “Sem IFIT3” e a barra com IFIT3 “WT” na Figura 21C). O mesmo não foi observado quando as células expressavam uma IFIT3 com mutações no motivo YxxxL (barra “Y438E/L442E” da Figura 21C), incapaz de ligar IFIT1 nos ensaios de SEC (dados não mostrados).

## 5.11 O COMPLEXO IFIT1:IFIT2:IFIT3 SE LIGA A mRNAs CELULARES

Para testar a capacidade de ligação de IFIT1 a mRNAs próprios, um ensaio de *pulldown* foi padronizado no qual o complexo trimérico IFIT1:IFIT2:IFIT3 caracterizado *in vitro*, foi incubado com mRNA de células HEK293Ts tratadas com IFN-I. Somente o mRNA de células tratadas foi utilizado, já que esse estímulo é suficiente para promover a formação do interatoma de IFITs em células (PICHLMAIR et al., 2011a).

Para diminuir a ocorrência de interações inespecíficas, isto é, interações dos mRNAs com outras regiões da proteína, que não o “*binding pocket*”, um RNA bloqueador foi utilizado em metade das amostras. Esse RNA OH-globina (descrito nos Materiais e métodos) foi previamente defosforilado, de forma que não interage com o *binding pocket* de IFIT1, mas pode interagir com outras regiões potencialmente carregadas. Além disso, um trímico contendo o mutante de IFIT1 (IFIT1-R38E:IFIT2:IFIT3) foi gerado e utilizado como controle. Essa mutação impede a ligação de mRNAs ao “*binding pocket*” de acordo com Kumar et al. (2013).

Para o experimento, células HEK293T foram tratadas com 1.000 UI/mL de IFN $\alpha$  2a por 12 horas. Logo após, parte das células foram usadas para extração de proteína, e parte para extração do RNA total (Figura 22A). A indução de ISGs foi confirmada através de RT-qPCR e *Western blot* para IFIT1 (Figura 22B e C, respectivamente).

O mRNA das células tratadas foi purificado a partir do RNA total, usando microesferas magnéticas contendo oligo(dT)<sub>25</sub> (Figura 22D, à esquerda). Já o RNA bloqueador foi produzido por transcrição *in vitro* e defosforilado pelo tratamento com uma fosfatase (Figura 22D, à direita).

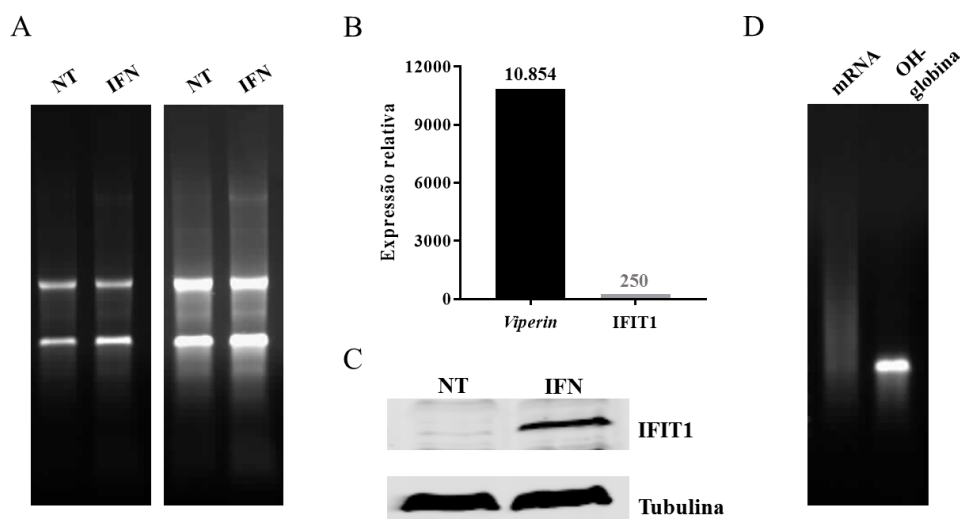


Figura 22 - Tratamento das células HEK293Ts com IFN-I e preparação dos RNAs utilizados no *pulldown*. (A) eletroforese em gel de agarose (1%) do RNA total de células tratadas (1.000 UI/mL, 12 horas) e não tratadas com IFN $\alpha$ 2a. São apresentadas duas imagens do mesmo gel, em diferentes tempos de exposição, para evidenciar a presença de mRNAs celulares de tamanhos diversos. A indução de ISGs nessas células foi confirmada por RT-qPCR (B) e *Western blot* (C). (D) Eletroforese em gel de agarose (1%) de 1 $\mu$ g de mRNA (de células tratadas) e de RNA bloqueador (OH-globina) utilizados no *pulldown*. NT: células não tratadas; IFN: células tratadas com interferon.

Os trímeros, contendo IFIT1 selvagem ou mutante foram produzidos como descrito no item 4.6.8. Não houve diferença na formação do trímero quando utilizando o mutante (comparar Figura 23A e 23B). Os trímeros purificados, utilizados no experimento, foram avaliados por SDS-PAGE (Figura 23C).

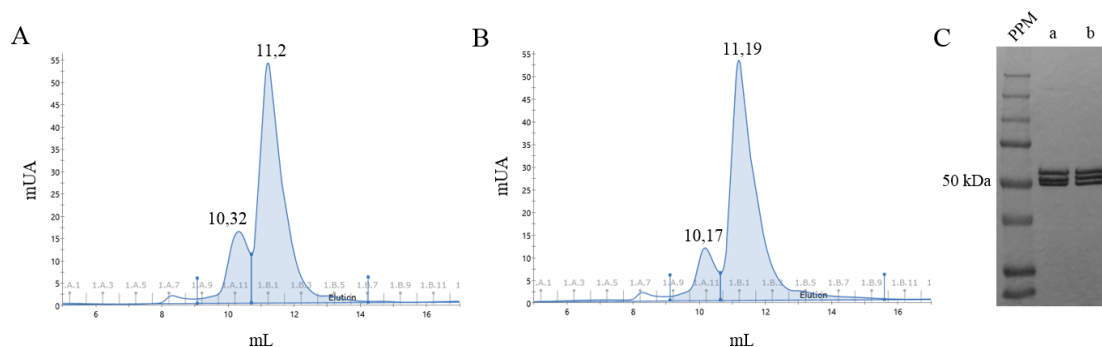


Figura 23 - Produção dos trímeros para *pulldown*. Exemplos de cromatogramas de gel filtração para purificação do (A) trímero IFIT1:IFIT2:IFIT3 (pico com volume de retenção de 11,2 mL) ou (B) trímero IFIT1-R38E:IFIT2:IFIT3 (pico com volume de retenção de 11,19 mL). (C) As frações correspondentes aos trímeros IFIT1:IFIT2:IFIT3 (a) ou IFIT1-R38E:IFIT2:IFIT3 (b) foram purificadas, concentradas e analisadas por SDS-PAGE. mAU: mili Unidades de Absorbância.

Nos experimentos de otimização, foi observado que a quantidade de RNA nas amostras após o *pulldown* era muito pequena, até mesmo para quantificação por fluorimetria. No entanto, testes mostraram que era possível a preparação das bibliotecas e sequenciamento.

Para o *RNAseq*, as réplicas cada amostra (Tabela 8) foram divididas e sequenciadas em quatro *lanes*. Houve pouca variação na qualidade do sequenciamento entre as *lanes* e, em geral, a qualidade do sequenciamento base a base foi muito boa (pontuação acima de 20), como pode ser observado no exemplo da Figura 24A. Os adaptadores e as bases de baixa qualidade foram excluídos, sendo que após o processamento, todas as amostras (com exceção de 3A) resultaram em 89 a 93% de bases sobreviventes (3A: 85 a 88 %).

O mapeamento das *reads* ao genoma humano (acrescido da sequência correspondente ao RNA de bloqueio) foi feito com o STAR. Entre 85 a 92 % das *reads* do transcriptoma total (amostra 7) e das amostras 1 e 2 (exceto 2C), mapearam no genoma em loci único. Já 2C, teve somente cerca de 5 % das *reads* mapeadas. A variação nessa porcentagem foi maior (45 a 89 %) nas amostras 3 e 4 (*pulldowns* com IFIT1-R38E). As amostras dos *pulldowns* sem trímico (5 e 6) tiveram entre 6 e 12 % de *reads* mapeadas. O resultado sumarizado do mapeamento pode ser observado na Figura 24B.

Tabela 8 - Descrição das amostras do *RNAseq*

Amostra e replicatas	Descrição
1A, 1B, 1C	<i>Pulldown</i> IFIT1:IFIT2:IFIT3 + mRNA
2A, 2B, 2C	<i>Pulldown</i> IFIT1:IFIT2:IFIT3 + mRNA + OH-globina
3A, 3B, 3C	<i>Pulldown</i> IFIT1-R38E:IFIT2:IFIT3 + mRNA
4A, 4B, 4C	<i>Pulldown</i> IFIT1-R38E:IFIT2:IFIT3 + mRNA + OH-globina
5	<i>Pulldown</i> sem trímico, com mRNA
6	<i>Pulldown</i> sem trímico, com mRNA e OH-globina
7	mRNA de células HEK293T, tratadas com IFN, utilizado nos <i>pulldowns</i> (transcriptoma total)

Após a contagem das *reads* que mapearam em cada posição do genoma, a variabilidade entre as *lanes* e réplicas foi avaliada. Como *lanes* da mesma amostra eram muito similares, seus dados foram agrupados em cada réplica. Já as réplicas de uma mesma amostra (principalmente aquelas contendo IFIT1-R38E) eram muito variáveis em conteúdo e não agrupavam, como observado na Figura 24C. Uma vez que, tal variabilidade poderia ser inerente ao experimento (as interações inespecíficas, que ocorrem fora do *binding pocket*, seriam aleatórias), as bibliotecas foram normalizadas somente pelo tamanho, e não pelo conteúdo.

Já normalizadas, as amostras foram comparadas conforme descrito no item 4.8.1 resultando numa lista de 168 genes possivelmente enriquecidos para a ligação de IFIT1. A contagem desses mesmos genes foi avaliada em um *heatmap* (Figura 24D), onde observou-se um agrupamento melhor entre as réplicas das amostras e uma separação entre amostras contendo o trímico com IFIT1 selvagem *versus* o trímico de IFIT1-R38E.

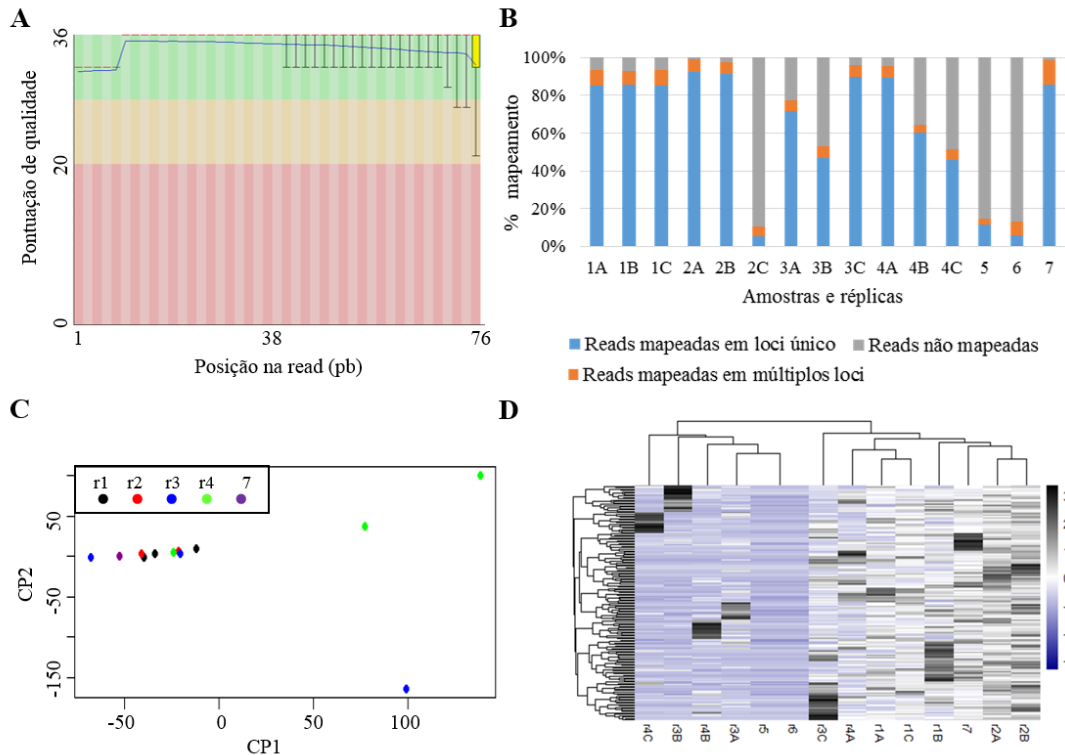


Figura 24 - Análise *RNAseq*. (A) Exemplo do resultado da análise de qualidade do sequenciamento base a base usando *fastQC* (para a amostra representativa 2A, lane 002). (B) Resultado do mapeamento das *reads* ao genoma humano (acrescido da sequência correspondente ao RNA de bloqueio) com *STAR*. (C) Análise de componentes principais das bibliotecas das réplicas (r) das amostras 1, 2, 3, 4 e 7. A análise foi feita excluindo-se as contagens no gene correspondente ao RNA de bloqueio. Proporção da variância CP1: 23.89 % e CP2: 18.73 %. CP: componente principal. (D) *Heatmap* avaliando os 168 genes enriquecidos no *pulldown* com IFIT1 selvagem. As réplicas das amostras estão dispostas de acordo com a similaridade.

A análise de enriquecimento funcional dentre esses genes demonstrou um enriquecimento significativo ( $p < 0,01$ ) para processos biológicos relacionados ao citoesqueleto, resposta celular a citocinas, sinalização por citocinas, dentre outros (resultados apresentados no Anexo I). Baseado nos valores de expressão, da taxa de enriquecimento na amostra 2 e na análise de enriquecimento funcional, 19 genes foram escolhidos para validação dos dados obtidos no *RNAseq*, são eles: DAD1, CXCR4, PPARGC1A, STYK1, IKBKG, MYD88, NR1H3, ZNF584, LARP6, ENC1, TWF2, PIP4P1, CREB3, EGR1, CLU, FLT3, PELI3, FRS3, RAB26. Foram escolhidos também 3 genes que tiveram pouca variação no enriquecimento entre todas as amostras (UQCC1, TOP1, DDX58).

Esses genes foram avaliados quanto a estrutura secundária presente na extremidade 5' UTR dos seus transcritos. No entanto, algumas dificuldades foram encontradas nessa análise: (1) um mesmo gene apresentava diversas isoformas com

variações nos primeiros nucleotídeos da 5' UTR; (2) o *mFold* geralmente produz mais de um dobramento possível para cada sequência de entrada. Somando esses dois pontos, um número grande de possíveis dobramentos era produzido para cada gene, e esses dobramentos apresentavam valores de variação de energia livre (delta G) diversos, dificultando a análise de correlação entre a estabilidade das estruturas próximo ao *cap* e a ligação por IFIT1. Exemplos de estruturas geradas para o gene IKBKG estão no Anexo II.

#### 5.11.1 Validação dos resultados do *RNAseq* em células

Uma das estratégias de validação dos resultados encontrados no experimento de *RNAseq*, foi super-expressar IFIT1-Flag em células e, então, identificar os RNAs ligados à proteína após IP. Células HEK293 foram transfectadas com plasmídeo vazio ou para expressão de IFIT1 ou para IFIT1-R38E. Após 36 horas as células foram lisadas, e o lisado utilizado em uma IP anti-Flag. Uma porção do lisado total, fração não ligada e ligada foram avaliadas por WB (Figura 25A).

Como observado nas canaletas contendo lisado total (LT, Figura 25A), a proteína mutante foi ligeiramente mais expressa que a selvagem nas células transfectadas. Proporcionalmente, se observa menos proteína na fração ligada (Lig) da IP da proteína selvagem em comparação com a mutante. Ao avaliar essas bandas (Lig) quanto a intensidade, observou-se uma expressão 1,14 vezes maior do mutante em relação à IFIT1 selvagem.

Após a IP, os RNAs associados às frações ligadas foram extraídos com TRIzol (Thermo) e a presença de alvos pré-selecionados no experimento de *RNAseq* foi analisada por RT-qPCR. A taxa de ligação foi expressa de acordo com o aumento/redução de ligação em relação a amostra do vetor vazio (que representa as interações inespecíficas e ao qual foi atribuído o valor de 1). Os valores para cada gene estão organizados na Figura 25B e foram normalizados de acordo com a intensidade das bandas da fração ligada na Figura 25A. Todos os alvos testados ligaram mais em IFIT1 selvagem do que em IFIT1-R38E (coluna Selvagem/R38E na Figura 25B). Dos genes enriquecidos no *RNAseq*, pelo menos cinco (CXCR4, CLU, PELI3, IKBKG e DAD1) apresentaram o mesmo fenótipo (pelo menos duas vezes mais ligação na proteína selvagem *versus* a mutante) no experimento de IP. Os controles negativos escolhidos (transcritos que não variaram na



ligação a IFIT1 selvagem *versus* R38E no experimento de *RNAseq* – TOP1 e UQCC1) foram enriquecidos no experimento de IP.

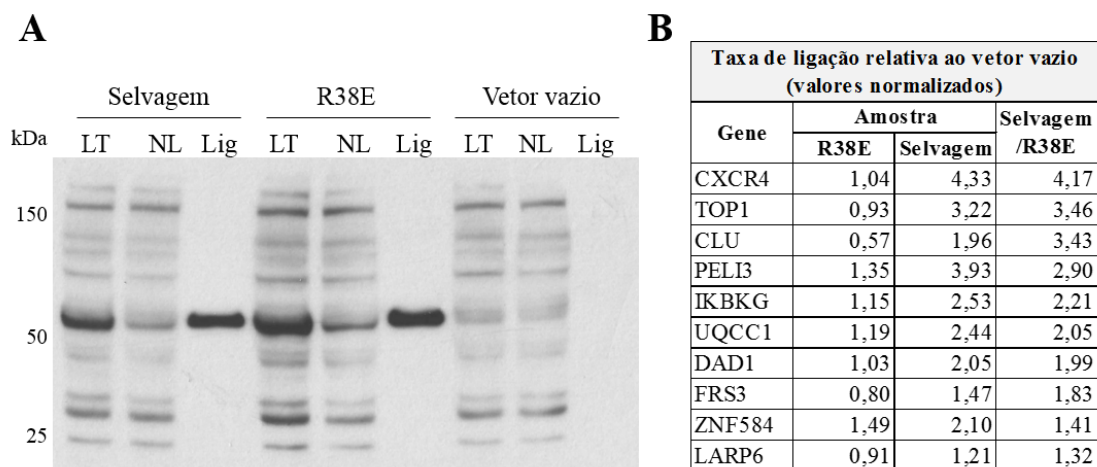


Figura 25 - Ligação de mRNAs próprios a IFIT1 em células. Células HEK293 foram transfectadas com igual concentração de plasmídeos para expressão de IFIT1-Flag selvagem ou R38E, ou vetor vazio. Após 36 horas as células foram lisadas, e o lisado utilizado em uma IP anti-Flag. (A) Alíquotas do lisado total (LT) e das frações da IP (não ligada (NL) e ligada (Lig)) das três amostras foram avaliadas por WB (conforme descrito em Materiais e métodos, anticorpo primário de camundongo anti-Flag, seguido de anticorpo anti-camundongo conjugado HRP). (B) O restante das frações ligadas foi utilizada para RT-qPCR. Na tabela estão apresentados os valores da taxa de ligação de cada transcrito a IFIT1 (selvagem ou R38E), relativos à amostra calibradora: amostra IP vetor vazio (a qual foi atribuído valor de 1 pelo método de  $\Delta\Delta Ct$ ). A diferença entre a ligação dos mRNAs a cada proteína pode ser observada na coluna mais à direita, pela razão da taxa de ligação a IFIT1 selvagem, dividida pela taxa de ligação à R38E. Os valores apresentados para cada gene foram normalizados de acordo com a intensidade das bandas da fração ligada na Figura 25A.

## 5.12 EFEITO DA SUPER-EXPRESSÃO DE IFIT1 NA TRADUÇÃO CELULAR

Os primeiros trabalhos avaliando o mecanismo de ação de IFIT1 sugeriram que esta inibe a tradução celular em geral, e de forma inespecífica, via ligação a eIF3 (GUO et al., 2000; HUI et al., 2003). No entanto, dados mais recentes apontam que IFIT1 pode ligar e inibir a tradução de RNAs contendo *cap1* (ABBAS et al., 2017a; DAUGHERTY et al., 2016), que é uma modificação presente em parte dos mRNAs celulares. Para avaliar o impacto de IFIT1 na taxa de tradução celular via ligação a mRNAs próprios, células HEK293 foram transfectadas com a proteína selvagem ou com a mutação no *binding pocket* (R38E), e então tratadas com puromicina, visando marcar cadeias de aminoácidos nascentes (Figura 26A, à esquerda). O mesmo foi feito com células transfectadas e tratadas com IFN $\beta$  (Figura 26A, à direita). Uma sutil diferença pôde ser observada na incorporação de puromicina comparando os tempos (2 e 3 horas) de tratamento de uma

mesma amostra. No entanto, nenhuma diferença significativa foi observada entre IFIT1 selvagem e mutante nos tempos experimentais avaliados.

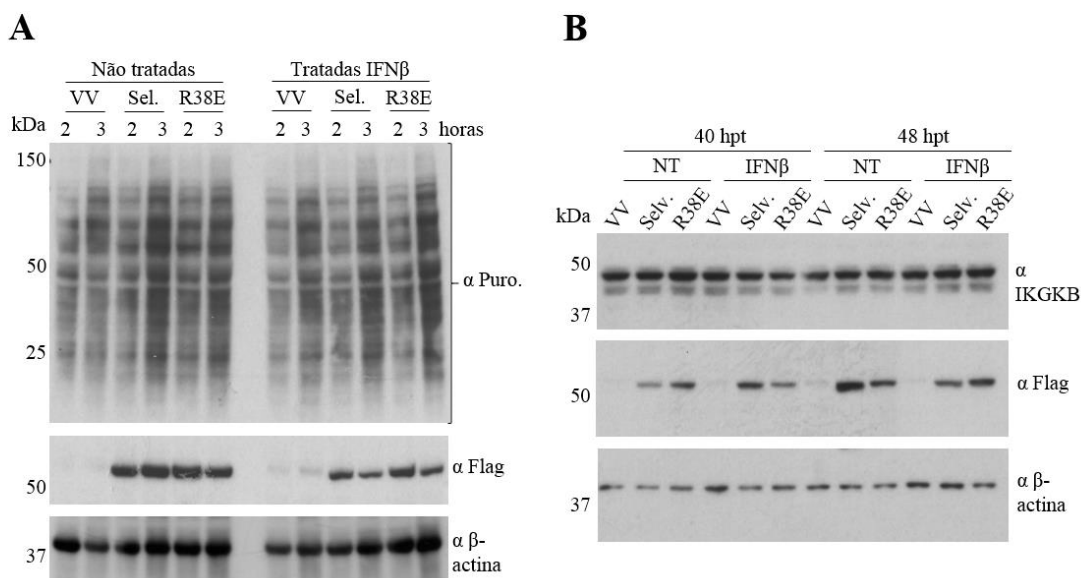


Figura 26 - Efeito da super-expressão de IFIT1 na tradução celular. (A) Células HEK293 foram transfectadas com vetor vazio, ou IFIT1 ou IFIT1-R38E. Após 3 horas a metade das células foi tratada com IFNβ 1a (1.000 U/mL). As células foram incubadas por mais 13 horas e, então, tratadas com puromicina (1 μg/mL). Após 2 ou 3 horas (conforme indicado na legenda), as células foram lisadas e as proteínas avaliadas por WB. (B) Para avaliar a expressão de IKKKB na presença de IFIT1, células HEK293 foram transfectadas com vetor vazio, ou IFIT1 ou IFIT1-R38E. Após 24 horas a metade das células foi tratada com IFNβ 1a (1.000 U/mL). Quando completadas 40 ou 48 horas após a transfecção (conforme indicado na legenda) as células foram lisadas e as proteínas avaliadas por WB. VV: vetor vazio; Selv.: IFIT1 selvagem; R38E: IFIT1-R38E; NT: não tratadas; hpt: horas pós transfecção; α: anticorpo anti; kDa: quilo Dáltons.

A expressão de dois alvos enriquecidos no experimento de *RNAseq* também foi avaliada no contexto da super-expressão de IFIT1 ou IFIT1-R38E exógenas, em células tratadas ou não com IFNβ. A expressão de IKKKB (Figura 26B) foi avaliada por *Western blot*, após 40 ou 48 horas da transfecção (e 16 ou 24 horas após o tratamento com IFNβ, respectivamente). Nesse caso, não foi observada nenhuma diferença significativa de expressão de IKKKB, mesmo naquelas amostras expressando mais IFIT1 selvagem (por exemplo: Figura 26B, Selv., NT, 48 hpt).

Já a expressão de CXCR4 foi avaliada por citometria de fluxo, após 36 horas da transfecção (e 12 horas após o tratamento com IFNβ) (Figura 27). Foi observada uma maior porcentagem de células com CXCR4 na membrana nas amostras transfectadas com IFIT1 selvagem, tanto em células não tratadas quanto tratadas com IFNβ (Figura 27F). As células transfectadas com IFIT1-R38E apresentaram porcentagem de CXCR4

semelhante (células tratadas com IFN $\beta$ ) ou maior (não tratadas) que células transfectadas com o vetor vazio.

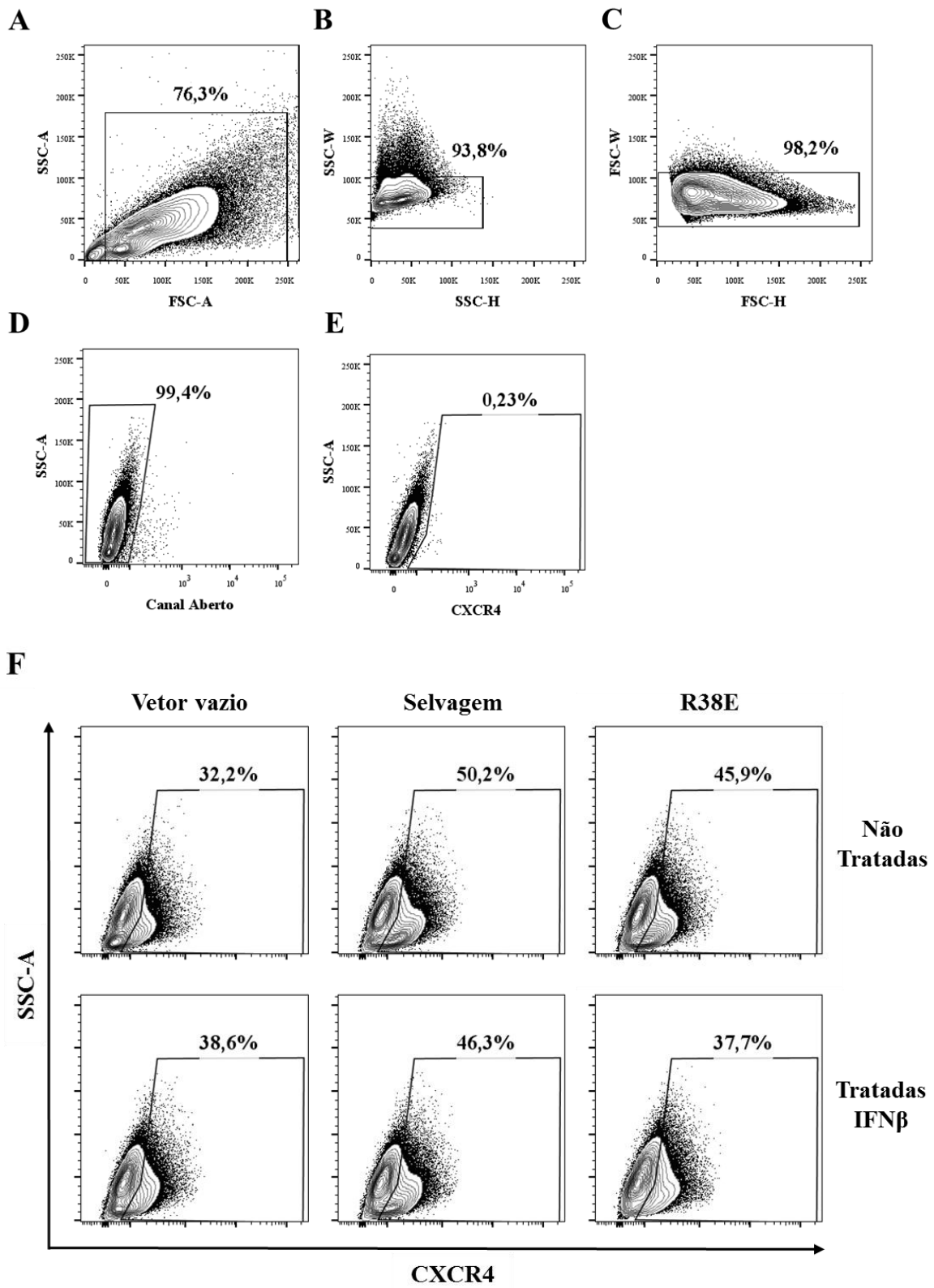


Figura 27 - Expressão de CXCR4 em células transfectadas com IFIT1 ou IFIT1-R38E. (A-E) parâmetros de compensação usando células não marcadas. Em “A” o perfil das células HEK293 não transfectadas, não tratadas e não marcadas, quanto ao tamanho e granulosidade; o quadro interno delimita o perfil das células avaliadas nas demais análises. Em “B” e “C” a exclusão de possíveis grupos de acordo com as características de complexidade/granulosidade e tamanho, respectivamente. Em “D” exclusão de eventos de auto fluorescência e em “E” a delimitação das áreas de positividade/negatividade para expressão de CXCR4. Em “F” a expressão de CXCR4 nas amostras experimentais, transfectadas com vetor vazio, ou IFIT1 selvagem ou R38E, tratadas ou não com IFN $\beta$ , conforme indicado. As porcentagens indicam as células nos quadros internos delimitados.

Os experimentos descritos neste item foram realizados uma única vez.

## 6 DISCUSSÃO

As IFITs estão entre as ISGs mais expressas durante a resposta celular intrínseca a infecções virais (PICHLMAIR et al., 2011a). O papel de IFIT1 na inibição da tradução vem sendo observado há anos (GUO et al., 2000), mas os mecanismos envolvidos só foram recentemente revelados (HABJAN et al., 2013; KIMURA et al., 2013; KUMAR et al., 2013; PICHLMAIR et al., 2011a). No entanto, apesar do número crescente de evidências apontando a interação entre as proteínas da família em células, poucos trabalhos abordaram a expressão conjunta delas em seus experimentos, e nenhum deles havia investigado os impactos da hetero-oligomerização das IFITs na atividade de IFIT1 (HABJAN et al., 2013; PICHLMAIR et al., 2011a; STAWOWCZYK et al., 2011). Neste trabalho, foi apresentada a primeira reconstituição *in vitro* dos complexos de IFIT2:IFIT3 e IFIT1:IFIT2:IFIT3 de que temos conhecimento. O entendimento de como os complexos de IFITs são formados, possibilitou investigar os impactos dessas interações na estabilidade dessas proteínas, no reconhecimento de RNAs ligantes e na regulação da tradução celular.

### 6.1 OS COMPLEXOS DE IFITs

Previamente a formação dos complexos, o estado oligomérico das IFITs recombinantes utilizadas foi determinado em solução. Consistente com um trabalho recente (ABBAS et al., 2017b), foi observada a dimerização reversível de IFIT1 de forma concentração-dependente (Figura 12A). Já IFIT2 eluiu majoritariamente na forma de um homodímero estável, como previamente reportado (YANG et al., 2012), assim como IFIT3.

Dados prévios do grupo já demonstravam que a interação entre IFIT1, IFIT2 e IFIT3 era independente da presença de RNAs (Figura 1 do Anexo IIIa). Nós então analisamos o estado oligomérico dos complexos previamente formados com proteínas recombinantes, expressas em *E. coli*. IFIT1 e IFIT3 interagiram rapidamente, mesmo a baixas temperaturas, formando um complexo estável, com massa molar correspondente a um tetrâmero, com quantidades equimolares de cada proteína. O complexo de IFIT1:IFIT2 apareceu menos definido que IFIT1:IFIT3, e eluiu como múltiplas espécies.

Além disso, a formação desse complexo demanda mais tempo e elevação da temperatura (a 30° C nas condições aqui apresentadas). Esses dados sugerem que IFIT1 interage com IFIT2 de forma distinta a que interage com IFIT3. Tentativas anteriores de definir o sítio de ligação de IFIT1:IFIT2, tiveram resultados ambíguos que sugerem falta de especificidade (STAWOWCZYK et al., 2011).

IFIT2 e IFIT3 também não interagiram a 4° C, mas formaram um heterodímero quando a mistura foi aquecida a 37° C. Tal heterodímero manteve-se estável, mesmo após sucessivas passagens nas colunas de gel filtração. A capacidade de IFIT3 em sequestrar IFIT2 no heterodímero demonstra que ela pode romper a arquitetura de “domínios trocados” de IFIT2. Assim, é possível que essas proteínas interajam de forma similar às moléculas nos homodímeros de IFIT2. Ainda, a interseção desses domínios ocorre na região N-terminal de IFIT2, corroborando dados prévios de que os primeiros quatro TPRs de IFIT2 são suficientes para interação com IFIT3 em lisados de células tratadas com IFN (STAWOWCZYK et al., 2011).

Esses estudos da interação entre IFIT2 e IFIT3 têm importantes implicações no entendimento do papel biológico dos complexos de IFITs. A super-expressão de IFIT2 foi previamente relacionada à indução de apoptose (REICH, 2013; STAWOWCZYK et al., 2011), efeito esse bloqueado pela co-expressão de IFIT3 (mas não IFIT1) (STAWOWCZYK et al., 2011). Além disso, a deleção de IFIT3 induz morte celular em células de linhagem A549, que é potencializada pela co-infecção com *Dengue virus* (HSU et al., 2013). Os dados aqui apresentados sugerem, que as formas homodiméricas de IFIT2 podem ser responsáveis por esse fenótipo, e que a co-expressão de IFIT3 pode suprimir esse efeito por prevenir a dimerização de IFIT2.

As mesmas estratégias utilizadas para formação dos complexos anteriores, foram testadas para formação do complexo entre IFIT1, IFIT2 e IFIT3 sem sucesso. Em todas as tentativas, ao incubar as três proteínas IFIT1 ligava-se rapidamente a IFIT3, e IFIT2 permanecia isolada. Essas observações demonstram novamente a forte afinidade existente entre IFIT1 e IFIT3. No entanto, evidências na literatura e dados anteriores do grupo indicavam que as três proteínas interajam em células tratadas com IFN-I. E ainda que, IFIT2 e IFIT3 enriqueciam de maneira similar em *pulldowns* utilizando IFIT1 como isca (Figura 1 do Anexo IIIa). Baseado nesses achados, a interação entre IFIT1 e o complexo IFIT2:IFIT3, pré-formado e purificado, foi testada. Utilizando essa estratégia, a formação de um trímero com as três proteínas foi observada. Devido a maior afinidade, IFIT1

potencialmente interage com a molécula de IFIT3 nesse complexo (ver modelo proposto na Figura 28). Ainda, quando IFIT1 foi adicionada em excesso, uma nova forma oligomérica eluiu, correspondendo a um tetrâmero, possivelmente formado pela interação de outra molécula de IFIT1, com IFIT2. Diferentemente do trímero, que permaneceu estável após sucessivas gel filtrações, esse tetrâmero apresentou um grau de dissociação, mesmo a 4° C, voltando a forma trimérica. Apesar dessas variações de estabilidade *in vitro*, tanto o trímero quanto o tetrâmero podem ser biologicamente relevantes. Tendo em vista que, IFIT1 é altamente expressa em células estimuladas por IFN, a forma tetramérica poderia ser formada de forma reversível nas células e, de fato, um complexo de 150 a 200 kDa contendo IFIT1, IFIT2 e IFIT3 foi previamente identificado em lisados de células HeLa (STAWOWCZYK et al., 2011). No entanto, o impacto desse complexo maior na atividade de IFIT1 ainda não está claro e, devido à instabilidade *in vitro*, ele não foi testado nos ensaios funcionais aqui demonstrados.

Outra questão a ser esclarecida é como essas proteínas associam-se em células, para formar o trímero ou tetrâmero, num cenário de co-expressão. Todas contêm ISREs nos seus promotores e são rapidamente induzidas por IFN-I. Assumindo que a condição observada com as proteínas recombinantes *in vitro* seja semelhante em células, quando se tem as três juntas, IFIT1 ligar-se-ia rapidamente a IFIT3, formando o complexo IFIT1:IFIT3 ao invés do trímero. Nas condições aqui mostradas o dímero IFIT2:IFIT3 teve que ser montado antes da adição de IFIT1. Não está claro ainda como essa regulação ocorre em células, podendo ser relacionada a questão temporal de expressão, abundância, localização no citoplasma, etc.

Passando para a avaliação da termoestabilidade, a comparação dos complexos pré-formados por fluorimetria de varredura diferencial revelou que, embora IFIT3 seja a menos estável entre as IFITs testadas, sua presença nos complexos aumenta a estabilidade de ambas, IFIT1 e IFIT2. Dentre todos os complexos, o trímero IFIT1:IFIT2:IFIT3 apresentou a maior termoestabilidade, sugerindo que esse seria o estado oligomérico mais favorável para essas proteínas.

No caso do complexo IFIT2:IFIT3, a curva de desnaturação apresentou um caráter bifásico, impedindo o cálculo da  $T_m$ . Mesmo assim, pela comparação das curvas é possível observar que o heterodímero foi, de fato, a espécie mais termodinamicamente estável. Uma possível explicação para isso seria que IFIT2 e IFIT3 desdobram

uniformemente, enquanto as regiões de interação no complexo IFIT2:IFIT3 são estabilizadas, fazendo com que o complexo desdobre em pelo menos dois estágios.

Mesmo que a estrutura de IFIT3 não tenha sido resolvida por cristalografia, predições baseadas em sequência e no alinhamento com a estrutura de IFIT2 (dados não mostrados), apontam que essa proteína também poderia formar seus homodímeros por meio de troca de domínios (*domain swapping*). Essas predições, aliadas à curva de desnaturação bifásica de IFIT2:IFIT3 e ao fato do complexo requerer calor para ser formado, sugerem que essas proteínas podem interagir também por meio de troca de domínios. Isto é, com aumento da energia no sistema, e com a movimentação das moléculas, os homodímeros de IFIT2 e IFIT3 se dissociariam, para formar o complexo heterodimérico mais estável (representação do modelo proposto na Figura 28). No entanto, a resolução da estrutura desse complexo ainda é necessária para confirmar as regiões responsáveis pela dimerização.

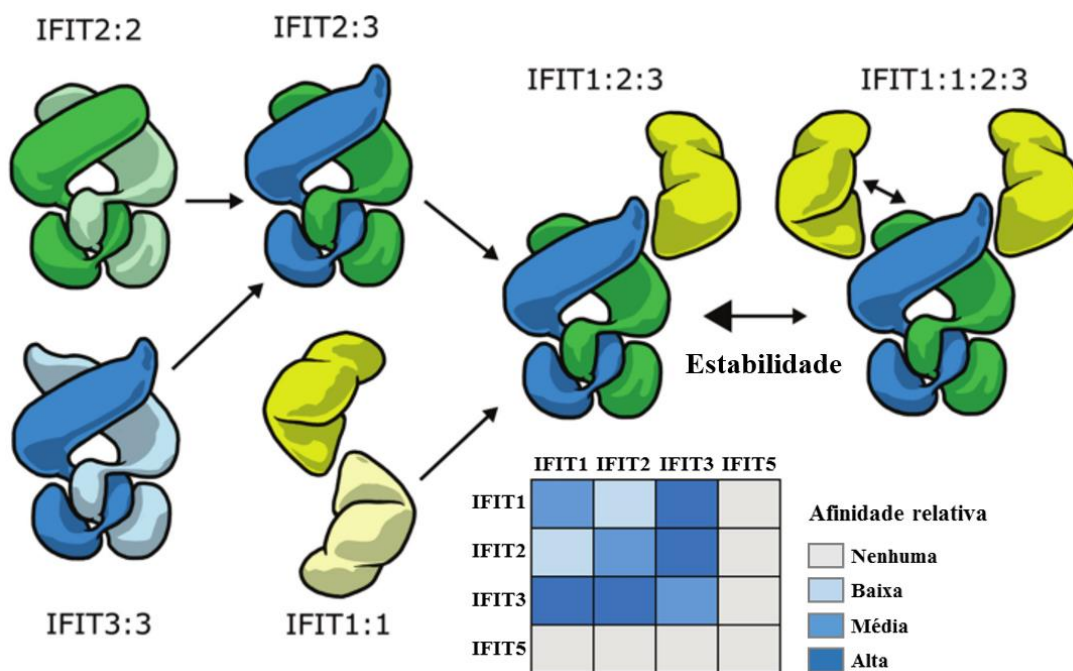


Figura 28 – Modelo proposto para a formação dos complexos de IFITs em humanos. Representação esquemática da montagem do complexo de IFIT1:IFIT2:IFIT3. Interações fracas estão indicadas como setas reversíveis. IFIT1 está representada em amarelo, IFIT2 em verde e IFIT3 em azul. O *heatmap* indica as afinidades relativas entre as proteínas da família de acordo com a legenda. Adaptado de MEARS; SWEENEY, 2018 .



A interface de interação dos demais complexos também foi avaliada. Um trabalho recente, acompanhado da estrutura cristalizada de IFIT1, revelou que a interface responsável pela homodimerização concentração-dependente de IFIT1, localiza-se no TPR9 da região C-terminal (ABBAS et al., 2017b). Conforme aqui demonstrado, IFIT3 apresenta resíduos altamente conservados nessa interface, mais precisamente o motivo YxxxL. Uma vez que, o homodímero de IFIT1 é menos estável que o complexo IFIT1:IFIT3 (como demonstrado nas análises por SEC-MALS), foi proposto que o papel funcional do motivo ‘YxxxL’ em humanos seria mediar a interação entre IFIT1 e IFIT3, mais do que promover a oligomerização de IFIT1. Versões de IFIT1 com mutações nesse motivo (também de IFIT3, dados não mostrados) foram incapazes de formar o complexo, confirmando que o motivo é, de fato, necessário para a interação entre IFIT1 e IFIT3. Corroborando esses resultados, a estrutura co-cristal de IFIT1 em associação com a extremidade C-terminal de IFIT3 (duas hélices e meia) foi recentemente disponibilizada (JOHNSON et al., 2018). Essa estrutura revela que a interface IFIT1:IFIT3 sobrepõe a região de homodimerização de IFIT1 e que a região C-terminal de IFIT3 se posiciona de maneira muito similar àquela orientação adotada pela segunda molécula de IFIT1 no homodímero. Além disso, a região C-terminal de IFIT3 é mais prolongada, expandindo a interface de interação com IFIT1, o que poderia explicar a maior afinidade do complexo IFIT1:IFIT3 em relação a homodimerização de IFIT1.

Consistente com esses resultados, embora os resíduos críticos do motivo ‘YxxxL’ estejam conservados em IFIT5, eles são enterrados na interface por uma hélice terminal não presente em IFIT1 (ABBAS et al., 2013, 2017a). Isso explicaria porque IFIT1 e IFIT5 não interagem. Ainda, Ifit3 murina, a qual não interage com Ifit1b1 murina, tem uma grande deleção em sua região C-terminal (se comparada a IFIT3 humana). Como resultado dessa deleção, Ifit3 murina perdeu o motivo estrutural ‘YxxxL’, presente em ambos IFIT3 e IFIT1. Em roedores, o gene Ifit1b1 foi duplicado, então é possível que estas IFITs extras compensem a falta de interação entre Ifit1b1-Ifit3 (DAUGHERTY et al., 2016; JOHNSON et al., 2018).

Uma vez que, a tirosina nesse motivo YxxxL é essencial para a interação entre IFIT1 e IFIT3, seria interessante determinar se esse resíduo pode ser fosforilado e qual o impacto dessa modificação nas atividades modulatórias da proteína/complexo. Já foi demonstrado que IFIT1 é fosforilada durante a infecção por *Sendai virus*, mas o significado biológico dessa observação não foi investigado (LI et al., 2009). Ainda, foi

observado que em células HeLa super-expressando IFIT1, uma pequena proporção de IFIT1 é ISGlada (ZHAO et al., 2005), mas o impacto disso na formação dos complexos e atividade de IFIT1 também não está claro.

A interface de interação IFIT1: IFIT2 também foi investigada usando as versões de IFIT1 com mutações no motivo YxxxL. No entanto, nesse caso, todos os mutantes continuaram interagindo com IFIT2, em diferentes graus. Outra consideração é que o motivo YxxxL por si só não é conservado em IFIT2, sendo a tirosina substituída por uma serina. Tais achados sugerem que IFIT1 e IFIT2 interagem de diferentes formas, podendo formar diversas organizações oligoméricas, como demonstrado nos experimentos de SEC-MALS. Esses dados corroboram ainda uma certa inespecificidade na interação entre IFIT1 e IFIT2 observada em células. Stawowczyk et al. (2011) por exemplo, co-transfectaram IFIT1 e diversas versões truncadas de IFIT2 (removendo diferentes TPRs por vez) em células HeLa e observaram co-imunoprecipitação das duas proteínas em todos os casos.

#### 6.1.1 Impacto da oligomerização na estabilidade e atividade de IFIT1

Como já mencionado, a presença de IFIT3 nos complexos, aumentou a termoestabilidade relativa de IFIT1 e IFIT2 por fluorimetria de varredura diferencial. Mas isso não ocorre somente *in vitro*. A expressão de IFIT1 é estabilizada em células (HEK293T) co-expressando IFIT3, sendo esse efeito dependente da integridade do motivo YxxxL (dados não mostrados, Figura 6c do artigo no Anexo IIIa). Resultados semelhantes foram obtidos em outro trabalho (JOHNSON et al., 2018), que demonstrou que esse aumento da estabilidade mediado por IFIT3 prolonga a meia-vida de IFIT1 em células, de menos de duas horas para mais de 24 horas. Possíveis explicações para tais achados seriam uma maior estabilidade intrínseca do complexo IFIT1:IFIT3, como já demonstrado, se comparado ao homodímero de IFIT1, ou mesmo que a interação com IFIT3 “esconda” alguns resíduos importantes para indução da degradação de IFIT1. Assim, uma das formas de IFIT3 potencializar a atividade de IFIT1 em células é justamente por aumentar a disponibilidade da proteína.

No entanto, mesmo quando a concentração de IFIT1 pode ser controlada, como nos ensaios *in vitro*, foi observada uma mudança na atividade de IFIT1. Tanto IFIT1:IFIT3 quanto o trímero IFIT1:IFIT2:IFIT3 apresentaram duas vezes de aumento

na capacidade de ligação a RNAs *cap0*, tanto nos ensaios de *toeprinting* aqui apresentados, como em ensaios de *filter binding* para IFIT1:IFIT3 (JOHNSON et al., 2018). A ligação de IFIT3 também parece aumentar a especificidade de ligação de IFIT1 a RNAs *cap0* (JOHNSON et al., 2018).

Além disso, as reações contendo IFIT1:IFIT3 ou IFIT1:IFIT2:IFIT3 atingiram a saturação de ligação nos ensaios de *toeprinting*, isto é, praticamente todo cDNA foi produzido na versão truncada. Por outro lado, quando apenas IFIT1 e o RNA *cap0*-ZV (5' UTR mais estruturada) foram utilizados, uma porção de IFIT1 inicialmente ligada parece ser deslocada pela transcriptase reversa e, como resultado, foi observada a formação do cDNA inteiro mesmo na presença de altas concentrações de IFIT1. Uma possível explicação para isso seria que a interação com IFIT3 induz IFIT1 a adotar uma conformação mais fechada, estabilizando ainda mais a interação com o mRNA *cap0*, de forma que a proteína não possa ser mais removida pela transcriptase reversa. Um mecanismo similar a este já foi descrito para IFIT5, a qual alterna entre uma conformação “aberta” e “fechada” para ligar RNAs com extremidade 5' trifosfato livre (não capeados) (ABBAS et al., 2013).

O papel fisiológico dessa estabilização promovida por IFIT3 não está claro, uma vez que a ligação de IFIT1 ao *cap0*-mRNA por si só já é suficiente para impedir a associação com eIF4F *in vitro* (KUMAR et al., 2013). Também nos ensaios de tradução aqui apresentados, IFIT1 por si só, inibiu a tradução de ambos os repórteres (*cap0*-globina e ZV), com efeito mais pronunciado sob o *cap0*-globina, corroborando os achados recentes de que ambos, estado de metilação e estrutura da região 5' UTR do RNA, influenciam a susceptibilidade à inibição por IFIT1 (ABBAS et al., 2017; MENACHERY et al. 2017; YOUNG et al., 2016). Entretanto, presença de IFIT3 nos complexos (IFIT1:IFIT3 e trímero) aumentou o efeito inibitório de IFIT1 na tradução dos repórteres. O mesmo efeito foi observado em células (HEK293T), nas quais a co-expressão de IFIT1 e IFIT3 potencializou a inibição da tradução de *cap0*-ZV. Trabalhos anteriores já apontavam que a co-expressão de outras IFITs em células potencializa a atividade antiviral de IFIT1 (PICHLMAIR et al., 2011b), e mais recentemente foi demonstrado que flavivírus com metiltransferases afuncionais são mais suscetíveis a restrição mediada por IFIT1 quando IFIT3 foi super-expressa (JOHNSON et al., 2018).

O papel da participação de IFIT2 nos complexos também não está claro. Nos ensaios de ligação aqui apresentados, nenhuma diferença detectável foi observada quando

o complexo de IFIT1:IFIT2 foi utilizado. A interação entre IFIT1 e IFIT2 não teve efeito na atividade de IFIT1 e aumentou minimamente a estabilização de IFIT1 em células.

### 6.1.2 Impacto da oligomerização na interação com o complexo de MAVS

Como sumarizado na Introdução, as IFITs modulam a sinalização celular no eixo MAVS-STING-TBK1 (LI et al., 2009; REYNAUD et al., 2015; WANG et al., 2018; ZHENG et al., 2015). No entanto, esses estudos avaliaram, em geral, a atividade das proteínas da família isoladamente, sem considerar o impacto da formação dos complexos de IFITs. Nesse sentido, mais estudos serão necessários para compreender a fundo a participação dessas proteínas na via num cenário de co-expressão. IFIT3 poderia, por exemplo, prevenir o efeito inibitório de IFIT1, por competir pela ligação com STING, ou mantendo IFIT1 em uma conformação que impeça a interação com STING. Por outro lado, a formação dos complexos poderia encobrir sítios de ligação para interação com outras proteínas. A formação IFIT1:IFIT2:IFIT3 poderia, por exemplo, prevenir a potencialização da ativação da via MAVS mediada por IFIT3, como uma forma de modulação da resposta inflamatória antiviral.

A formação do complexo de IFIT2:IFIT3 poderia ter outros efeitos na célula, além dos já mencionados com relação à prevenção da apoptose. Como essas proteínas interagem provavelmente via troca de domínios, a associação pode impactar diretamente a interação de IFIT3 com TBK1. Em IFIT2 o aminoácido correspondente ao segundo glutamato na interação IFIT3:TBK1 é substituído por uma lisina, gerando um potencial eletrostático distinto, que poderia interferir no recrutamento de TBK1. Em todas essas possibilidades discutidas, a temporalidade na expressão das proteínas da família, e a localização espacial na célula, também seriam fatores determinantes na modulação da resposta celular frente a diferentes infecções.

## 6.2 IFIT1 INTERAGE COM mRNAs CELULARES

A inibição da tradução celular mediada por IFIT1 foi inicialmente atribuída a ligação de IFIT1 a eIF3. Essa conclusão baseia-se em experimentos utilizando uma versão mutante truncada de IFIT1, que não interage com eIF3, e que também não inibe tradução celular (GUO et al., 2000). Curiosamente, o mutante utilizado nesse estudo apresentava

somente os aminoácidos 1 a 339 de IFIT1, ou seja, boa parte da região C-terminal foi deletada, inclusive o motivo YxxxL. Aliado aos achados mais recentes, de que IFIT1 e IFIT3 formam um complexo estável em células e que ambas são geralmente co-expressas, a ligação de IFIT3 pode potencialmente ocluir o sítio de ligação a eIF3. Dessa forma, a relevância biológica da interação IFIT1-eIF3 precisaria ser revisitada e outros mecanismos de inibição da tradução celular por IFIT1 propostos.

Dois trabalhos recentes demonstraram que IFIT1 pode ligar-se a mRNAs contendo *cap1* quando em altas concentrações e dependendo da estrutura secundária presente na extremidade 5' logo após o *cap* (ABBAS et al., 2017a; DAUGHERTY et al., 2016). Como IFIT1 é altamente expressa após o estímulo, esse achado poderia explicar alternativamente a inibição da tradução mediada por IFIT1. Nesse caso, ao ligar-se ao *cap* de mRNAs próprios IFIT1 competiria com a ligação de eIF4E/4F, inibindo a tradução dos alvos da mesma forma como inibe a tradução dos RNAs virais.

Para investigar se essa interação ocorre em células, foi utilizado um ensaio de *pulldown*, no qual mRNA de células tratadas com IFN-I foi incubado com IFIT1:IFIT2:IFIT3, contendo IFIT1 selvagem ou um mutante cuja substituição de um aminoácido inibe ligação de RNAs no *binding pocket* (IFIT1-R38E). Esse experimento permitiu identificar uma série de mRNAs celulares ligados e enriquecidos para ligação no complexo contendo IFIT1 selvagem, isto é, interações específicas com o *binding pocket*. Esses mRNAs alvo não puderam ser agrupados de acordo com a estabilidade da estrutura na 5' UTR, pelo número significativo de possíveis estruturas geradas no *mFold* para cada isoforma. No entanto, essa análise será importante após a validação dos resultados em outros ensaios. Já a análise de enriquecimento funcional dentre esses alvos demonstrou um enriquecimento significativo para processos biológicos relacionados ao citoesqueleto, resposta celular a citocinas, sinalização por citocinas, dentre outros.

A ligação a esses transcritos foi parcialmente validada em células, no experimento de super-expressão de IFIT1 e IP. Alguns transcritos apresentaram o mesmo fenótipo de ligação e enriquecimento observados no *RNAseq*. O não enriquecimento de outros alvos, ou o enriquecimento de transcritos previamente tidos como controle negativo, pode ser possivelmente explicada por diferenças nos dois experimentos. O experimento de *pulldown-RNAseq* foi feito com mRNA de células HEK293T tratadas com IFN $\alpha$ , e utilizando o complexo IFIT1:IFIT2:IFIT3 recombinante, purificado *in vitro*. Além disso, foi utilizado no *pulldown* um RNA bloqueador na tentativa de diferenciar as ligações

inespecíficas. Já a IP foi feita com lisado de células HEK293, transfectadas para super-expressar IFIT1-Flag (selvagem ou R38E), não tratadas com IFN (assim sendo IFIT2, IFIT3 e outras ISGs estavam provavelmente ausentes no sistema).

O impacto da super-expressão de IFIT1, selvagem ou R38E, na tradução celular em geral, ou de genes específicos também foi avaliada. No experimento preliminar realizado, não foi observada diferença significativa nas células expressando IFIT1, quanto a incorporação de puromicina nas cadeias de aminoácidos nascentes. Esse resultado se opõe a achados anteriores de que a expressão de IFIT1 leva a redução da tradução total, em experimentos de incorporação de metionina e cisteína marcadas com isótopo  $^{35}\text{S}$  em células HT1080 (GUO et al., 2000). Também, e de forma preliminar, não foi observada diferença na expressão de IKGKB, frente a super-expressão de IFIT1. No entanto, esses experimentos foram realizados uma única vez e os tempos experimentais ainda precisam ser otimizados, com relação a meia-vida de cada alvo nas células e ao tempo de saturação da incorporação de puromicina. Surpreendentemente, dentre as células transfectadas com IFIT1 selvagem uma porcentagem maior apresentou CXCR4 na membrana, se comparada àquelas transfectadas com vetor vazio e R38E. Como ainda não se sabe o destino dos RNAs ligados a IFIT1, uma explicação alternativa seria que a proteína atua de forma contrária, estabilizando os alvos, aumentando sua meia-vida e a disponibilidade para a tradução. Por um lado, IFIT1 protegeria os mRNAs próprios da maquinaria de degradação celular, em parte desencadeada pela remoção do *cap* pelo complexo da enzima *Dcp2* (SONG; LI; KILEDJIAN, 2010; VAN DIJK et al., 2002), e de outro, como a interação com *cap1* é de baixa afinidade (se comparada a *cap0*) (ABBAS et al., 2017a; DAUGHERTY et al., 2016), talvez a IFIT1 possa se desprender frente a competição com eIF4E/4F, permitindo assim a tradução. Todas essas possibilidades precisarão ainda ser avaliadas para elucidar o papel de IFIT1, e seus complexos na tradução celular.

## 7 CONCLUSÕES

- IFIT1 se liga à IFIT3 rapidamente e com alta afinidade, por meio de um motivo “YxxxL” presente na região C-terminal, formando um heterotetrâmero estável com quantidades equimolares de cada proteína.
- IFIT1:IFIT2 formam múltiplas espécies oligoméricas, sendo um tetrâmero a espécie principal. IFIT2:IFIT3 formam um heterodímero mais estável que os respectivos homodímeros.
- *In vitro* IFIT1, IFIT2 e IFIT3 podem associar-se em um trímero contendo concentrações equimolares de cada proteína, ou em um tetrâmero contendo 2:1:1 moléculas de cada proteína, respectivamente. O tetrâmero é instável.
- A presença de IFIT3 nos complexos estabiliza IFIT1 e potencializa a sua capacidade de ligação e inibição da tradução de RNAs contendo *cap0 in vitro* e em células.
- IFIT1 se liga a mRNAs próprios em células.

## 8 PERSPECTIVAS

Ao final deste trabalho, algumas questões permanecem em aberto, necessitando de investigações futuras. Ainda não está definido, por exemplo, como IFIT2 interage nos complexos e qual seria o seu papel em IFIT1:IFIT2 e IFIT1:IFIT2:IFIT3. Além disso, não está claro como um complexo é formado nas células em detrimento de outro, e se isso está correlacionado à expressão temporal ou à localização espacial das proteínas da família na célula. Assim como, quais os impactos dessa oligomerização na interação com outras proteínas celulares. Da mesma forma, pouco se sabe sobre a expressão de IFIT1B e sua função, apesar de ter sido demonstrado que a proteína interage com IFIT1 e IFIT3 (PICHLMAIR et al., 2011b).

Já a interação de IFIT1 com mRNAs celulares abriu várias outras possibilidades de investigação. Primeiramente, a ligação a esses RNAs de forma específica precisa ser confirmada utilizando mais algumas técnicas *in vitro* e em células. Segundo, demonstrar qual seria o impacto da ligação na tradução de outros alvos não testados (e mesmo em CXCR4 e IKGKB) em diferentes condições experimentais. Ainda, como IFIT1 distinguiria seus mRNAs alvo em células e qual o destino dos mRNAs ligados a IFIT1. Por fim, a caracterização final da interação desses complexos com mRNAs depende da obtenção das suas estruturas em alta resolução.



## BIBLIOGRAFIA

- ABBAS, Y. M. et al. Structural basis for viral 5'-PPP-RNA recognition by human IFIT proteins. **Nature**, v. 494, n. 7435, p. 60–64, 2013.
- ABBAS, Y. M. et al. Structure of human IFIT1 with capped RNA reveals adaptable mRNA binding and mechanisms for sensing N1 and N2 ribose 2'-O methylations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201612444, 2017a.
- ABBAS, Y. M. et al. A conserved homo-dimerization interface in human IFIT1 provides insights into IFIT interactome assembly. **bioRxiv**, 2017b.
- ANDREWS, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- BANDYOPADHYAY, S. K. et al. Transcriptional Induction by Double-stranded RNA Is Mediated by Interferon-stimulated Response Elements without Activation of Interferon-stimulated Gene Factor 3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 33, p. 19624–19629, 18 ago. 1995.
- BAUM, A.; GARCÍA-SASTRE, A. Induction of type I interferon by RNA viruses: cellular receptors and their substrates. **Amino acids**, v. 38, n. 5, p. 1283–99, maio 2010.
- BERCHTOLD, S. et al. Forced IFIT-2 expression represses LPS induced TNF-alpha expression at posttranscriptional levels. **BMC Immunology**, v. 9, 2008.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.
- CHO, H. et al. Differential innate immune response programs in neuronal subtypes determine susceptibility to infection in the brain by positive-stranded RNA viruses. **Nature Medicine**, v. 19, n. 4, p. 458–464, 2013.
- D'ANDREA, L. D.; REGAN, L. TPR proteins: the versatile helix. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 12, p. 655–662, 1 dez. 2003.
- DAFFIS, S. et al. 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. **Nature**, v. 468, n. 7322, p. 452–456, 2010.
- DARNELL, J. E.; KERR, I. M.; STARK, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science**, v. 264, n. 5164, p. 1415–1421, 1994.
- DAUGHERTY, M. D. et al. Evolution-guided functional analyses reveal diverse antiviral specificities encoded by ifit1 genes in mammals. **eLife**, v. 5, n. MAY2016, p. 1–22, 2016.
- DER, S. D. et al. Identification of genes differentially regulated by interferon , , or using oligonucleotide arrays. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 26, p. 15623–15628, 22 dez. 1998.
- DIAMOND, M. S.; FARZAN, M. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 1, p. 46–57, 2013.
- DOBIN, A. et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 15–21, 2013.

- FENG, X. et al. MicroRNA-645, up-regulated in human adenocarcinoma of gastric esophageal junction, inhibits apoptosis by targeting tumor suppressor IFIT2. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, 2014.
- FENSTERL, V. et al. Interferon-Induced Ifit2/ISG54 Protects Mice from Lethal VSV Neuropathogenesis. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 5, p. e1002712, 17 maio 2012.
- FENSTERL, V.; SEN, G. C. The *ISG56/IFIT1* Gene Family. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 31, n. 1, p. 71–78, 2011.
- FURUICHI, Y. et al. Methylated, blocked 5 termini in HeLa cell mRNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, n. 5, p. 1904–1908, 1975.
- GRANDVAUX, N. et al. Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. **Journal of virology**, v. 76, n. 11, p. 5532–9, 2002.
- GUO, J. et al. A new pathway of translational regulation mediated by eukaryotic initiation factor 3. **The EMBO journal**, v. 19, n. 24, p. 6891–9, 2000.
- GUO, J.; PETERS, K. L.; SEN, G. C. Induction of the human protein P56 by interferon, double-stranded rna, or virus infection. **Virology**, v. 267, n. 2, p. 209–219, 2000.
- HABJAN, M. et al. Sequestration by IFIT1 Impairs Translation of 2'O-unmethylated Capped RNA. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, 2013.
- HOU, Z. et al. Hepatitis B virus inhibits intrinsic RIG-I and RIG-G immune signaling via inducing miR146a. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.
- HSU, Y. L. et al. Protective roles of interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT3) in dengue virus infection of human lung epithelial cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.
- HUI, D. J. et al. Viral stress-inducible protein p56 inhibits translation by blocking the interaction of eIF3 with the ternary complex eIF2·GTP· Met-tRNAi. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 41, p. 39477–39482, 2003.
- HYDE, J. L. et al. A Viral RNA Structural Element Alters Host Recognition of Nonself RNA. **Science**, v. 343, n. 6172, p. 783–787, 2014.
- JOHNSON, B. et al. Human IFIT3 Modulates IFIT1 RNA Binding Specificity and Protein Stability. **Immunity**, p. 1–13, 2018.
- KATIBAH, G. E. et al. TRNA Binding, Structure, and Localization of the Human Interferon-Induced Protein IFIT5. **Molecular Cell**, v. 49, n. 4, p. 743–750, 2013.
- KIMURA, T. et al. Ifit1 Inhibits Japanese Encephalitis Virus Replication through Binding to 5' Capped 2'-O Unmethylated RNA. **Journal of Virology**, v. 87, n. 18, p. 9997–10003, 2013.
- KOHLI, A. et al. Distinct and overlapping genomic profiles and antiviral effects of Interferon- $\lambda$  and - $\alpha$  On HCV-infected and noninfected hepatoma cells. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 19, n. 12, p. 843–853, 2012.
- KUMAR, P. et al. Inhibition of translation by IFIT family members is determined by their ability to interact selectively with the 5'-terminal regions of cap0-, cap1- and

- 5'ppp- mRNAs. **Nucleic acids research**, v. 42, n. 5, p. 3228–45, 2013.
- KUSARI, J.; SEN, G. C. Regulation of synthesis and turnover of an interferon-inducible mRNA. **Molecular and cellular biology**, v. 6, n. 6, p. 2062–7, 1986.
- LAI, K.-C. et al. IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 inhibits migration activity and increases survival of oral squamous cell carcinoma. **Molecular cancer research : MCR**, v. 6, n. 9, p. 1431–1439, 2008.
- LAI, K. C. et al. Depleting IFIT2 mediates atypical PKC signaling to enhance the migration and metastatic activity of oral squamous cell carcinoma cells. **Oncogene**, v. 32, n. 32, p. 3686–3697, 2013.
- LI, S.-H. et al. Rational Design of a Flavivirus Vaccine by Abolishing Viral RNA 2'-O Methylation. **Journal of Virology**, v. 87, n. 10, p. 5812–5819, 2013.
- LI, Y. et al. ISG56 is a negative-feedback regulator of virus-triggered signaling and cellular antiviral response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 19, p. 7945–7950, 2009.
- LIAO, Y.; SMYTH, G. K.; SHI, W. FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. **Bioinformatics**, v. 30, n. 7, p. 923–930, 2014.
- LIU, X.-Y. et al. IFN-Induced TPR Protein IFIT3 Potentiates Antiviral Signaling by Bridging MAVS and TBK1. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 5, p. 2559–2568, 2011.
- LIU, Y. et al. Lineage-Specific Expansion of IFIT Gene Family: An Insight into Coevolution with IFN Gene Family. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.
- MEARS, H. V.; SWEENEY, T. R. Better together: the role of IFIT protein–protein interactions in the antiviral response. **Journal of General Virology**, p. 1–15, 2018.
- MENACHERY, V. D. et al. Attenuation and Restoration of SARS-CoV Mutant lacking 2' O Methyltransferase Activity. **Journal of Virology**, v. 88, n. 8, p. 4251–64, 2014.
- MERRICK, W. C. **Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems**Gene, 2004.
- NGUYEN, H.; HISCOTT, J.; PITHA, P. M. **The growing family of interferon regulatory factors**Cytokine and Growth Factor Reviews, 1997.
- NIESEN, F. H.; BERGLUND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2212–2221, 2007.
- PICHLMAIR, A. et al. IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA. **Nature immunology**, v. 12, n. 7, p. 624–30, 2011a.
- PICHLMAIR, A. et al. IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5[prime]-triphosphate RNA. **Nature Immunology**, v. 12, n. 7, p. 624–630 LA–en, 2011b.
- RAMANATHAN, A.; ROBB, G. B.; CHAN, S. H. **mRNA capping: Biological functions and applications**Nucleic Acids Research, 2016.
- RAYCHOUDHURI, A. et al. ISG56 and IFITM1 Proteins Inhibit Hepatitis C Virus

- Replication. **Journal of Virology**, v. 85, n. 24, p. 12881–12889, 15 dez. 2011.
- REICH, N. C. A death-promoting role for ISG54/IFIT2. **Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, v. 33, n. 4, p. 199–205, 2013.
- REYNAUD, J. M. et al. IFIT1 Differentially Interferes with Translation and Replication of Alphavirus Genomes and Promotes Induction of Type I Interferon. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 4, 2015.
- SAIKIA, P.; FENSTERL, V.; SEN, G. C. The Inhibitory Action of P56 on Select Functions of E1 Mediates Interferon's Effect on Human Papillomavirus DNA Replication. **Journal of Virology**, v. 84, n. 24, p. 13036–13039, 2010.
- SEN, G. C.; FENSTERL, V. Crystal structure of IFIT2 (ISG54) predicts functional properties of IFITs. **Cell Research**, v. 22, n. 10, p. 1407–1409, 2012.
- SONG, M. G.; LI, Y.; KILEDJIAN, M. Multiple mRNA Decapping Enzymes in Mammalian Cells. **Molecular Cell**, v. 40, n. 3, p. 423–432, 2010.
- STARK, G. R. et al. How Cells Respond to Interferons. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 227–264, 1998.
- STAWOWCZYK, M. et al. The interferon stimulated gene 54 promotes apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 9, p. 7257–7266, 2011.
- SZRETTTER, K. J. et al. 2'-O methylation of the viral mRNA cap by West Nile virus evades Ifit1-dependent and -independent mechanisms of host restriction in vivo. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 5, 2012.
- TERENZI, F. et al. Distinct induction patterns and functions of two closely related interferon-inducible human genes, ISG54 and ISG56. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 45, p. 34064–34071, 2006.
- TERENZI, F.; SAIKIA, P.; SEN, G. C. Interferon-inducible protein, P56, inhibits HPV DNA replication by binding to the viral protein E1. **EMBO Journal**, v. 27, n. 24, p. 3311–3321, 2008.
- VAN DIJK, E. et al. Human Dcp2: A catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. **EMBO Journal**, v. 21, n. 24, p. 6915–6924, 2002.
- WACHER, C. et al. Coordinated Regulation and Widespread Cellular Expression of Interferon-Stimulated Genes (ISG) ISG-49, ISG-54, and ISG-56 in the Central Nervous System after Infection with Distinct Viruses. **Journal of Virology**, v. 81, n. 2, p. 860–871, 2007.
- WANG, J. et al. Elevated IFIT3 Contributes to Abnormal Overactive cGAS-STING Signaling in Human Systemic Lupus Erythematosus Monocytes. **Arthritis & Rheumatology**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2018.
- XIAO, S. et al. RIG-G as a key mediator of the antiproliferative activity of interferon-related pathways through enhancing p21 and p27 proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 44, p. 16448–16453, 2006.
- YANG, Z. et al. Crystal structure of ISG54 reveals a novel RNA binding structure and potential functional mechanisms. **Cell Research**, v. 22, n. 9, p. 1328–1338, 2012.

YOUNG, M. D. et al. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. **Genome Biology**, v. 11, n. 2, 2010.

ZHANG, B. et al. IFIT5 potentiates anti-viral response through enhancing innate immune signaling pathways. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 45, n. 10, p. 867–874, 2013.

ZHENG, C. et al. IFIT5 positively regulates NF- $\kappa$ B signaling through synergizing the recruitment of I $\kappa$ B kinase (IKK) to TGF- $\beta$ -activated kinase 1 (TAK1). **Cellular Signalling**, v. 27, n. 12, p. 2343–2354, 2015.

ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3406–3415, 2003.

ZÜST, R. et al. Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. **Nature Immunology**, v. 12, n. 2, p. 137–143, 2011.

ZÜST, R. et al. Rational Design of a Live Attenuated Dengue Vaccine: 2'-O-Methyltransferase Mutants Are Highly Attenuated and Immunogenic in Mice and Macaques. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 8, 2013.

## ANEXO I

Análise de enriquecimento funcional dos 168 genes cujos transcritos foram enriquecidos para ligação em IFIT1.

ENSG	Gene Symbol	GOid	pvalue	description	GOterm
ENSG00000134627	PIWIL4	GO:0034584	0.000422	piRNA binding	MF
ENSG00000182459	TEX19	GO:0034584	0.000422	piRNA binding	MF
ENSG00000120738	EGR1	GO:1902949	0.000478	positive regulation of tau-protein kinase activity	BP
ENSG00000120885	CLU	GO:1902949	0.000478	positive regulation of tau-protein kinase activity	BP
ENSG00000107175	CREB3	GO:0000982	0.000517	transcription factor activity, RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific binding	MF
ENSG00000120738	EGR1	GO:0000982	0.000517	transcription factor activity, RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific binding	MF
ENSG00000185669	SNAI3	GO:0000982	0.000517	transcription factor activity, RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific binding	MF
ENSG00000172936	MYD88	GO:0008063	0.001022	Toll signaling pathway	BP
ENSG00000174516	PELI3	GO:0008063	0.001022	Toll signaling pathway	BP
ENSG00000087085	ACHE	GO:0043621	0.00112	protein self-association	MF
ENSG00000122025	FLT3	GO:0043621	0.00112	protein self-association	MF
ENSG00000167034	NKX3-1	GO:0043621	0.00112	protein self-association	MF
ENSG00000172936	MYD88	GO:0043621	0.00112	protein self-association	MF
ENSG00000074276	CDHR2	GO:0032532	0.001462	regulation of microvillus length	BP
ENSG00000247596	TWF2	GO:0032532	0.001462	regulation of microvillus length	BP
ENSG00000006747	SCIN	GO:0042989	0.001528	sequestering of actin monomers	BP
ENSG00000247596	TWF2	GO:0042989	0.001528	sequestering of actin monomers	BP
ENSG00000163508	EOMES	GO:0021796	0.001573	cerebral cortex regionalization	BP
ENSG00000170370	EMX2	GO:0021796	0.001573	cerebral cortex regionalization	BP
ENSG00000120738	EGR1	GO:0045080	0.002153	positive regulation of chemokine biosynthetic process	BP
ENSG00000172936	MYD88	GO:0045080	0.002153	positive regulation of chemokine biosynthetic process	BP
ENSG00000006747	SCIN	GO:0003779	0.002178	actin binding	MF
ENSG00000015285	WAS	GO:0003779	0.002178	actin binding	MF
ENSG00000042493	CAPG	GO:0003779	0.002178	actin binding	MF
ENSG00000109063	MYH3	GO:0003779	0.002178	actin binding	MF
ENSG00000117228	GBP1	GO:0003779	0.002178	actin binding	MF
ENSG00000121966	CXCR4	GO:0003779	0.002178	actin binding	MF
ENSG00000158164	TMSB15A	GO:0003779	0.002178	actin binding	MF
ENSG00000171617	ENC1	GO:0003779	0.002178	actin binding	MF
ENSG00000247596	TWF2	GO:0003779	0.002178	actin binding	MF
ENSG00000015285	WAS	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000083817	ZNF416	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000120885	CLU	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000135747	ZNF670- ZNF695	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000137218	FRS3	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000140986	RPL3L	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000147117	ZNF157	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000149260	CAPN5	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000153531	ADPRHL1	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000163508	EOMES	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000166153	DEPDC4	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000167034	NKX3-1	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000169629	RGPD8	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000171574	ZNF584	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000172602	RND1	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000175906	ARL4D	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000187045	TMPRSS6	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000188042	ARL4C	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000203326	ZNF525	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000222046	DCDC2B	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC

ENSG00000243660	ZNF487	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000247596	TWF2	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000249884	RNF103-CHMP3	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000269335	IKBKKG	GO:0005622	0.003059	intracellular	CC
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0042975	0.003745	peroxisome proliferator activated receptor binding	MF
ENSG00000269335	IKBKKG	GO:0042975	0.003745	peroxisome proliferator activated receptor binding	MF
ENSG00000104321	TRPA1	GO:0009409	0.004662	response to cold	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0009409	0.004662	response to cold	BP
ENSG00000148926	ADM	GO:0009409	0.004662	response to cold	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0097440	0.005051	apical dendrite	CC
ENSG00000120885	CLU	GO:0097440	0.005051	apical dendrite	CC
ENSG00000042493	CAPG	GO:0051016	0.005578	barbed-end actin filament capping	BP
ENSG00000247596	TWF2	GO:0051016	0.005578	barbed-end actin filament capping	BP
ENSG00000101384	JAG1	GO:2000737	0.005928	negative regulation of stem cell differentiation	BP
ENSG00000213626	LBH	GO:2000737	0.005928	negative regulation of stem cell differentiation	BP
ENSG00000123095	BHLHE41	GO:0001191	0.006188	transcriptional repressor activity, RNA polymerase II transcription factor binding	MF
ENSG00000163508	EOMES	GO:0001191	0.006188	transcriptional repressor activity, RNA polymerase II transcription factor binding	MF
ENSG00000050030	NEXMIF	GO:0007275	0.006232	multicellular organism development	BP
ENSG00000066248	NGEF	GO:0007275	0.006232	multicellular organism development	BP
ENSG00000099953	MMP11	GO:0007275	0.006232	multicellular organism development	BP
ENSG00000101384	JAG1	GO:0007275	0.006232	multicellular organism development	BP
ENSG00000109163	GNRHR	GO:0007275	0.006232	multicellular organism development	BP
ENSG00000119630	PGF	GO:0007275	0.006232	multicellular organism development	BP
ENSG00000134627	PIWIL4	GO:0007275	0.006232	multicellular organism development	BP
ENSG00000148704	VAX1	GO:0007275	0.006232	multicellular organism development	BP
ENSG00000163508	EOMES	GO:0007275	0.006232	multicellular organism development	BP
ENSG00000167034	NKX3-1	GO:0007275	0.006232	multicellular organism development	BP
ENSG00000170370	EMX2	GO:0007275	0.006232	multicellular organism development	BP
ENSG00000171617	ENC1	GO:0007275	0.006232	multicellular organism development	BP
ENSG00000177426	TGIF1	GO:0007275	0.006232	multicellular organism development	BP
ENSG00000180340	FZD2	GO:0007275	0.006232	multicellular organism development	BP
ENSG00000180875	GREM2	GO:0007275	0.006232	multicellular organism development	BP
ENSG00000188487	INSC	GO:0007275	0.006232	multicellular organism development	BP
ENSG00000213626	LBH	GO:0007275	0.006232	multicellular organism development	BP
ENSG00000229544	NKX1-2	GO:0007275	0.006232	multicellular organism development	BP
ENSG00000119630	PGF	GO:0031100	0.006619	animal organ regeneration	BP
ENSG00000122025	FLT3	GO:0031100	0.006619	animal organ regeneration	BP
ENSG00000148926	ADM	GO:0031100	0.006619	animal organ regeneration	BP
ENSG00000015285	WAS	GO:0030048	0.006931	actin filament-based movement	BP
ENSG00000109063	MYH3	GO:0030048	0.006931	actin filament-based movement	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0071250	0.007481	cellular response to nitrite	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:1904639	0.007481	cellular response to resveratrol	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:1990844	0.007481	interfibrillar mitochondrion	CC
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:1904635	0.007481	positive regulation of glomerular visceral epithelial cell apoptotic process	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:1901860	0.007481	positive regulation of mitochondrial DNA metabolic process	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:1901863	0.007481	positive regulation of muscle tissue development	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:2000184	0.007481	positive regulation of progesterone biosynthetic process	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0071873	0.007481	response to norepinephrine	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:1990843	0.007481	subsarcolemmal mitochondrion	CC
ENSG00000180875	GREM2	GO:0060300	0.007705	regulation of cytokine activity	BP
ENSG00000213626	LBH	GO:2000103	0.007969	positive regulation of mammary stem cell proliferation	BP
ENSG00000213626	LBH	GO:1904677	0.007969	positive regulation of somatic stem cell division	BP
ENSG00000174948	GPR149	GO:0060280	0.00797	negative regulation of ovulation	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0008209	0.008287	androgen metabolic process	BP
ENSG00000148926	ADM	GO:0008209	0.008287	androgen metabolic process	BP
ENSG00000074276	CDHR2	GO:0060243	0.008355	negative regulation of cell growth involved in contact inhibition	BP

ENSG00000138315	OIT3	GO:1903118	0.008536	urate homeostasis	BP
ENSG00000101384	JAG1	GO:0061444	0.008579	endocardial cushion cell development	BP
ENSG00000120738	EGR1	GO:0035914	0.008669	skeletal muscle cell differentiation	BP
ENSG00000148704	VAX1	GO:0035914	0.008669	skeletal muscle cell differentiation	BP
ENSG00000163508	EOMES	GO:0035914	0.008669	skeletal muscle cell differentiation	BP
ENSG00000136160	EDNRB	GO:0035645	0.008761	enteric smooth muscle cell differentiation	BP
ENSG00000136160	EDNRB	GO:0031620	0.008761	regulation of fever generation	BP
ENSG00000269335	IKBKG	GO:1990450	0.008767	linear polyubiquitin binding	MF
ENSG0000025434	NR1H3	GO:0090341	0.008815	negative regulation of secretion of lysosomal enzymes	BP
ENSG00000120885	CLU	GO:1905892	0.008855	negative regulation of cellular response to thapsigargin	BP
ENSG00000120885	CLU	GO:1905895	0.008855	negative regulation of cellular response to tunicamycin	BP
ENSG00000120885	CLU	GO:1903573	0.008855	negative regulation of response to endoplasmic reticulum stress	BP
ENSG00000120885	CLU	GO:1902998	0.008855	positive regulation of neurofibrillary tangle assembly	BP
ENSG00000120885	CLU	GO:1902847	0.008855	regulation of neuronal signal transduction	BP
ENSG00000015285	WAS	GO:0002625	0.008904	regulation of T cell antigen processing and presentation	BP
ENSG00000167964	RAB26	GO:0035272	0.008926	exocrine system development	BP
ENSG00000134627	PIWIL4	GO:0010529	0.008969	negative regulation of transposition	BP
ENSG00000182459	TEX19	GO:0010529	0.008969	negative regulation of transposition	BP
ENSG00000087085	ACHE	GO:0006581	0.009022	acetylcholine catabolic process	BP
ENSG00000087085	ACHE	GO:0032223	0.009022	negative regulation of synaptic transmission, cholinergic	BP
ENSG00000087085	ACHE	GO:0045212	0.009022	neurotransmitter receptor biosynthetic process	BP
ENSG00000163508	EOMES	GO:0002302	0.009025	CD8-positive, alpha-beta T cell differentiation involved in immune response	BP
ENSG00000172936	MYD88	GO:0009682	0.009058	induced systemic resistance	BP
ENSG00000172936	MYD88	GO:2000338	0.009058	regulation of chemokine (C-X-C motif) ligand 1 production	BP
ENSG00000172936	MYD88	GO:2000341	0.009058	regulation of chemokine (C-X-C motif) ligand 2 production	BP
ENSG00000172936	MYD88	GO:0002238	0.009058	response to molecule of fungal origin	BP
ENSG00000172936	MYD88	GO:0070976	0.009058	TIR domain binding	MF
ENSG00000172936	MYD88	GO:0005121	0.009058	Toll binding	MF
ENSG00000167034	NKX3-1	GO:0035907	0.009062	dorsal aorta development	BP
ENSG00000167034	NKX3-1	GO:0097162	0.009062	MADS box domain binding	MF
ENSG00000167034	NKX3-1	GO:2000836	0.009062	positive regulation of androgen secretion	BP
ENSG00000120738	EGR1	GO:0098759	0.009068	cellular response to interleukin-8	BP
ENSG00000120738	EGR1	GO:0072110	0.009068	glomerular mesangial cell proliferation	BP
ENSG00000120738	EGR1	GO:0072303	0.009068	positive regulation of glomerular metanephric mesangial cell proliferation	BP
ENSG00000120738	EGR1	GO:0033233	0.009068	regulation of protein sumoylation	BP
ENSG00000182544	MFSD5	GO:0015098	0.009078	molybdate ion transmembrane transporter activity	MF
ENSG00000182544	MFSD5	GO:0015689	0.009078	molybdate ion transport	BP
ENSG00000148926	ADM	GO:0031700	0.009085	adrenomedullin receptor binding	MF
ENSG00000074276	CDHR2	GO:0031526	0.009343	brush border membrane	CC
ENSG00000091137	SLC26A4	GO:0031526	0.009343	brush border membrane	CC
ENSG00000107611	CUBN	GO:0031526	0.009343	brush border membrane	CC
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0035066	0.009855	positive regulation of histone acetylation	BP
ENSG00000186462	NAPIL2	GO:0035066	0.009855	positive regulation of histone acetylation	BP
ENSG00000148926	ADM	GO:0010460	0.010314	positive regulation of heart rate	BP
ENSG00000166257	SCN3B	GO:0010460	0.010314	positive regulation of heart rate	BP
ENSG00000006747	SCIN	GO:0051693	0.010362	actin filament capping	BP
ENSG00000042493	CAPG	GO:0051693	0.010362	actin filament capping	BP
ENSG00000107611	CUBN	GO:0001894	0.010715	tissue homeostasis	BP
ENSG00000204248	COL11A2	GO:0001894	0.010715	tissue homeostasis	BP
ENSG00000091137	SLC26A4	GO:0006885	0.010976	regulation of pH	BP
ENSG00000136160	EDNRB	GO:0006885	0.010976	regulation of pH	BP
ENSG00000104321	TRPA1	GO:0019233	0.01115	sensory perception of pain	BP
ENSG00000136160	EDNRB	GO:0019233	0.01115	sensory perception of pain	BP
ENSG00000138315	OIT4	GO:1903118	0.010402	urate homeostasis	BP
ENSG00000138315	OIT4	GO:1903118	0.010442	urate homeostasis	BP
ENSG00000101384	JAG2	GO:0061444	0.010482	endocardial cushion cell development	BP



ENSG0000006747	SCIN	GO:0005903	0.013076	brush border	CC
ENSG00000074276	CDHR2	GO:0005903	0.013076	brush border	CC
ENSG00000107611	CUBN	GO:0005903	0.013076	brush border	CC
ENSG00000129562	DAD1	GO:0001824	0.013154	blastocyst development	BP
ENSG00000163508	EOMES	GO:0001824	0.013154	blastocyst development	BP
ENSG00000117228	GBP1	GO:0019955	0.013944	cytokine binding	MF
ENSG00000121966	CXCR4	GO:0019955	0.013944	cytokine binding	MF
ENSG00000181218	HIST3H2A	GO:0000786	0.013947	nucleosome	CC
ENSG00000188375	H3F3C	GO:0000786	0.013947	nucleosome	CC
ENSG00000233822	HIST1H2BN	GO:0000786	0.013947	nucleosome	CC
ENSG00000274290	HIST1H2BE	GO:0000786	0.013947	nucleosome	CC
ENSG00000213626	LBH	GO:1904674	0.014466	positive regulation of somatic stem cell population maintenance	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0001666	0.014665	response to hypoxia	BP
ENSG00000119630	PGF	GO:0001666	0.014665	response to hypoxia	BP
ENSG00000120738	EGR1	GO:0001666	0.014665	response to hypoxia	BP
ENSG00000121966	CXCR4	GO:0001666	0.014665	response to hypoxia	BP
ENSG00000148926	ADM	GO:0001666	0.014665	response to hypoxia	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:1901558	0.014923	response to metformin	BP
ENSG00000120885	CLU	GO:0009615	0.015182	response to virus	BP
ENSG00000121966	CXCR4	GO:0009615	0.015182	response to virus	BP
ENSG00000172936	MYD88	GO:0009615	0.015182	response to virus	BP
ENSG00000269335	IKBKG	GO:0009615	0.015182	response to virus	BP
ENSG00000204248	COL11A2	GO:0005592	0.015427	collagen type XI trimer	CC
ENSG00000121966	CXCR4	GO:0043217	0.015768	myelin maintenance	BP
ENSG00000099953	MMP11	GO:0030574	0.015774	collagen catabolic process	BP
ENSG00000187045	TMPRSS6	GO:0030574	0.015774	collagen catabolic process	BP
ENSG00000204248	COL11A2	GO:0030574	0.015774	collagen catabolic process	BP
ENSG0000006757	PNPLA4	GO:0050253	0.01579	retinyl-palmitate esterase activity	MF
ENSG00000269335	IKBKG	GO:0051650	0.016044	establishment of vesicle localization	BP
ENSG00000076662	ICAM3	GO:0006909	0.016182	phagocytosis	BP
ENSG00000102890	ELMO3	GO:0006909	0.016182	phagocytosis	BP
ENSG00000180138	CSNK1A1L	GO:0006909	0.016182	phagocytosis	BP
ENSG00000058085	LAMC2	GO:0005607	0.016312	laminin-2 complex	CC
ENSG00000101384	JAG1	GO:0043010	0.016384	camera-type eye development	BP
ENSG00000148704	VAX1	GO:0043010	0.016384	camera-type eye development	BP
ENSG00000205084	TMEM231	GO:0043010	0.016384	camera-type eye development	BP
ENSG00000180875	GREM2	GO:0038098	0.016495	sequestering of BMP from receptor via BMP binding	BP
ENSG00000136160	EDNRB	GO:0004962	0.016926	endothelin receptor activity	MF
ENSG00000136160	EDNRB	GO:0086100	0.016926	endothelin receptor signaling pathway	BP
ENSG00000136160	EDNRB	GO:0007497	0.017045	posterior midgut development	BP
ENSG00000087085	ACHE	GO:0001507	0.017107	acetylcholine catabolic process in synaptic cleft	BP
ENSG00000186462	NAPIL2	GO:0006334	0.017139	nucleosome assembly	BP
ENSG00000188375	H3F3C	GO:0006334	0.017139	nucleosome assembly	BP
ENSG00000233822	HIST1H2BN	GO:0006334	0.017139	nucleosome assembly	BP
ENSG00000274290	HIST1H2BE	GO:0006334	0.017139	nucleosome assembly	BP
ENSG00000105737	GRIK5	GO:0051649	0.017155	establishment of localization in cell	BP
ENSG00000105737	GRIK5	GO:0032983	0.01717	kainate selective glutamate receptor complex	CC
ENSG00000087085	ACHE	GO:0003990	0.017179	acetylcholinesterase activity	MF
ENSG00000157060	SHCBP1L	GO:2001252	0.017241	positive regulation of chromosome organization	BP
ENSG00000153531	ADPRHL1	GO:0003875	0.017242	ADP-ribosylarginine hydrolase activity	MF
ENSG00000104321	TRPA1	GO:0097604	0.01725	temperature-gated cation channel activity	MF
ENSG00000074276	CDHR2	GO:0090675	0.017264	intermicrovillar adhesion	BP
ENSG00000101384	JAG1	GO:0072070	0.017264	loop of Henle development	BP
ENSG00000120885	CLU	GO:0061518	0.017278	microglial cell proliferation	BP
ENSG00000167964	RAB26	GO:0019002	0.017297	GMP binding	MF
ENSG00000025434	NR1H3	GO:0032810	0.017464	sterol response element binding	MF
ENSG00000109163	GNRHR	GO:0004968	0.017476	gonadotropin-releasing hormone receptor activity	MF
ENSG00000198774	RASSF9	GO:0012510	0.017526	trans-Golgi network transport vesicle membrane	CC
ENSG00000135577	NMBR	GO:0004946	0.017627	bombesin receptor activity	MF
ENSG00000135577	NMBR	GO:0031989	0.017627	bombesin receptor signaling pathway	BP
ENSG00000117834	SLC5A9	GO:0005362	0.017666	low-affinity glucose:sodium symporter activity	MF
ENSG00000168806	LCMT2	GO:0031591	0.017682	wybutosine biosynthetic process	BP

ENSG00000120738	EGR1	GO:2000182	0.017694	regulation of progesterone biosynthetic process	BP
ENSG00000163508	EOMES	GO:0060809	0.017699	mesodermal to mesenchymal transition involved in gastrulation	BP
ENSG00000136160	EDNRB	GO:0014043	0.017717	negative regulation of neuron maturation	BP
ENSG00000120885	CLU	GO:0042583	0.017719	chromaffin granule	CC
ENSG00000180340	FZD2	GO:0030825	0.017767	positive regulation of cGMP metabolic process	BP
ENSG00000120738	EGR1	GO:0071506	0.017794	cellular response to mycophenolic acid	BP
ENSG00000128694	OSGEPL1	GO:0061711	0.017795	N(6)-L-threonylcarbamoyladenine synthase	MF
ENSG00000120885	CLU	GO:0061741	0.017815	chaperone-mediated protein transport involved in chaperone-mediated autophagy	BP
ENSG00000172936	MYD88	GO:1902622	0.017816	regulation of neutrophil migration	BP
ENSG00000120885	CLU	GO:1900221	0.017846	regulation of amyloid-beta clearance	BP
ENSG00000120738	EGR1	GO:0050725	0.018009	positive regulation of interleukin-1 beta biosynthetic process	BP
ENSG00000167996	FTH1	GO:0008043	0.018027	intracellular ferritin complex	CC
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0005719	0.018305	nuclear euchromatin	CC
ENSG00000188375	H3F3C	GO:0005719	0.018305	nuclear euchromatin	CC
ENSG00000240065	PSMB9	GO:0004298	0.019636	threonine-type endopeptidase activity	MF
ENSG00000256646	AC010132.3	GO:0004298	0.019636	threonine-type endopeptidase activity	MF
ENSG00000240065	PSMB9	GO:0005839	0.019848	proteasome core complex	CC
ENSG00000256646	AC010132.3	GO:0005839	0.019848	proteasome core complex	CC
ENSG00000174948	GPR149	GO:0001547	0.020637	antral ovarian follicle growth	BP
ENSG00000158164	TMSB15A	GO:0003785	0.022085	actin monomer binding	MF
ENSG00000247596	TWF2	GO:0003785	0.022085	actin monomer binding	MF
ENSG00000100583	SAMD15	GO:0000027	0.022109	ribosomal large subunit assembly	BP
ENSG00000140986	RPL3L	GO:0000027	0.022109	ribosomal large subunit assembly	BP
ENSG00000006757	PNPLA4	GO:0055088	0.022465	lipid homeostasis	BP
ENSG00000025434	NR1H3	GO:0055088	0.022465	lipid homeostasis	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0071871	0.022505	response to epinephrine	BP
ENSG00000111058	ACSS3	GO:0003987	0.022635	acetate-CoA ligase activity	MF
ENSG00000135917	SLC19A3	GO:0015888	0.02272	thiamine transport	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0043014	0.022909	alpha-tubulin binding	MF
ENSG00000188042	ARL4C	GO:0043014	0.022909	alpha-tubulin binding	MF
ENSG00000050030	NEXMIF	GO:0016035	0.023	zeta DNA polymerase complex	CC
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0043201	0.023227	response to leucine	BP
ENSG00000163864	NMNAT3	GO:0034628	0.023366	'de novo' NAD biosynthetic process from aspartate	BP
ENSG00000163864	NMNAT3	GO:0000309	0.023366	nicotinamide-nucleotide adenylyltransferase activity	MF
ENSG00000087085	ACHE	GO:0009611	0.02345	response to wounding	BP
ENSG00000148926	ADM	GO:0009611	0.02345	response to wounding	BP
ENSG00000163864	NMNAT3	GO:0009611	0.02345	response to wounding	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0090258	0.023755	negative regulation of mitochondrial fission	BP
ENSG00000130234	ACE2	GO:0002005	0.024189	angiotensin catabolic process in blood	BP
ENSG00000104321	TRPA1	GO:0050955	0.024484	thermoception	BP
ENSG00000121966	CXCR4	GO:0071345	0.024514	cellular response to cytokine stimulus	BP
ENSG00000122025	FLT3	GO:0071345	0.024514	cellular response to cytokine stimulus	BP
ENSG00000091137	SLC26A4	GO:0015111	0.024688	iodide transmembrane transporter activity	MF
ENSG00000130234	ACE2	GO:0003051	0.024704	angiotensin-mediated drinking behavior	BP
ENSG00000105737	GRIK5	GO:0031630	0.024731	regulation of synaptic vesicle fusion to presynaptic active zone membrane	BP
ENSG00000058085	LAMC2	GO:0030198	0.024941	extracellular matrix organization	BP
ENSG00000076662	ICAM3	GO:0030198	0.024941	extracellular matrix organization	BP
ENSG00000099953	MMP11	GO:0030198	0.024941	extracellular matrix organization	BP
ENSG00000179403	VWA1	GO:0030198	0.024941	extracellular matrix organization	BP
ENSG00000187045	TMPRSS6	GO:0030198	0.024941	extracellular matrix organization	BP
ENSG00000167034	NKX3-1	GO:0004882	0.025021	androgen receptor activity	MF
ENSG00000100867	DHRS2	GO:0008207	0.025121	C21-steroid hormone metabolic process	BP
ENSG00000163508	EOMES	GO:0010002	0.025208	cardioblast differentiation	BP
ENSG00000087085	ACHE	GO:0004104	0.025228	cholinesterase activity	MF
ENSG00000130234	ACE2	GO:0015827	0.025282	tryptophan transport	BP
ENSG00000167034	NKX3-1	GO:0071899	0.025349	negative regulation of estrogen receptor binding	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:1904640	0.02537	response to methionine	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:1901857	0.025379	positive regulation of cellular respiration	BP
ENSG00000058085	LAMC2	GO:0048731	0.025387	system development	BP

ENSG00000153531	ADPRHL1	GO:0051725	0.025409	protein de-ADP-ribosylation	BP
ENSG00000120738	EGR1	GO:0046886	0.02542	positive regulation of hormone biosynthetic process	BP
ENSG00000101384	JAG1	GO:0072017	0.025432	distal tubule development	BP
ENSG00000120738	EGR1	GO:0044729	0.025563	hemi-methylated DNA-binding	MF
ENSG00000104321	TRPA1	GO:0050968	0.025641	detection of chemical stimulus involved in sensory perception of pain	BP
ENSG00000041353	RAB27B	GO:0017157	0.025715	regulation of exocytosis	BP
ENSG00000167964	RAB26	GO:0017157	0.025715	regulation of exocytosis	BP
ENSG00000130234	ACE2	GO:1903598	0.025819	positive regulation of gap junction assembly	BP
ENSG00000174948	GPR149	GO:0001546	0.025921	preantral ovarian follicle growth	BP
ENSG00000148926	ADM	GO:0046879	0.025989	hormone secretion	BP
ENSG00000170370	EMX2	GO:0021885	0.026021	forebrain cell migration	BP
ENSG00000058085	LAMC2	GO:0070831	0.026064	basement membrane assembly	BP
ENSG00000135917	SLC19A3	GO:0015234	0.026077	thiamine transmembrane transporter activity	MF
ENSG00000240065	PSMB9	GO:2000116	0.026114	regulation of cysteine-type endopeptidase activity	BP
ENSG00000120885	CLU	GO:0061740	0.026172	protein targeting to lysosome involved in chaperone-mediated autophagy	BP
ENSG00000101384	JAG1	GO:0061073	0.02633	ciliary body morphogenesis	BP
ENSG00000120885	CLU	GO:0051788	0.026406	response to misfolded protein	BP
ENSG00000130234	ACE2	GO:0032800	0.026415	receptor biosynthetic process	BP
ENSG00000148926	ADM	GO:0035809	0.026461	regulation of urine volume	BP
ENSG00000128694	OSGEPL1	GO:0002949	0.026682	tRNA threonylcarbamoyladenosine modification	BP
ENSG00000058085	LAMC2	GO:0022617	0.026861	extracellular matrix disassembly	BP
ENSG00000099953	MMP11	GO:0022617	0.026861	extracellular matrix disassembly	BP
ENSG00000187045	TMPRSS6	GO:0022617	0.026861	extracellular matrix disassembly	BP
ENSG00000172936	MYD88	GO:0045351	0.026919	type I interferon biosynthetic process	BP
ENSG00000110060	PUS3	GO:0006400	0.02702	tRNA modification	BP
ENSG00000168806	LCMT2	GO:0006400	0.02702	tRNA modification	BP
ENSG00000165782	PIP4P1	GO:0034597	0.027982	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 4-phosphatase activity	MF
ENSG00000050030	NEXMIF	GO:0007399	0.027999	nervous system development	BP
ENSG00000066248	NGEF	GO:0007399	0.027999	nervous system development	BP
ENSG00000087085	ACHE	GO:0007399	0.027999	nervous system development	BP
ENSG00000101384	JAG1	GO:0007399	0.027999	nervous system development	BP
ENSG00000136160	EDNRB	GO:0007399	0.027999	nervous system development	BP
ENSG00000148704	VAX1	GO:0007399	0.027999	nervous system development	BP
ENSG00000166257	SCN3B	GO:0007399	0.027999	nervous system development	BP
ENSG00000171617	ENC1	GO:0007399	0.027999	nervous system development	BP
ENSG00000188487	INSC	GO:0007399	0.027999	nervous system development	BP
ENSG00000120738	EGR1	GO:1901216	0.028295	positive regulation of neuron death	BP
ENSG00000120885	CLU	GO:1901216	0.028295	positive regulation of neuron death	BP
ENSG00000074276	CDHR2	GO:0044331	0.028567	cell-cell adhesion mediated by cadherin	BP
ENSG00000008128	CDK11A	GO:0006468	0.029084	protein phosphorylation	BP
ENSG00000060140	STYK1	GO:0006468	0.029084	protein phosphorylation	BP
ENSG00000122025	FLT3	GO:0006468	0.029084	protein phosphorylation	BP
ENSG00000164776	PHKG1	GO:0006468	0.029084	protein phosphorylation	BP
ENSG00000174516	PELI3	GO:0006468	0.029084	protein phosphorylation	BP
ENSG00000177453	NIM1K	GO:0006468	0.029084	protein phosphorylation	BP
ENSG00000180138	CSNK1A1L	GO:0006468	0.029084	protein phosphorylation	BP
ENSG00000181409	AATK	GO:0006468	0.029084	protein phosphorylation	BP
ENSG00000183496	MEX3B	GO:0006468	0.029084	protein phosphorylation	BP
ENSG00000230626	AC011005.1	GO:0006468	0.029084	protein phosphorylation	BP
ENSG00000058085	LAMC2	GO:0005604	0.029228	basement membrane	CC
ENSG00000164620	RELL2	GO:0005604	0.029228	basement membrane	CC
ENSG00000179403	VWA1	GO:0005604	0.029228	basement membrane	CC
ENSG00000105737	GRIK5	GO:0015277	0.029253	kainate selective glutamate receptor activity	MF
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0042594	0.02969	response to starvation	BP
ENSG00000148926	ADM	GO:0042594	0.02969	response to starvation	BP
ENSG00000025434	NR1H3	GO:0043565	0.030282	sequence-specific DNA binding	MF
ENSG00000043039	BARX2	GO:0043565	0.030282	sequence-specific DNA binding	MF
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0043565	0.030282	sequence-specific DNA binding	MF
ENSG00000120738	EGR1	GO:0043565	0.030282	sequence-specific DNA binding	MF
ENSG00000148704	VAX1	GO:0043565	0.030282	sequence-specific DNA binding	MF
ENSG00000153767	GTF2E1	GO:0043565	0.030282	sequence-specific DNA binding	MF

ENSG00000163508	EOMES	GO:0043565	0.030282	sequence-specific DNA binding	MF
ENSG00000167034	NKX3-1	GO:0043565	0.030282	sequence-specific DNA binding	MF
ENSG00000170370	EMX2	GO:0043565	0.030282	sequence-specific DNA binding	MF
ENSG00000229544	NKX1-2	GO:0043565	0.030282	sequence-specific DNA binding	MF
ENSG00000163864	NMNAT3	GO:0004515	0.030473	nicotinate-nucleotide adenyltransferase activity	MF
ENSG0000015285	WAS	GO:0032488	0.030665	Cdc42 protein signal transduction	BP
ENSG00000091137	SLC26A4	GO:0015705	0.03106	iodide transport	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0010822	0.031579	positive regulation of mitochondrion organization	BP
ENSG0000074276	CDHR2	GO:0044214	0.031671	spanning component of plasma membrane	CC
ENSG00000120885	CLU	GO:1905908	0.031918	positive regulation of amyloid fibril formation	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:1990841	0.032309	promoter-specific chromatin binding	MF
ENSG00000120738	EGR1	GO:1990841	0.032309	promoter-specific chromatin binding	MF
ENSG00000171617	ENC1	GO:0010499	0.032565	proteasomal ubiquitin-independent protein catabolic process	BP
ENSG0000025434	NR1H3	GO:2000189	0.032659	positive regulation of cholesterol homeostasis	BP
ENSG00000122025	FLT3	GO:0002328	0.032687	pro-B cell differentiation	BP
ENSG00000107175	CREB3	GO:0006990	0.032769	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter involved in unfolded protein response	BP
ENSG0000006747	SCIN	GO:0051047	0.03286	positive regulation of secretion	BP
ENSG00000172936	MYD88	GO:0032675	0.032876	regulation of interleukin-6 production	BP
ENSG0000025434	NR1H3	GO:0032369	0.03304	negative regulation of lipid transport	BP
ENSG00000120885	CLU	GO:0032286	0.033109	central nervous system myelin maintenance	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0014878	0.033319	response to electrical stimulus involved in regulation of muscle adaptation	BP
ENSG0000025434	NR1H3	GO:0032376	0.033388	positive regulation of cholesterol transport	BP
ENSG00000119630	PGF	GO:0005172	0.033399	vascular endothelial growth factor receptor binding	MF
ENSG00000148926	ADM	GO:0045906	0.033655	negative regulation of vasoconstriction	BP
ENSG00000167034	NKX3-1	GO:0007431	0.03379	salivary gland development	BP
ENSG00000119630	PGF	GO:0060688	0.033917	regulation of morphogenesis of a branching structure	BP
ENSG00000109063	MYH3	GO:0017018	0.034014	myosin phosphatase activity	MF
ENSG0000025434	NR1H3	GO:0048550	0.034181	negative regulation of pinocytosis	BP
ENSG00000101384	JAG1	GO:0061309	0.034198	cardiac neural crest cell development involved in outflow tract morphogenesis	BP
ENSG00000117228	GBP1	GO:1900041	0.034315	negative regulation of interleukin-2 secretion	BP
ENSG00000135917	SLC19A3	GO:0071934	0.034404	thiamine transmembrane transport	BP
ENSG00000186462	NAPIL2	GO:0071442	0.03446	positive regulation of histone H3-K14 acetylation	BP
ENSG00000120885	CLU	GO:1905907	0.034518	negative regulation of amyloid fibril formation	BP
ENSG0000025434	NR1H3	GO:0055092	0.03453	sterol homeostasis	BP
ENSG00000251503	CENPS-COR	GO:0071821	0.034554	FANCM-MHF complex	CC
ENSG00000110060	PUS3	GO:1990481	0.034833	mRNA pseudouridine synthesis	BP
ENSG00000121966	CXCR4	GO:0030260	0.03497	entry into host cell	BP
ENSG00000136160	EDNRB	GO:0014826	0.035095	vein smooth muscle contraction	BP
ENSG00000136160	EDNRB	GO:0060406	0.035262	positive regulation of penile erection	BP
ENSG00000100867	DHRS2	GO:0004090	0.035339	carbonyl reductase (NADPH) activity	MF
ENSG00000148926	ADM	GO:0006701	0.035504	progesterone biosynthetic process	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0002931	0.03573	response to ischemia	BP
ENSG00000120738	EGR1	GO:0002931	0.03573	response to ischemia	BP
ENSG00000167034	NKX3-1	GO:0030284	0.036943	estrogen receptor activity	MF
ENSG0000041353	RAB27B	GO:0003924	0.037052	GTPase activity	MF
ENSG00000117228	GBP1	GO:0003924	0.037052	GTPase activity	MF
ENSG00000167964	RAB26	GO:0003924	0.037052	GTPase activity	MF
ENSG00000172602	RND1	GO:0003924	0.037052	GTPase activity	MF
ENSG00000175906	ARL4D	GO:0003924	0.037052	GTPase activity	MF
ENSG00000188042	ARL4C	GO:0003924	0.037052	GTPase activity	MF
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:1904637	0.038022	cellular response to ionomycin	BP
ENSG0000025434	NR1H3	GO:0090188	0.038184	negative regulation of pancreatic juice secretion	BP
ENSG00000148704	VAX1	GO:0007406	0.038343	negative regulation of neuroblast proliferation	BP
ENSG00000164776	PHKG1	GO:0004689	0.039541	phosphorylase kinase activity	MF
ENSG00000164776	PHKG1	GO:0005964	0.039541	phosphorylase kinase complex	CC
ENSG00000167964	RAB26	GO:0009306	0.039991	protein secretion	BP
ENSG00000175906	ARL4D	GO:0009306	0.039991	protein secretion	BP
ENSG0000066248	NGEF	GO:0061002	0.040037	negative regulation of dendritic spine morphogenesis	BP

ENSG0000087085	ACHE	GO:0001919	0.040251	regulation of receptor recycling	BP
ENSG00000120738	EGR1	GO:0071504	0.040272	cellular response to heparin	BP
ENSG00000135917	SLC19A3	GO:0042723	0.040404	thiamine-containing compound metabolic process	BP
ENSG00000134627	PIWIL4	GO:0071547	0.040459	piP-body	CC
ENSG00000166173	LARP6	GO:1902416	0.040689	positive regulation of mRNA binding	BP
ENSG00000172936	MYD88	GO:0140052	0.041054	cellular response to oxidised low-density lipoprotein particle stimulus	BP
ENSG00000122025	FLT3	GO:0019221	0.041072	cytokine-mediated signaling pathway	BP
ENSG00000138378	STAT4	GO:0019221	0.041072	cytokine-mediated signaling pathway	BP
ENSG00000172936	MYD88	GO:0019221	0.041072	cytokine-mediated signaling pathway	BP
ENSG00000180875	GREM2	GO:0019221	0.041072	cytokine-mediated signaling pathway	BP
ENSG0000050030	NEXMIF	GO:2000048	0.041108	negative regulation of cell-cell adhesion mediated by cadherin	BP
ENSG00000122025	FLT3	GO:0046651	0.041207	lymphocyte proliferation	BP
ENSG00000123095	BHLHE41	GO:0043426	0.041284	MRF binding	MF
ENSG00000120885	CLU	GO:0097418	0.041548	neurofibrillary tangle	CC
ENSG00000121966	CXCR4	GO:0032027	0.041557	myosin light chain binding	MF
ENSG00000121966	CXCR4	GO:0050920	0.041597	regulation of chemotaxis	BP
ENSG00000120738	EGR1	GO:0010385	0.041669	double-stranded methylated DNA binding	MF
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0009750	0.041761	response to fructose	BP
ENSG00000180340	FZD2	GO:0003150	0.041884	muscular septum morphogenesis	BP
ENSG00000129562	DAD1	GO:0004576	0.041894	oligosaccharyl transferase activity	MF
ENSG00000167034	NKX3-1	GO:0060664	0.042115	epithelial cell proliferation involved in salivary gland morphogenesis	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0071332	0.042149	cellular response to fructose stimulus	BP
ENSG00000168806	LCMT2	GO:0008175	0.042433	tRNA methyltransferase activity	MF
ENSG00000240065	PSMB9	GO:1990111	0.042444	spermatoproteasome complex	CC
ENSG00000180875	GREM2	GO:0048263	0.042442	determination of dorsal identity	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0030331	0.042443	estrogen receptor binding	MF
ENSG00000167034	NKX3-1	GO:0030331	0.042443	estrogen receptor binding	MF
ENSG00000166257	SCN3B	GO:0086006	0.042597	voltage-gated sodium channel activity involved in cardiac muscle cell action potential	MF
ENSG00000123095	BHLHE41	GO:0001102	0.042709	RNA polymerase II activating transcription factor binding	MF
ENSG00000163508	EOMES	GO:0001102	0.042709	RNA polymerase II activating transcription factor binding	MF
ENSG00000204248	COL11A2	GO:0060023	0.042807	soft palate development	BP
ENSG00000167034	NKX3-1	GO:0060442	0.042829	branching involved in prostate gland morphogenesis	BP
ENSG00000130234	ACE2	GO:0046813	0.04285	receptor-mediated virion attachment to host cell	BP
ENSG0000087085	ACHE	GO:0031623	0.043301	receptor internalization	BP
ENSG00000148926	ADM	GO:0031623	0.043301	receptor internalization	BP
ENSG00000187045	TMPRSS6	GO:0097264	0.043339	self proteolysis	BP
ENSG00000163508	EOMES	GO:0001714	0.043472	endodermal cell fate specification	BP
ENSG00000120885	CLU	GO:0017038	0.043633	protein import	BP
ENSG00000101384	JAG1	GO:0045639	0.043798	positive regulation of myeloid cell differentiation	BP
ENSG00000110060	PUS3	GO:0008033	0.043983	tRNA processing	BP
ENSG00000128694	OSGEPL1	GO:0008033	0.043983	tRNA processing	BP
ENSG00000168806	LCMT2	GO:0008033	0.043983	tRNA processing	BP
ENSG00000015285	WAS	GO:0007015	0.044062	actin filament organization	BP
ENSG00000158164	TMSB15A	GO:0007015	0.044062	actin filament organization	BP
ENSG00000172602	RND1	GO:0007015	0.044062	actin filament organization	BP
ENSG00000172936	MYD88	GO:0032747	0.044128	positive regulation of interleukin-23 production	BP
ENSG00000172936	MYD88	GO:0032680	0.044179	regulation of tumor necrosis factor production	BP
ENSG00000167996	FTH1	GO:0006880	0.044329	intracellular sequestering of iron ion	BP
ENSG00000099953	MMP11	GO:0030199	0.044697	collagen fibril organization	BP
ENSG00000204248	COL11A2	GO:0030199	0.044697	collagen fibril organization	BP
ENSG00000041353	RAB27B	GO:0031088	0.044805	platelet dense granule membrane	CC
ENSG00000109063	MYH3	GO:0030016	0.045136	myofibril	CC
ENSG00000247596	TWF2	GO:0030016	0.045136	myofibril	CC
ENSG00000166257	SCN3B	GO:0086015	0.04579	SA node cell action potential	BP
ENSG00000130234	ACE2	GO:0004175	0.045839	endopeptidase activity	MF
ENSG00000240065	PSMB9	GO:0004175	0.045839	endopeptidase activity	MF
ENSG00000256646	AC010132.3	GO:0004175	0.045839	endopeptidase activity	MF

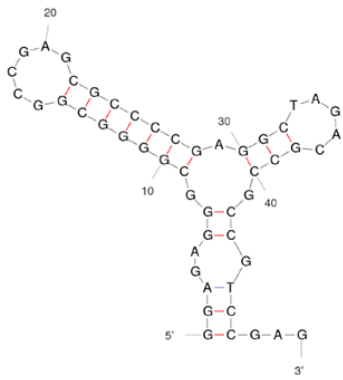
ENSG00000153767	GTF2E1	GO:0097550	0.046176	transcriptional preinitiation complex	CC
ENSG00000109163	GNRHR	GO:0016500	0.046176	protein-hormone receptor activity	MF
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0031325	0.046213	positive regulation of cellular metabolic process	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0051552	0.046369	flavone metabolic process	BP
ENSG0000006747	SCIN	GO:0051127	0.046749	positive regulation of actin nucleation	BP
ENSG0000043039	BARX2	GO:0000977	0.046973	RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding	MF
ENSG00000107175	CREB3	GO:0000977	0.046973	RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding	MF
ENSG00000120738	EGR1	GO:0000977	0.046973	RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding	MF
ENSG00000163508	EOMES	GO:0000977	0.046973	RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding	MF
ENSG00000185669	SNAI3	GO:0000977	0.046973	RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding	MF
ENSG00000025434	NR1H3	GO:0010887	0.047102	negative regulation of cholesterol storage	BP
ENSG00000122025	FLT3	GO:0002318	0.047687	myeloid progenitor cell differentiation	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0046321	0.047908	positive regulation of fatty acid oxidation	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:1990845	0.048094	adaptive thermogenesis	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:2000507	0.048539	positive regulation of energy homeostasis	BP
ENSG00000025434	NR1H3	GO:0060336	0.048539	negative regulation of interferon-gamma-mediated signaling pathway	BP
ENSG00000172936	MYD88	GO:0035325	0.048775	Toll-like receptor binding	MF
ENSG00000101384	JAG1	GO:0061156	0.048822	pulmonary artery morphogenesis	BP
ENSG00000104321	TRPA1	GO:0042493	0.048904	response to drug	BP
ENSG00000109819	PPARGC1A	GO:0042493	0.048904	response to drug	BP
ENSG00000119630	PGF	GO:0042493	0.048904	response to drug	BP
ENSG00000129562	DAD1	GO:0042493	0.048904	response to drug	BP
ENSG00000170370	EMX2	GO:0042493	0.048904	response to drug	BP
ENSG00000177426	TGIF1	GO:0042493	0.048904	response to drug	BP
ENSG00000101384	JAG1	GO:0045602	0.049264	negative regulation of endothelial cell differentiation	BP
ENSG00000136160	EDNRB	GO:0042045	0.049268	epithelial fluid transport	BP
ENSG00000167996	FTH1	GO:0004322	0.049402	ferroxidase activity	MF
ENSG00000130234	ACE2	GO:0003081	0.04941	regulation of systemic arterial blood pressure by renin-angiotensin	BP
ENSG0000006747	SCIN	GO:0051014	0.049425	actin filament severing	BP
ENSG00000122025	FLT3	GO:0001776	0.04948	leukocyte homeostasis	BP
ENSG00000204248	COL11A2	GO:0030020	0.049614	extracellular matrix structural constituent conferring tensile strength	MF
ENSG00000180875	GREM2	GO:0010172	0.049664	embryonic body morphogenesis	BP
ENSG00000117834	SLC5A9	GO:0005412	0.049804	glucose:sodium symporter activity	MF

Legenda GOfterm:

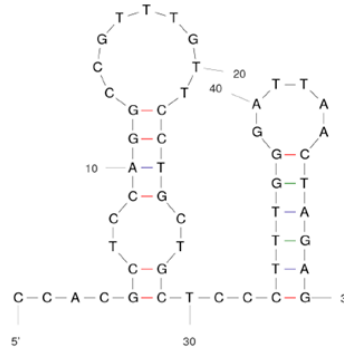
- CC: componente celular, do inglês *Cellular Component*
- BP: processo biológico, do inglês *Biological Process*
- MF: função molecular, do inglês *Molecular Function*

## ANEXO II

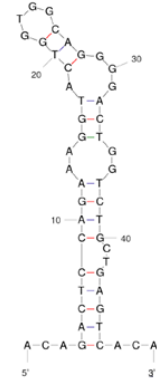
Exemplos de estruturas geradas pelo *mFold* utilizando os primeiros 50 nucleotídeos das isoformas do gene *IKBK*G.



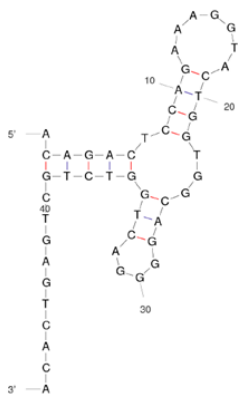
$dG = -25.2$  ENSG00000269335-ENST00000413620



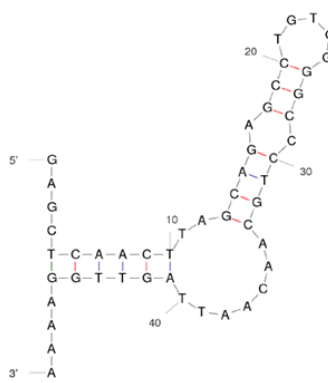
$dG = -10.5$  ENSG00000269335-ENST00000422680



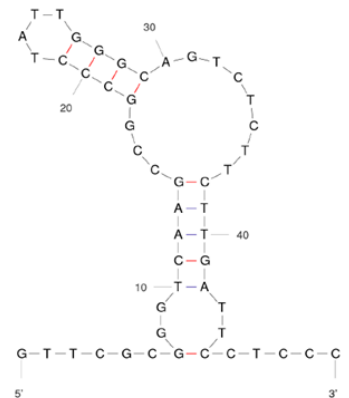
$dG = -15$  ENSG00000269335-ENST00000440286



$dG = -14$  ENSG00000269335-ENST00000440286



$dG = -14.6$  ENSG00000269335-ENST00000445622



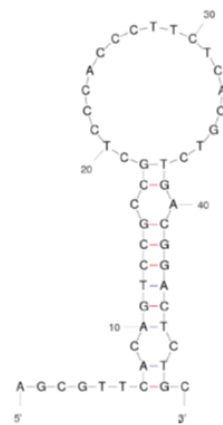
$dG = -14.1$  ENSG00000269335-ENST00000594239



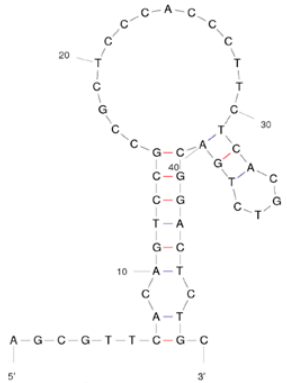
$dG = -20.7$  ENSG00000269335-ENST00000611071



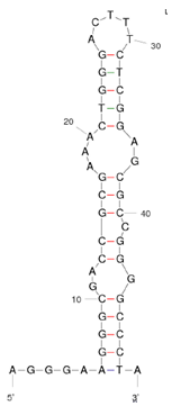
$dG = -21.9$  ENSG00000269335-ENST00000611176



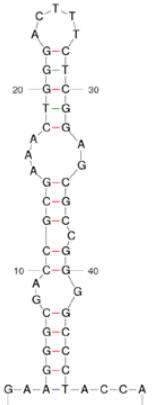
$dG = -7.3$  ENSG00000269335-ENST00000615186



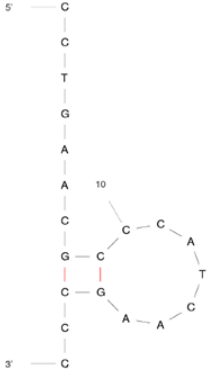
dG = -6.5 ENSG00000269335-ENST00000815186



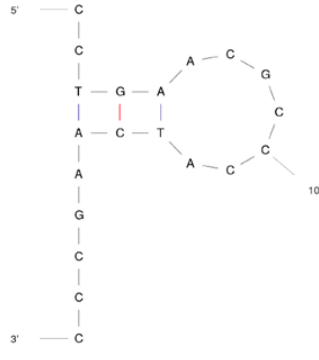
dG = -21.9 ENSG00000269335-ENST00000615874



dG = -21.9 ENSG00000269335-ENST00000817207



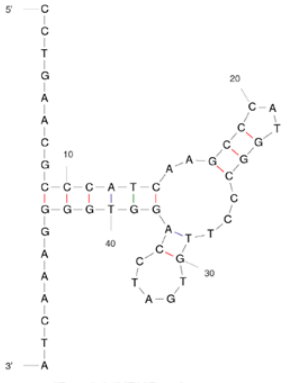
dG = 20.4 ENSG00000269335-ENST00000618670



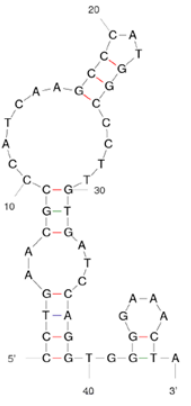
dG = 0.6 ENSG00000269335-ENST00000618670



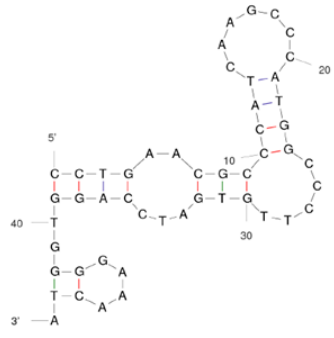
dG = -21.9 ENSG00000269335-ENST00000619941



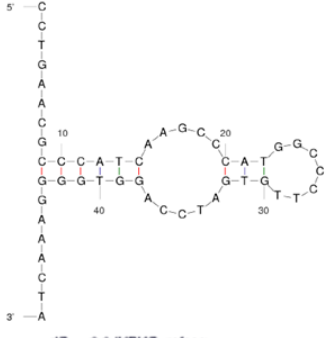
dG = -9.3 KBKG\_refseq



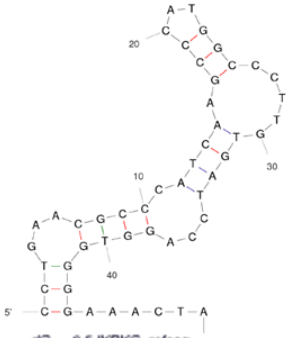
dG = -9.1 KBKG\_refseq



dG = -8.9 KBKG\_refseq



dG = -8.8 KBKG\_refseq



dG = -8.5 KBKG\_refseq



### ANEXO III

Os artigos publicados no decorrer do Doutorado encontram-se aqui referenciados e estão dispostos em ordem nas páginas seguintes.

a) Artigo relacionado a tese

FLEITH, R. C. et al. IFIT3 and IFIT2/3 promote IFIT1-mediated translation inhibition by enhancing binding to non-self RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 10, p. 5269–5285, 2018.

b) Artigos adicionais

FLEITH, R. C. R. et al. Genome-wide analyses reveal a highly conserved Dengue virus envelope peptide which is critical for virus viability and antigenic in humans. **Scientific Reports**, v. 6, n. November, p. 1–8, 2016.

MAREZE, V. A. V. A. et al. Tests in mice of a dengue vaccine candidate made of chimeric Junin virus-like particles and conserved dengue virus envelope sequences. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 1, p. 125–133, 2016.

# IFIT3 and IFIT2/3 promote IFIT1-mediated translation inhibition by enhancing binding to non-self RNA

Renata C. Fleith<sup>1,2,3,†</sup>, Harriet V. Mears<sup>1,†</sup>, Xin Yun Leong<sup>1</sup>, Thomas J. Sanford<sup>1</sup>, Edward Emmott<sup>1</sup>, Stephen C. Graham<sup>1</sup>, Daniel S. Mansur<sup>2</sup> and Trevor R. Sweeney<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Virology, Department of Pathology, University of Cambridge, Addenbrooke's Hospital, Hills Road, Cambridge, UK, <sup>2</sup>Laboratory of Immunobiology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil and <sup>3</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Received December 14, 2017; Revised February 28, 2018; Editorial Decision March 02, 2018; Accepted March 05, 2018

## ABSTRACT

Interferon-induced proteins with tetratricopeptide repeats (IFITs) are highly expressed during the cell-intrinsic immune response to viral infection. IFIT1 inhibits translation by binding directly to the 5' end of foreign RNAs, particularly those with non-self cap structures, precluding the recruitment of the cap-binding eukaryotic translation initiation factor 4F and ribosome recruitment. The presence of IFIT1 imposes a requirement on viruses that replicate in the cytoplasm to maintain mechanisms to avoid its restrictive effects. Interaction of different IFIT family members is well described, but little is known of the molecular basis of IFIT association or its impact on function. Here, we reconstituted different complexes of IFIT1, IFIT2 and IFIT3 *in vitro*, which enabled us to reveal critical aspects of IFIT complex assembly. IFIT1 and IFIT3 interact via a YxxxL motif present in the C-terminus of each protein. IFIT2 and IFIT3 homodimers dissociate to form a more stable heterodimer that also associates with IFIT1. We show for the first time that IFIT3 stabilizes IFIT1 protein expression, promotes IFIT1 binding to a cap0 Zika virus reporter mRNA and enhances IFIT1 translation inhibition. This work reveals molecular aspects of IFIT interaction and provides an important missing link between IFIT assembly and function.

## INTRODUCTION

The host innate immune response provides a first line defence against invading pathogens. Following infection, pathogen recognition receptors (PRRs) sense non-self, pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) trigger-

ing signaling pathways that activate an immune response (reviewed in 1). Detection of viral signatures by PRRs, such as RIG I-like receptor sensing of double stranded RNA, induces production of Type I and Type III interferon (IFN). Through binding of cell surface IFN receptors and subsequent activation of the JAK-STAT pathway, IFN activates the transcription of hundreds of IFN-stimulated genes (ISGs) (2), many with known antiviral properties, priming neighbouring cells to restrict viral spread.

The interferon induced protein with tetratricopeptide repeats (IFIT) protein family, present in all vertebrates, include some of the most highly expressed ISGs. Different species have varying complements of IFITs, but most mammals possess IFIT1, IFIT1B, IFIT2, IFIT3 and IFIT5 (3). IFITs typically contain multiple IFN-stimulated response elements (ISREs) in their promoters (reviewed in 3) and are also induced directly by IFN-regulatory factor 3 (5), downstream of initial PRR activation. Recently, phylogenetic analysis revealed that rodents, including mice, have lost IFIT1 but *Ifit1b* has undergone duplication twice (*Ifit1b2* and *Ifit1b3*) and *Ifit3* once (*Ifit3b*) (6).

IFITs are composed of sequential tetratricopeptide repeat (TPR) motifs that form globular N- and C-terminal domains joined by a linker of variable flexibility (7–11). TPR motifs are frequently involved in protein-protein interactions and are commonly found in scaffolding proteins (12). The crystal structures of IFIT1 and IFIT5 revealed a positively charged pocket formed in the groove between the N and C domains that interacts with single-stranded RNA (8–10). IFIT1 RNA binding activity was first reported by Pichlmair *et al.* (13) who identified proteins in lysates from IFN stimulated cells that interacted with 5'-ppp RNAs. Subsequently, we and others demonstrated that IFIT1 tightly binds capped RNAs lacking methylation on the first cap-proximal nucleotide (cap0) with low nanomolar affinity (14–16). While similar positively charged tun-

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +44 1223336072; Fax: +44 1223336926; Email: ts629@cam.ac.uk

†The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as Joint First Authors.

Present address: Edward Emmott, Department of Bioengineering, College of Engineering, Northeastern University, 360 Huntington Ave, Boston, MA, USA.

nels in IFIT1 and IFIT5 interact with the phosphate backbone of bound RNAs (8,9,14), only IFIT1 possesses a large hydrophobic cavity at the rear of the tunnel that can accommodate the cap structure (9). These findings support a model whereby IFIT1 out-competes eukaryotic initiation factor (eIF) 4E/4F for binding to cap0-mRNAs, thereby inhibiting their translation. As host mRNAs are generally methylated on the first or first and second bases (cap1 and cap2, respectively), this selectivity offers a mechanism of recognising and blocking translation of non-self RNAs.

The expression of IFIT1 imposes a strict requirement on viruses that replicate in the cytoplasm and rely on cap-dependent translation to evolve and maintain mechanisms to avoid restriction by this ISG. For example, members of the *Flaviviridae* and *Coronaviridae* families that rely on cap-dependent translation to produce viral proteins from their single-stranded positive-sense RNA genomes, encode their own 2'-*O*-methyltransferases. Disruption of methyltransferase activity increases susceptibility of the flaviviruses West Nile virus, Japanese encephalitis virus and dengue virus (16–20) and the coronaviruses murine hepatitis virus and severe acute respiratory syndrome virus (21,22) to IFIT1 restriction. Interestingly, enzymatically 2'-*O*-methylated, capped mRNAs from parainfluenza virus 5 display differential translational sensitivity to IFIT1 *in vitro*, while wild type middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS) replication was enhanced upon IFIT1 depletion suggesting that factors other than 5' end methylation can influence IFIT1 recognition (23,24). By contrast, alphaviruses, such as the emerging human pathogen chikungunya virus, also rely on cap-dependent translation but lack a virally encoded 2'-*O*-methyltransferase, thus possessing viral mRNAs with a cap0 structure at the 5' end (25). Recent evidence suggests that stable secondary structure at the 5' end of alphaviral genomes protects the viral RNAs from IFIT1 restriction (26,27). IFIT1 may also affect translation through interaction with eIF3 (28), while its direct binding to the viral E1 protein restricts human papilloma virus replication (29).

An intriguing feature of IFITs is their propensity to homo and heterooligomerize. Using pull-down experiments of differentially tagged IFITs, Stawowczyk *et al.* (30) demonstrated that IFIT2 could interact both with itself and with IFIT1 and IFIT3 in HeLa cells. In the same study, an IFIT1, IFIT2 and IFIT3 containing complex in HeLa cytoplasmic lysates was also reported to migrate between 150–200 kDa when analyzed by glycerol gradient sedimentation. Deletion analysis identified the first four TPRs of IFIT2 as being important for interaction with IFIT3 while the TPR(s) of IFIT2 that promote interaction with IFIT1 could not be elucidated (30). IFIT1 was later reported to interact with IFIT2 or IFIT3 by size exclusion chromatography (SEC) (13). The crystal structure of IFIT2 revealed it forms a stable, domain-swapped dimer, with TPRs of the N-terminal domain exchanged between each monomer (7). Using native gel electrophoresis, we previously demonstrated IFIT1 and IFIT3 could homooligomerize (14), while a recently-reported crystal structure of IFIT1 identified a motif in the C terminus responsible for IFIT1 dimerisation (BioRxiv: <https://doi.org/10.1101/152850>). However, despite considerable evidence for IFIT oligomerisation, little is known

about how different IFITs interact and what impact this interaction has on function.

Here, we have reconstituted different IFIT complexes from individually purified proteins. We describe an assembly pathway for the IFIT heterocomplex identifying a critical motif for IFIT1 and IFIT3 interaction. We also demonstrate that IFIT1 expression is enhanced by the presence of other IFIT proteins and that interaction with IFIT3 or a heterocomplex of IFIT2 and IFIT3 enhances the cap0 RNA binding and translation inhibition activity of IFIT1. Our results provide a critical missing link between IFIT oligomerization and function presenting a mechanistic framework for understanding the role of IFITs in the host immune response.

## MATERIALS AND METHODS

### Plasmids

For mammalian cell expression, sequences for human IFIT1 (BC007091.1), IFIT2 (NM\_001547.4), IFIT3 (NM\_001549.5) and IFIT5 (BC025786.1) were PCR amplified to include a 5' Kozak sequence, 3' FLAG tag and 5' BamHI and 3' XhoI site to facilitate cloning into pCDNA3.1. The plasmid for expression of IFIT1 in *Escherichia coli* was previously described (10) and was used as a template for site directed mutagenesis to generate the mutant IFIT1 expression vectors. Sequences for IFIT2 and IFIT3 were PCR amplified to contain 5' NdeI and 3' XhoI restriction sites for cloning into pET28b (Novagen) producing a full-length protein with a thrombin cleavable N-terminal 6-His tag. Mutant IFIT3 expression vectors were generated by site directed mutagenesis using pCDNA3.1-IFIT3-FLAG or pET28b-IFIT3-His as templates. For reporter RNA transcription, the firefly luciferase reporter gene (Fluc) was PCR amplified using primers containing the 5' UTR and 3' UTR sequences of human  $\beta$ -globin (NM\_000518.4), including a 5' T7 promoter and EcoRI and PstI sites to facilitate cloning into pUC57. pUC57-ZIKV-Fluc was previously described (31). The Nano luciferase reporter gene (Nanoluc) flanked by the 5' UTR and 3' UTR sequences of the PE243 strain of Zika virus (ZV), including a 5' T7 promoter sequence, was synthesized by Integrated DNA Technologies. EcoRI and HindIII sites were included to allow cloning into pUC57.

### Protein expression and purification

Recombinant IFITs were expressed in Rosetta 2 (DE3) pLysS *Escherichia coli* (Novagen). Cells were grown to an OD<sub>600</sub> of approximately 1 in 2× TY media at 37°C. Expression was induced by adding 1 mM isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside. The induced culture was incubated at 22°C for 16 h. Cells were harvested and lysed in a buffer containing 20 mM Tris pH 7.5, 400 mM KCl, 5% glycerol, 1 mM DTT and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 0.5 mg/ml lysozyme (from hen egg). IFITs were isolated by affinity chromatography on Ni-NTA Agarose beads (Qiagen). IFIT1 and IFIT1 mutants were additionally purified by FPLC on MonoQ (Q buffer: 20 mM Tris pH 7.5, 5% glycerol, 1 mM DTT and 100–500 mM KCl), followed by MonoS 5/50 GL (S buffer: 30 mM HEPES pH 7.5, 5%

glycerol, 1 mM DTT and 100–500 mM KCl). IFIT2 and IFIT3 were treated with thrombin (from bovine plasma). IFIT2 and IFIT3 were further purified on MonoQ 5/50 (Q buffer), followed by size exclusion chromatography (SEC) on Superdex 200 increase 10/300 GL or HiLoad 16/600 Superdex 200 pg columns (SEC buffer: 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl and 1 mM DTT). All FPLC columns are from GE Healthcare and all buffer reagents and enzymes were from Sigma.

### ***In vitro* IFIT complex assembly**

All complexes were assembled in SEC buffer.

**IFIT1:IFIT2** and **IFIT1:IFIT3**—1 mg/ml of each protein was mixed and incubated for 1 h at 4 or 30°C. **IFIT2:IFIT3**—0.18 mg/ml of each protein was mixed and incubated for 1 h at 37°C and concentrated to 2 mg/ml. **IFIT1:IFIT2:IFIT3 trimer**—0.4 mg/ml of purified IFIT2:IFIT3 complex and 0.2 mg/ml of IFIT1 were incubated for 1 h at 30°C. The complex was concentrated to 3 mg/ml. **IFIT1:IFIT2:IFIT3 tetramer**—0.4 mg/ml of purified IFIT2:IFIT3 complex and 0.4 mg/ml of IFIT1 were incubated for 1 h at 30°C. The complex was concentrated to 4 mg/ml. Complexes were concentrated using Amicon Ultra 0.5 ml 10 kDa molecular weight cut off filters (Millipore).

### **SEC analysis of mutant IFIT1 and IFIT3 complexes**

Wild type or mutant IFIT1 and IFIT3 were combined as described in *IFIT complex assembly*. 150  $\mu$ l of each assembly reaction was injected on to a Superdex 200 Increase 10/300 GL column, at 0.3 ml/min flow rate and UV280 readings were monitored. Peak fractions were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie staining.

### **SEC-multi-angle light scatter (SEC-MALS)**

Proteins/complexes were injected (100  $\mu$ l at the concentration described in *IFIT complex assembly*) onto an analytical Superdex 200 Increase 10/300 gel filtration column. MALS analysis was performed at room temperature, by inline measurement of static light scattering (DAWN 8+, Wyatt Technology), differential refractive index (Optilab T-rEX, Wyatt Technology), and 280 nm absorbance (Agilent 1260 UV, Agilent Technologies) following SEC at a flow rate of 0.4 ml/min. Molecular masses were calculated using the ASTRA6 software package (Wyatt Technology).

### **Differential scanning fluorimetry**

Differential scanning fluorimetry experiments to determine the thermal stability of different IFIT complexes was performed using a Viiia7 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). In an optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems 4366932), 1:500 Protein Thermal Shift dye (Life Technologies, 4461146) was mixed with 0.1 mg/ml protein in a final buffer composition of 20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM KOAc, 2.5 mM MgOAc, 5% glycerol and 1 mM DTT in a final volume of 20  $\mu$ l. Emission from quadruplicate samples was measured at 623 nm while ramping from 25 to 95°C stepwise at a rate of 1°C per 20 s. To determine

$T_m$ , data were analyzed by non-linear regression using the Boltzmann equation  $y = LL + (UL - LL)/(1 + \exp((T_m - x)/a))$  where LL and UL are the minimum and maximum fluorescence intensities respectively (32).

### ***In vitro* transcription**

pUC57-globin-Fluc was linearized with FspI. pUC57-ZIKV-Fluc and pUC57-ZIKV-Nanoluc were linearized with HindIII. RNA was transcribed using recombinant T7 polymerase at a final concentration of 50 ng/ $\mu$ l in transcription buffer (40 mM HEPES pH 7.5, 32 mM MgOAc, 40 mM DTT, 2 mM Spermidine, 10 mM NTPs, 0.2 U/ $\mu$ l RNaseOUT (Invitrogen)) for 2–4 h at 37°C. RNA was purified by DNaseI treatment, acidic phenol extraction and ethanol precipitation. Residual nucleotides were removed using Illustra MicroSpin G-50 columns (GE Healthcare). RNA was capped using the ScriptCap and ScriptCap 2'-O-methyltransferase system (CellScript).

### ***In vitro* translation**

IFIT proteins or complexes were diluted in bovine serum albumin (BSA) diluent buffer (0.5 mg/ml BSA, 20 mM Tris pH 7.5, 160 mM KCl, 5% glycerol, 2 mM DTT, 1 U/ $\mu$ l RNaseOUT), and incubated with 4 nM reporter RNA for 15 min at 37°C to allow RNA binding. *In vitro* translation was performed using the Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate (RRL) System (Promega) for 90 min at 30°C. Reactions were terminated by incubation on ice, followed by addition of 50 volumes of passive lysis buffer (Promega) before luciferase signal was measured by GloMax (Promega). Luciferase values were normalized to the diluent buffer-only control for each experiment.

### **Western blotting**

Proteins were resolved by 12.5% SDS-PAGE and transferred to 0.45  $\mu$ m nitrocellulose membrane. Antibodies used were anti-FLAG M2-Peroxidase (A8592, Sigma), anti-FLAG M2 (F3165, Sigma), anti-IFIT1 (PA3-848, ThermoFisher), anti-IFIT2 (12604-1-AP, Proteintech), anti-IFIT3 (PA5-22230, ThermoFisher), anti-GAPDH (AM4300, ThermoFisher) and anti-penta-His (34660, Qiagen). For pull-down experiments FLAG-tagged proteins were detected by chemiluminescence using Westar Supernova substrate (Cyanagen) and visualized on Super RX-N film (Fujifilm). For all other western blot experiments an Odyssey CLx Imaging System (Li-Cor) was used. To normalize recombinant IFIT proteins and complexes, membranes were probed with anti-penta-His and quantified using ImageJ.

### **Analysis of the IFIT1-mRNA interaction by inhibition of primer extension (toeprinting)**

IFIT1/mRNA interaction was performed essentially as described previously (14) with minor modifications. Cap0-ZV or cap0- $\beta$ -globin reporter mRNAs (1 nM) were incubated with IFIT1 or IFIT1 containing complexes (at concentrations indicated in figures) for 10 min at 37°C in 20  $\mu$ l reactions containing 20 mM Tris pH 7.5, 100 mM KCl, 2.5



mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 0.2 mM GTP, 1 mM DTT, 0.25 mM spermidine and 0.5 mg/ml BSA. IFIT1/mRNA interaction was monitored by inhibition of primer extension using avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (2.5 U) (Promega) and a <sup>32</sup>P-labeled primer in the presence of 4 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.5 mM dNTPs. Full length and truncated cDNA products were separated in a denaturing 6% acrylamide gel and detected by autoradiography using an FLA7000 Typhoon Scanner (GE). Analysis was performed using Image-Quant TL.

### HEK293T transfection

HEK293T cells (1 × 10<sup>6</sup>) were transfected with wild type or mutant IFIT1, IFIT2 and/or IFIT3 FLAG-tagged expression constructs as indicated in the text using Lipofectamine 2000 (ThermoFisher) using the manufacturers standard protocol. After 24 h cells were harvested, and protein expression analyzed by western blotting.

### RNA transfection

HEK293T cells (1 × 10<sup>6</sup>) were transfected with wild type IFIT1 and wild type or mutant IFIT3 expression plasmids as indicated in the text using Lipofectamine 2000 (ThermoFisher). After 24 h, cells were trypsinized and 1.5 × 10<sup>5</sup> cells per well were plated into a 48-well plate, in duplicate. After 4 h, cells were washed into Opti-MEM medium (ThermoFisher) and transfected with 100 fmol each cap0-ZIKV-Fluc and cap1-ZIKV-Nanoluc RNA using Lipofectamine 2000, or untreated (mock), for 6 h. Cells were harvested in passive lysis buffer. Fluc signal was detected as described above. Nanoluc signal was detected using the Nano-Glo luciferase assay system (Promega). Plasmid transfection was performed in triplicate and RNA transfections in duplicate. Luciferase values are expressed as a ratio of Nanoluc (cap1) over Fluc (cap0), normalized to the empty vector control.

### Stable isotope labeling with amino acids in cell culture and immunoprecipitation

HEK293T cells were cultured in Arg/Lys-free DMEM, supplemented with light (R0K0), medium (R6K4) or heavy (R10K8) amino acids, as described (33). 1 × 10<sup>7</sup> cells were transfected with 10 μg plasmid DNA using Lipofectamine 2000 (ThermoFisher). After 24 h, media was replaced to contain 1000 U/ml human interferon α-2a (Roferon-A, Roche) for a further 16 h. Cells were harvested in lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X100) containing 1:200 Protease Inhibitor Cocktail Set III (Merck) and 1:200 Benzoylase nuclease (Sigma-Aldrich). Lysates were normalized to 3 mg/ml of protein before incubation with anti-FLAG-M2 affinity gel (Sigma) at 4°C for 18 h. Beads were washed three times in Tris-buffered saline, then resuspended in 2 × SDS-sample buffer (Invitrogen) and boiled for 5 min to elute bound proteins.

### LC-MS/MS and sample preparation

Following immunoprecipitation, the combined samples were subjected to SDS-PAGE electrophoresis on a precast

gel, and extracted as a single band for in-gel trypsinisation. The resulting peptides were fractionated using an Ultimate 3000 nanoHPLC system in line with an Orbitrap Fusion Tribrid mass spectrometer (Thermo Scientific). In brief, peptides in 1% (vol/vol) formic acid were injected onto an Acclaim PepMap C18 nano-trap column (Thermo Scientific). After washing with 0.5% (vol/vol) acetonitrile 0.1% (vol/vol) formic acid, peptides were resolved on a 250 mm × 75 μm Acclaim PepMap C18 reverse phase analytical column (Thermo Scientific) over a 150 min organic gradient, using seven gradient segments (1–6% solvent B over 1 min, 6–15% B over 58 min, 15–32% B over 58 min, 32–40% B over 5 min, 40–90% B over 1 min, held at 90% B for 6 min and then reduced to 1% B over 1 min) with a flow rate of 300 nl min<sup>-1</sup>. Solvent A was 0.1% formic acid and Solvent B was aqueous 80% acetonitrile in 0.1% formic acid. Peptides were ionized by nano-electrospray ionization at 2.0 kV using a stainless steel emitter with an internal diameter of 30 μm (Thermo Scientific) and a capillary temperature of 275°C.

All spectra were acquired using an Orbitrap Fusion Tribrid mass spectrometer controlled by Xcalibur 2.1 software (Thermo Scientific) and operated in data-dependent acquisition mode. FTMS1 spectra were collected at a resolution of 120 000 over a scan range (*m/z*) of 350–1550, with an automatic gain control (AGC) target of 300 000 and a max injection time of 100 ms. Precursors were filtered using an Intensity Range of 1E4 to 1E20 and according to charge state (to include charge states 2–6) and with monoisotopic precursor selection. Previously interrogated precursors were excluded using a dynamic window (40 s ± 10 ppm). The MS2 precursors were isolated with a quadrupole mass filter set to a width of 1.4 *m/z*. ITMS2 spectra were collected with an AGC target of 20 000, max injection time of 40 ms and CID collision energy of 35%.

### Mass spectrometry data analysis

The raw data files were processed and quantified using MaxQuant v1.5.7.4 (34) and searched against the Uniprot Human database (70 550 entries, dated 19 September 2016) using the built-in Andromeda search engine. Peptide precursor mass tolerance was set a 4.5 ppm, and MS/MS tolerance was set at 0.5 Da. Search criteria included carbaminomethylation of Cys as a fixed modification. Oxidation of Met and N-terminal acetylation were selected as variable modifications. Quantification was based on Light (Arg 0, Lys 0), Medium (Arg 6, Lys 4), and Heavy (Arg 10, Lys 8) SILAC labels. Searches were performed with tryptic digestion, a minimum peptide length of seven amino acids, and a maximum of two missed cleavages were allowed. The reverse database search option was enabled and the maximum false discovery rate for both peptide and protein identifications was set to 0.01. Quantitation was performed using a mass precision of 2 ppm. The full MaxQuant output is provided as part of PRIDE submission PXD007584 permitting viewing of annotated spectra in MaxQuant v1.5.7.4. Downstream analysis was accomplished in the Perseus software (35). Contaminants and reverse database hits were removed, and protein ratios were log<sub>2</sub>-transformed. Proteins were considered to represent putative interaction partners

if they showed a significant ( $t$ -test,  $P < 0.05$ ) increase in their abundance compared with the control pull-down and had to have been identified in at least two of the three replicates. Full proteomics data sets are available on ProteomeXchange via the PRIDE repository with the identifier PXD007584.

### Protein structure modeling and analysis

Protein structure analysis and generation of protein structure images was performed using PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC). The IFIT3 model was generated by submitting the IFIT3 amino acid sequence to the Swiss Model server. The crystal structure of the IFIT2 domain-swapped homodimer (PDB:4G1T) was used as a template for model generation. The electrostatic surface potential of IFIT2 and the IFIT3 model were analyzed using PDB2PQR and APBS software (36–38).

## RESULTS

### IFIT1 co-precipitates IFIT2 and IFIT3 independently of RNA association

IFIT1 was originally identified as an RNA binding protein after being precipitated by 5'-ppp RNA from lysates of IFN stimulated HEK293 cells. IFIT2 and IFIT3, as well as several well-characterized RNA binding proteins, co-precipitated with IFIT1 (13). We used SILAC proteomics to examine if IFIT1 could interact directly with IFIT2 and IFIT3 in nuclease treated lysates from IFN-stimulated cells. HEK293T cells were passaged in differentially isotopically labeled media and transfected with either a plasmid expressing FLAG-tagged IFIT1, FLAG-tagged IFIT5 (previously reported not to interact with other IFITs (13,30)), or an empty vector control. Twenty four hours after transfection the cells were treated with IFN- $\alpha$  and incubated for a further 16 h. Preparation of nuclease treated cell lysates and pull-down experiments are described in Materials and Methods. Consistent with previous reports (39), IFIT1 was poorly overexpressed while IFIT5 was strongly expressed (Supplementary Figure S1). However, as shown in Figure 1A, IFIT2 and IFIT3 co-precipitated with FLAG-tagged IFIT1, while FLAG-tagged IFIT5 did not precipitate other IFIT family members (Figure 1B). The full SILAC data set is available on the PRIDE server. These results independently confirm the interaction of IFIT1, 2 and 3 in IFN-stimulated cell lysates and further demonstrate that this interaction is maintained after nuclease treatment. Both IFIT2 and IFIT3 were enriched to a similar extent in the IFIT1 pull downs (Figure 1A).

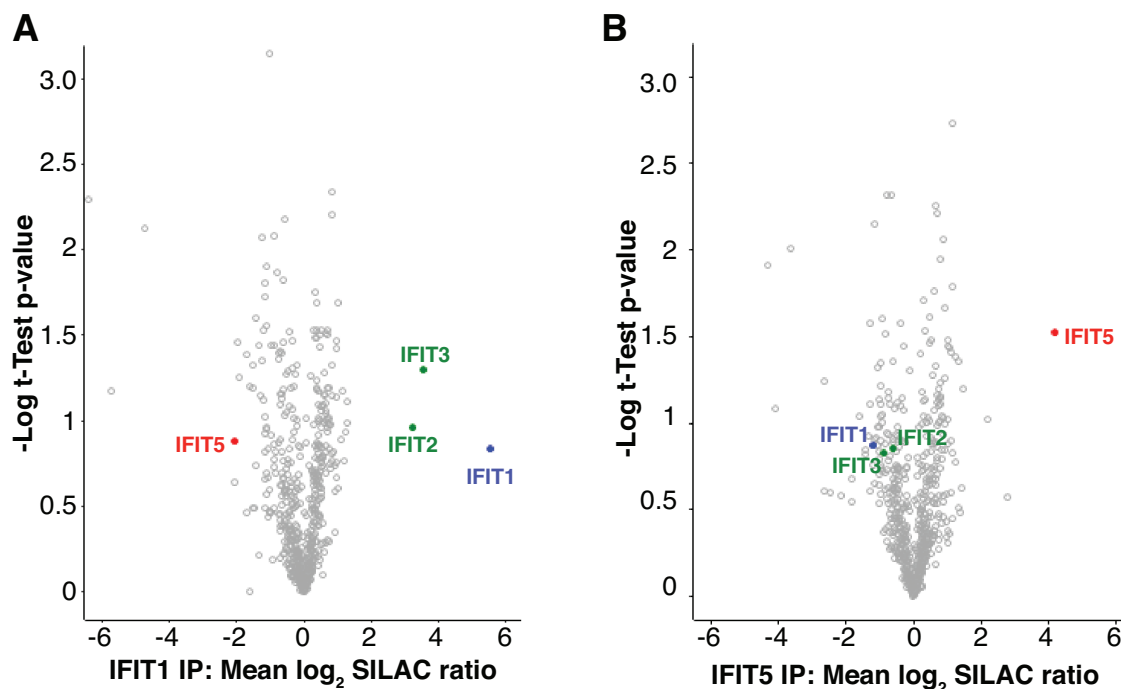
### IFIT1:IFIT2:IFIT3 hetero-complexes can be reconstituted from bacterially expressed proteins

To investigate human IFIT family oligomerisation and examine the influence of interaction with IFIT2 and IFIT3 on IFIT1 mRNA cap0 binding activity we reconstituted the IFIT1:IFIT2:IFIT3 hetero-complex *in vitro*. To this end, His-tagged IFIT1, IFIT2 and IFIT3 were individually expressed in bacteria and purified as described in Materials

and Methods. The His-tag was removed from IFIT2 and IFIT3 but retained on IFIT1 for later detection. Each protein was subjected to size exclusion chromatography with multi angle light scattering (SEC-MALS) to analyze IFIT assembly. SEC-MALS reveals the molecular mass of species eluting at different volumes from a size exclusion column providing information about the oligomeric state of these species. Varying concentrations of IFIT were analyzed by SEC-MALS and, consistent with a recent report (BioRxiv: <https://doi.org/10.1101/152850>), IFIT1 oligomerized in a concentration-dependent manner (Supplementary Figure S2A). In contrast, IFIT2 eluted as two species corresponding to a stable dimer or tetramer (Supplementary Figure S2B). Surprisingly, the IFIT2 dimer had a similar elution volume to the lowest concentration of IFIT1 examined. This demonstrates the importance of using the SEC-MALS technique which directly determines the mass of particles in solution from their Rayleigh scattering, instead of relying on the elution volumes of molecular weight standards during SEC to infer oligomeric state. When analyzed alone, IFIT3 also eluted as a mostly dimeric species, with a smaller peak corresponding to a monomer (Supplementary Figure S2C).

We next examined the oligomeric status of complexes containing mixtures of the individually purified IFIT proteins. IFIT1 and IFIT3 formed a stable complex that eluted with a molecular mass of 221 kDa (Figure 2A, peak a). Analysis of the protein peaks by SDS-PAGE shows that IFIT1 and IFIT3 are equimolar, indicating that this complex represents stable IFIT1:IFIT3 tetramers. A later eluting species likely corresponding to IFIT1:IFIT3 dimers (123 kDa) is also evident (Figure 2A, peak b). To determine the relative stabilities of IFIT1 alone or complexed with IFIT3 we examined IFIT1 and the IFIT1:IFIT3 heterocomplex using differential scanning fluorimetry. Using this approach, protein unfolding is monitored by measuring the signal from a dye that fluoresces in hydrophobic environments at increasing temperature. More stable proteins unfold at higher temperatures than less stable proteins. Unfolding exposes hydrophobic regions of the protein making them more accessible to the dye. As seen in Figure 2B the IFIT1:IFIT3 complex melts at a higher temperature than either IFIT1 or IFIT3 in isolation indicating that the complex is indeed more stable than either protein alone. The IFIT1:IFIT2 complex was less defined than IFIT1:IFIT3 and eluted as multiple species ranging from 148 to >234 kDa as measured by SEC-MALS (Supplementary Figure S2D). Interestingly this interaction was only observed when the proteins were incubated at 30°C prior to SEC-MALS analysis. When combined at 4°C prior to SEC analysis only a very weak interaction between IFIT1 and IFIT2 was observed (Supplementary Figure S2E).

Because IFIT2 and IFIT3 were enriched to a similar degree in our IFIT1 pull down SILAC experiments we hypothesized that IFIT1 could interact with a heterodimer of IFIT2 and IFIT3. We therefore examined if IFIT2 and IFIT3 formed a stable complex. Equal amounts of IFIT2 and IFIT3 were mixed and incubated at 4°C for 1 h. When analyzed by SEC-MALS two peaks corresponding to IFIT2 and IFIT3 homodimers were clearly separated (Figure 2C, grey dotted line). In contrast, when IFIT2 and IFIT3 were



**Figure 1.** Interaction between IFIT1, IFIT2 and IFIT3 occurs independently of bound RNA. Volcano plots of SILAC proteomics data showing statistical analysis of proteins that immuno-precipitated with (A) FLAG-tagged IFIT1 or (B) FLAG-tagged IFIT5 following nuclease treatment of IFN $\alpha$ -stimulated cell lysates. Data represent the analysis of three biological replicate experiments, and the mean log<sub>2</sub>-fold change and t-test *P*-values plotted represent the combined data from these three replicates. Data points corresponding to IFIT family members are colored and labeled.

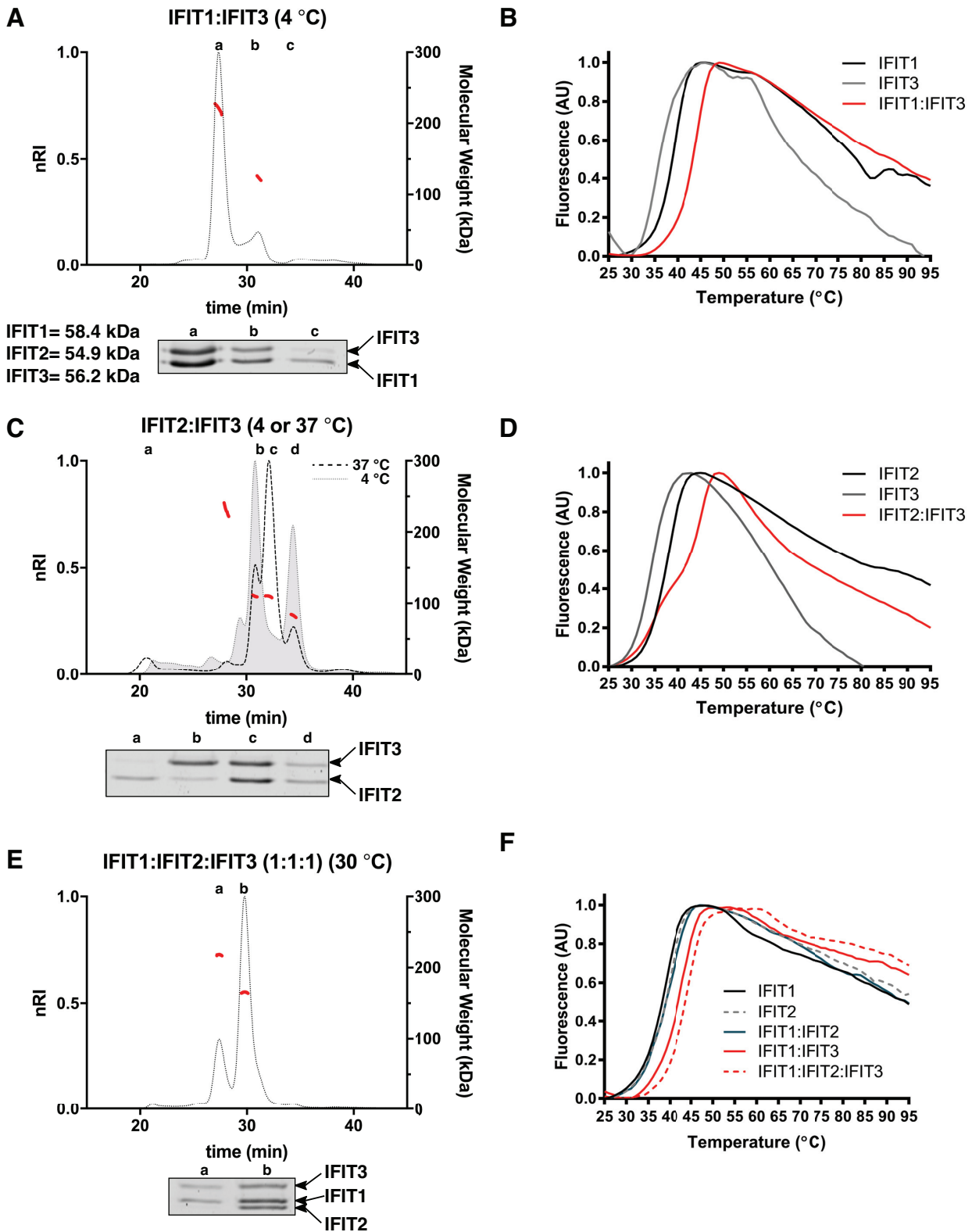
instead incubated at 37°C for 1 hour an IFIT2:IFIT3 heterodimer was formed (Figure 2C, black dashed line). The molecular weight of the eluting species (110 kDa) and analysis by SDS-PAGE (gel inset) are consistent with this complex representing an IFIT2:IFIT3 heterodimer. As evident in Supplementary Figure S2F, when peak fractions were re-analyzed by SEC-MALS there was no observed dissociation of the complex into constituent components, confirming that the IFIT2:IFIT3 complex is stable. To determine the relative stabilities of the different dimeric complexes, we examined IFIT2, IFIT3 and the IFIT2:IFIT3 heterodimer using differential scanning fluorimetry. Figure 2D shows the thermal melt curves for IFIT2 and IFIT3 homodimers and the IFIT2:IFIT3 heterodimer. Of the three sets of dimers IFIT3 was the least stable as it displays the lowest melting temperature while IFIT2:IFIT3 was more stable than either homodimer.

Having successfully formed a stable IFIT2:IFIT3 complex, we attempted to reconstitute the full IFIT1:IFIT2:IFIT3 heterotrimeric complex. An equimolar ratio of IFIT1 was incubated with the purified (preformed) IFIT2:IFIT3 heterodimeric complex. Most of the IFIT1 was incorporated into a larger complex that eluted with a molecular mass of 165 kDa corresponding to a trimer (Figure 2E). Analysis of this complex by SDS-PAGE (gel inset) reveals that it contains equimolar amounts of IFIT1, IFIT2 and IFIT3. Finally, we incubated the IFIT2:IFIT3 heterodimer with a two-fold molar excess of IFIT1 at 30°C for 1 hour. Analysis by SEC-MALS reveals a clear shift of the heterotrimeric complex to a heterotetrameric complex with a molecular mass of 236

kDa (Supplementary Figure S2G). SDS-PAGE analysis of this complex reveals a molar excess of IFIT1 over IFIT2 and IFIT3 indicating that the heterotetrameric complex consists of two IFIT1 molecules to one molecule each of IFIT2 and 3 (compare gel insets in Figure 2E and Supplementary Figure S2G). The ability to form this complex *in vitro* from purified components demonstrates that the complex can assemble independently of IFN stimulation. The IFIT1:IFIT2:IFIT3 heterotetramer precipitated with time so the IFIT1:IFIT2:IFIT3 heterotrimer was used for further experiments. We examined the relative stability of each of our new complexes by differential scanning fluorimetry as shown in Figure 2F. The thermal melting curves for IFIT1, IFIT2 and the IFIT1:IFIT2 complex were nearly identical indicating that each of these are more stable than IFIT3 alone (compare Figure 2B and F) whereas IFIT1:IFIT3 and IFIT1:IFIT2:IFIT3 were the most stable complexes examined.

### IFIT3 and IFIT2:IFIT3 stimulate the cap0-RNA translation inhibition activity of IFIT1

To investigate the impact of hetero-oligomerisation on the ability of IFIT1 to inhibit cap0-dependent translation we used a similar approach to that previously described by Young *et al.* (23). *In vitro* transcribed mRNAs comprising a firefly luciferase (Fluc) reporter flanked by either the ZV or human  $\beta$ -globin 5' and 3' untranslated regions (UTRs) were post-transcriptionally capped as described in the Materials and Methods. As described in the Introduction, flaviviruses lacking 2'-*O*-methylation are inhibited by IFN in an IFIT1-



**Figure 2.** *In vitro* reconstitution of IFIT oligomeric assemblies. (A, C and E) Indicated IFIT complexes were assembled and analyzed by SEC-MALS as described in the Materials and Methods. Complexes were formed at the indicated temperatures. Normalized differential refractive index (nRI) is shown as dotted or broken lines on the left *y*-axis. Calculated molecular masses (kDa) of eluting species are shown as solid, red lines on the right *y*-axis. Gel insets below each trace show SDS-PAGE analysis of each run. Protein gel lanes and corresponding peaks are indicated by lower case letters. The position of IFIT1, IFIT2 and IFIT3 on the protein gels is indicated. (B, D and F) Differential scanning fluorimetry analysis of the indicated complexes was performed as described in the Materials and Methods.



**Table 1.** Comparison of translation inhibition and cap0 mRNA binding kinetics

Complex/RNA	IC <sub>50</sub> <sup>†</sup> (nM IFIT1 in RRL)	P-value (IFIT1 vs complex)	RNA binding (K <sub>1/2, app.</sub> , nM)	Hill number
IFIT1/cap0-β-globin	71 ± 5.9	-	40 ± 1.2	2.8 ± 0.2
IFIT1:IFIT2/cap0-β-globin	58 ± 5.3	0.2798	-	-
IFIT1:IFIT3/cap0-β-globin	24 ± 1.2	<0.0001	19 ± 0.8	2.5 ± 0.2
IFIT1:IFIT2:IFIT3/cap0-β-globin	45 ± 2.9	<0.0001	19 ± 0.7	2.0 ± 0.1
IFIT1/cap0-ZV	112 ± 7.6	-	69 ± 1.8	3.5 ± 0.3
IFIT1:IFIT3/cap0-ZV	54 ± 3.5	<0.0001	29 ± 1.1	4.1 ± 0.6
IFIT1:IFIT2:IFIT3/cap0-ZV	46 ± 2.6	<0.0001	58 ± 2.3	3.1 ± 0.3

Values are from data presented in Figures 3 and 4. Details of the analysis performed are included in the corresponding figure legends.

<sup>†</sup>IC<sub>50</sub> values are the concentration of IFIT complexes that reduce the reporter translation by 50% ± standard error.

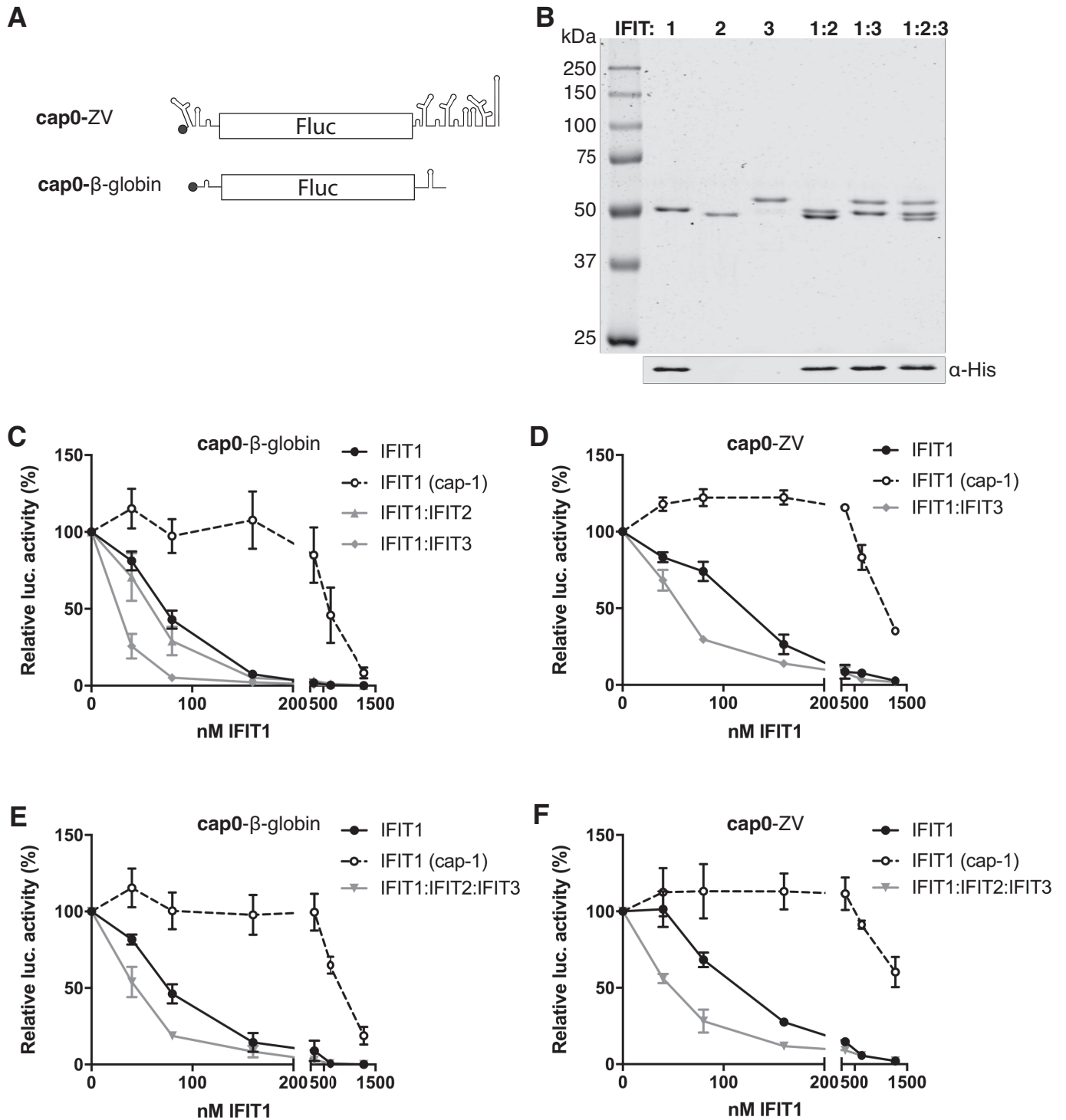
dependent manner. As such the cap0 version of this reporter is a representative mRNA that is inhibited by IFIT1. The β-globin reporter was examined as it has very weak secondary structure and a previous study has suggested that IFIT1 binding may be affected by both 5' end methylation state and RNA secondary structure (9). Schematics of the two constructs are shown in Figure 3A. These mRNAs were incubated with different IFIT heterocomplexes before addition of rabbit reticulocyte lysate (RRL). Advantages of the RRL system for this analysis are that the impact of different IFIT complexes on translation can be monitored independently of other changes occurring due to IFN stimulation and that the effects of defined amounts of each complex can be examined. We also previously used translation factors purified from RRL for the initial demonstration that IFIT translation regulation was affected by the cap structure of the mRNA 5' end (14). A well-known restriction of the RRL system is that it does not completely recapitulate the cap/polyA synergy of translation initiation (40). However, ZV, like other flaviviruses that utilize cap-dependent translation, do not possess 3' polyA tails and do not require circularization for translation (41). Translation was quantified by measuring the luminescence from the Fluc reporter. The amount of IFIT1 added was equalized by western blotting against the His-tag on the purified IFIT1 in each complex. The upper panel of Figure 3B shows an SDS-PAGE analysis of the protein complexes used in these experiments while the lower panel shows an anti-His-tag western blot of the same complexes. The linearity of the western blot signal to protein concentration was confirmed as shown in Supplementary Figure S3.

IFIT1 inhibited translation of the cap0-β-globin Fluc reporter in a concentration-dependent manner (Figure 3C). Pre-incubation of IFIT1 and IFIT2 had no detectable impact on the inhibition of translation of the cap0-β-globin Fluc reporter and so was not examined further. In contrast, complexing with IFIT3 reproducibly decreased the concentration of IFIT1 required to cause 50% inhibition of the same reporter (Figure 3C). The IC<sub>50</sub> values derived from the experiments shown in Figure 3 are displayed in Table 1. IFIT1 inhibited translation of the cap0-ZV reporter less than the β-globin reporter overall but complexing with IFIT3 again enhanced IFIT1's translation inhibitory effect (Figure 3D). As can be seen in Figure 3E and F, stimulation of IFIT1 translation inhibition was reproducibly observed in the context of the IFIT1:IFIT2:IFIT3 complex. The average volume of HeLa cells was previously reported

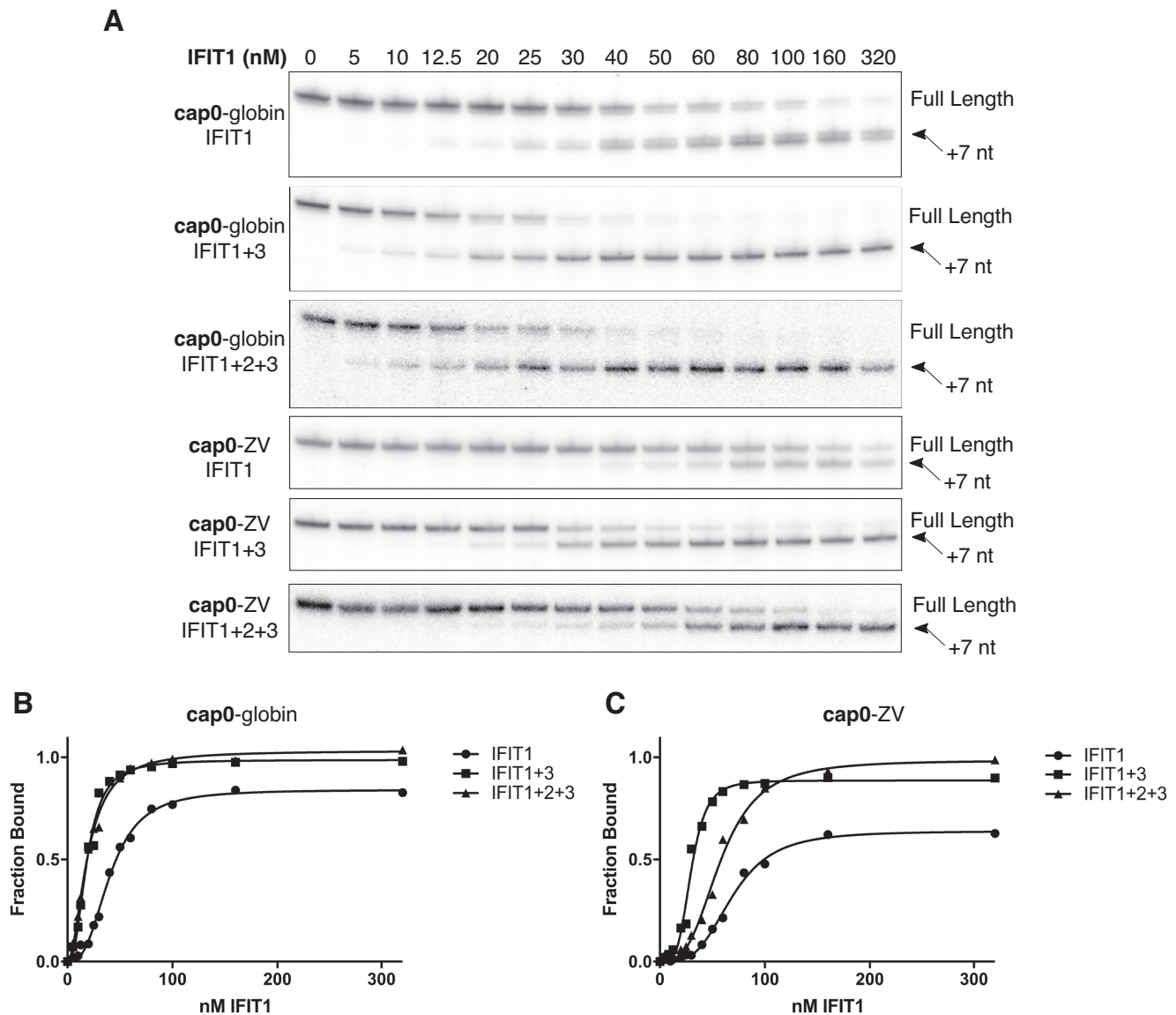
as  $2.6 \times 10^3 \mu\text{m}^3$  (42), while  $2.4 \times 10^6$  copies of IFIT1 were estimated to be present after IFN stimulation of HeLa cells (13). This would mean IFIT1 is present at an effective concentration of  $\geq 1.5 \mu\text{M}$  making the concentrations used in our assays physiologically relevant. Reporter mRNAs bearing cap1 were also examined (Figure 3C–F and Supplementary Figure S4) but showed much greater resistance to IFIT1 inhibition. The ability to observe this ~two-fold decrease in the IC<sub>50</sub> values for the inhibition of translation by IFIT1 in the presence of IFIT3 or IFIT2:IFIT3 in this system is significant, as RRL is very efficient in supporting cap-dependent translation as evidenced by the lack of cap/polyA synergy described above. Our results clearly implicate the structure present at the 5' end of a mRNA, as well as the methylation state, as an important determinant of susceptibility to IFIT1 restriction and that interaction with IFIT3 or IFIT2:IFIT3 can also influence this.

### IFIT3 and IFIT2:IFIT3 enhance cap0-RNA binding by IFIT1

We and others have previously demonstrated that IFIT1 binds preferentially to mRNA with a cap0 at the 5' end (14,15). Using our purified complexes, we next examined if the interaction of IFIT1 with cap0 mRNA was altered when part of a larger IFIT1:IFIT3 or IFIT1:IFIT2:IFIT3 complex. We used a primer extension inhibition assay to monitor the IFIT1/cap0 mRNA interaction as previously described (14). An advantage of this technique over other methods to analyze protein–RNA interactions, such as electrophoretic mobility shift assays, is that the primer extension reaction is performed in equilibrium binding conditions. IFIT1 alone or as part of an IFIT heterocomplex was incubated with the *in vitro* transcribed and capped model β-globin and ZV mRNAs prior to the addition of a radiolabeled primer that binds within the Fluc mRNA sequence. A reverse transcription reaction was performed in which a full-length cDNA is produced in the absence of IFIT1, whereas a 7 nucleotide truncated cDNA, corresponding to the length of the IFIT1 RNA-binding surface, is produced in the presence of IFIT1 (14). The cDNA products are subsequently separated by denaturing PAGE and detected by autoradiography. IFIT protein complexes shown in Figure 3B were used in the binding reactions. Representative autoradiographs are shown in Figure 4A. Quantification of the cDNA products was performed as described in the Materials and Methods and the binding curves shown in Figure



**Figure 3.** IFIT3 and IFIT2:IFIT3 enhance IFIT1 cap0 translation inhibition *in vitro*. (A) Schematic representation of the cap0-mRNAs used in *in vitro* translation assays in RRL. (B) IFIT1 containing complexes included in *in vitro* translation assays. Upper panel, Coomassie stained SDS-PAGE gel analysis of individually purified and complexed IFITs. Lower panel, analysis of the same samples as in the upper panel by western blotting against the His-tag. Note, the His-tag was removed from IFIT2 and IFIT3 but not IFIT1 during purification. (C–F) Luciferase activity from RRL incubated with cap0-β-globin Fluc RNA (C, E) or cap0-ZV Fluc RNA (D, F) in the presence of increasing concentrations of IFIT1 or IFIT1 containing complexes as indicated. In each panel (C–F) the effect of IFIT1 on the cap1 versions of the model RNAs is also shown. Data are normalized to the luciferase activity in the absence of IFITs and shown as the mean ± the standard error of three separate experiments. To calculate the IFIT complex concentration at which translation was inhibited by 50% data were fitted to [Inhibitor] versus normalized response curve ( $Y = 100 / (1 + (X^{HillSlope}) / (IC_{50}^{HillSlope}))$ ) using the least squares method in GraphPad Prism. IFIT concentrations at which reporter translation was 50% inhibited are reported as IC<sub>50</sub> values in Table 1.



**Figure 4.** IFIT3 containing complexes stabilize IFIT1 binding to cap0 RNA. (A) Toeprinting analysis of the interaction of IFIT1 and IFIT1 containing complexes with cap0 RNA. The full-length and 7 nucleotide (nt) truncated cDNA product produced by IFIT1 binding are indicated. Protein complexes and RNAs are the same as those used in Figure 3. (B, C) Graphs represent fraction of RNA bound by IFIT1 and IFIT1 containing complexes at varying IFIT1 concentrations. Curves representative of three separate experiments were fitted using the nonlinear Hill equation,  $\text{Fraction}^{\text{bound}} = \frac{[\text{IFIT1}]^h \cdot \text{Fraction}^{\text{bound}}_{\text{max}}}{([\text{IFIT1}]^h + K_{1/2, \text{app}}^h)}$  from data where  $[\text{IFIT1}]$  was  $\geq 10 \mu\text{M}$  [mRNA].  $K_{1/2, \text{app}}$  and Hill coefficients ( $h$ ) are listed in Table 1.

4B and C show the fraction of RNA bound at varying IFIT concentrations.

As previously reported (14), IFIT1 binds cap0- $\beta$ -globin mRNA with very high affinity. The binding constants for the experiments shown in Figure 4 are presented in Table 1. Complexing with IFIT3 or the IFIT2:IFIT3 heterodimer enhances binding of IFIT1 to this mRNA. IFIT1 heterocomplexing also has the effect of saturating the binding on the mRNA as evident in the autoradiograms. This effect was even more pronounced when the cap0-ZV reporter was analyzed. On this more structured model viral RNA IFIT1 binding only reached 60% saturation. When complexed with IFIT3, IFIT1 bound the ZV reporter with 2-fold higher affinity, similar to the effect observed for the

cap0- $\beta$ -globin mRNA. In contrast, the calculated  $K_{1/2, \text{app}}$  for the IFIT1:IFIT2:IFIT3 complex binding to the cap0-ZV reporter was only marginally lower than that for IFIT1 alone. However, again as is clear from the autoradiograms, addition of IFIT3 or the IFIT2:IFIT3 heterodimer led to saturation of RNA binding. It is not yet known how IFIT3 promotes IFIT1-cap0 binding, however, based on our *in vitro* RNA binding experiments we speculate that IFIT3 decreases the IFIT1 off rate, enhancing its ability to block eIF4F recruitment. This is potentially particularly important when IFIT1 is binding mRNA with highly structured 5' ends as our translation inhibition results in Figure 3 suggest. As IFIT1:IFIT3 is predominantly a stable tetramer with two copies of each protein and since complexing with

IFIT3 has a more noticeable effect on the apparent affinity of IFIT1 for cap0 mRNA, we conclude that IFIT3 and not IFIT2 in the IFIT2:IFIT3 complex is responsible for the observed effects. In all cases, and similar to our previous findings (14), the Hill coefficient was greater than 1, indicating a degree of cooperativity in IFIT1 cap0-mRNA binding.

### IFIT1 and IFIT3 interact through a C-terminal motif

Our data reveal that IFIT3 or the IFIT2:IFIT3 heterodimer can stimulate non-self mRNA binding and translation inhibition by IFIT1. We next sought to identify how IFIT1 and IFIT3 interact. Murine Ifit3, which does not precipitate with murine Ifit1b1 (15), has a large deletion at the C terminus (Supplementary Figure S5) when compared to human IFIT3. As a result of this deletion, mouse Ifit3 lacks a YxxxL structural motif present in both human IFIT3 and IFIT1 (Figure 5A and B) recently reported to promote IFIT1 concentration-dependent dimerisation (BioRxiv: <https://doi.org/10.1101/152850>). Our SEC-MALS and differential scanning fluorimetry analysis demonstrates that the IFIT1:IFIT3 interaction is more stable than the IFIT1:IFIT1 interaction (compare Figure 2A and Supplementary Figure S2A). We therefore hypothesized that the proposed IFIT1 dimerization motif is the site of interaction between IFIT1 and IFIT3.

Based on the IFIT1 dimer crystal structure (PDB: 5W5H) we generated three IFIT1 mutants, Y460E and L464E single mutants and a Y460E/L464E double mutant. All mutants expressed and purified similarly to the wild type protein and eluted as monomeric species during SEC (Figure 5C) consistent with disruption of IFIT1 homodimerization as previously reported (BioRxiv: <https://doi.org/10.1101/152850>). However, the L464E substitution had only a modest effect on the interaction of IFIT1 with IFIT3 (Figure 5D). The Y460E substitution destabilizes IFIT1:IFIT3 oligomerization to a greater extent than the L464E substitution (Figure 5E), but the double mutation Y460E/L464E completely abrogates the IFIT1-IFIT3 interaction (Figure 5F). We also confirmed that the corresponding YxxxL motif on IFIT3 is responsible for the interaction with IFIT1 (Supplementary Figure S6). Mutation of this motif however did not affect IFIT3 homodimerization.

Disruption of dimerisation was previously reported not to affect the translation inhibition activity of IFIT1 (BioRxiv: <https://doi.org/10.1101/152850> and Figure 5G, white bars). Therefore, we examined what impact mutations in the YxxxL motif had on the ability of IFIT3 to stimulate IFIT1 translation inhibition activity. IFIT1 mutants were combined with IFIT3, reporter mRNA and RRL as described in Materials and Methods and luminescence was measured (Figure 5G). At 40 nM IFIT1, YxxxL motif mutants displayed similar translation inhibition to wild type IFIT1. IFIT3 significantly enhanced translation inhibition of both wild type IFIT1 and the IFIT1-L464E mutant. In contrast, IFIT3 did not stimulate translation inhibition of either the IFIT1-Y460E mutant or the L464E/Y460E double mutant.

### IFIT2 and IFIT3 stabilize IFIT1 expression in cells

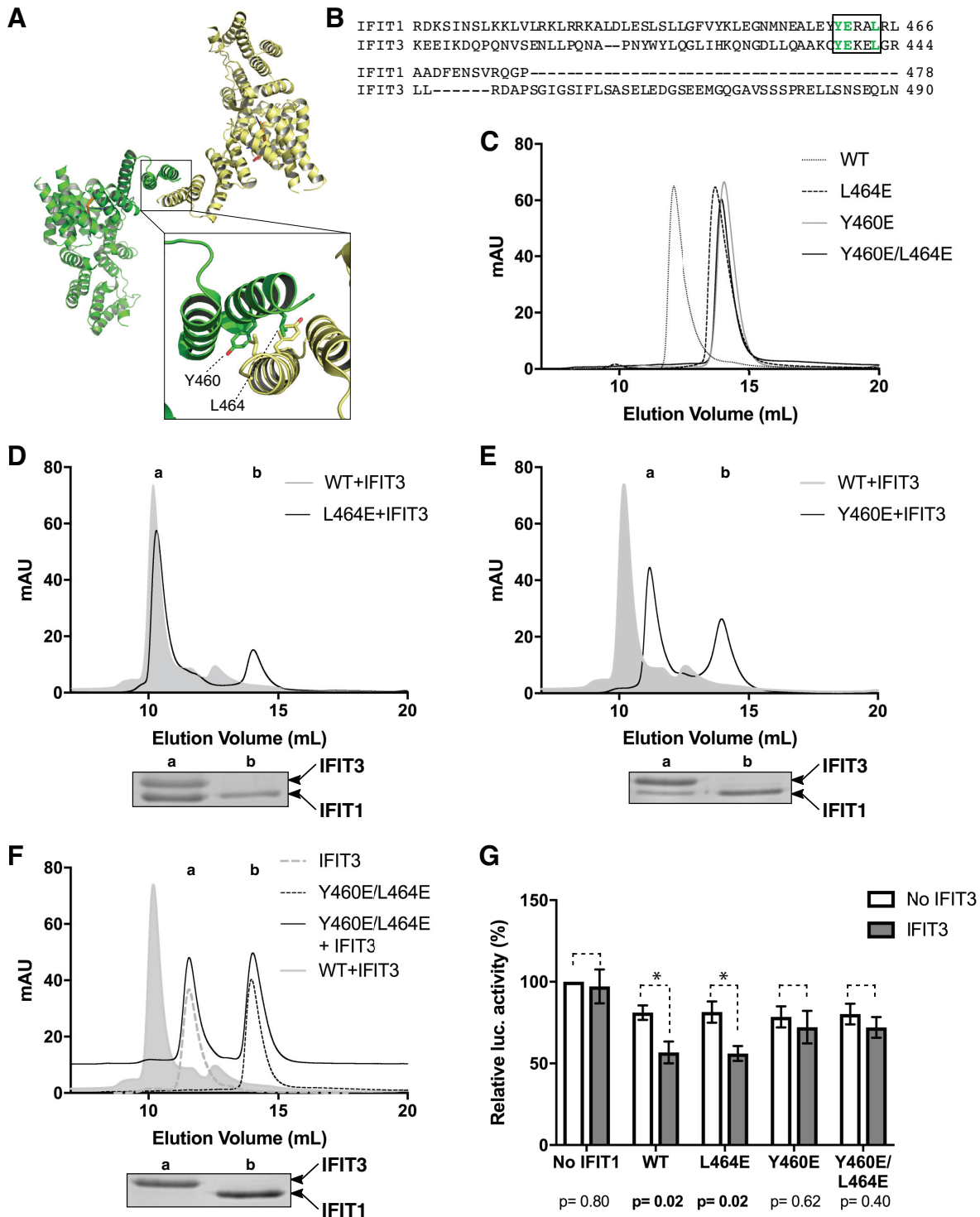
After confirming that reconstituted heterocomplexes are more stable than the individual IFIT proteins *in vitro* we examined the impact of IFIT complexing in a cell-based system. HEK293T cells were transfected with either FLAG-tagged IFIT1 alone or along with increasing amounts of a plasmid encoding IFIT2 or IFIT3. The amount of FLAG-tagged IFIT1 plasmid used produces a similar level of IFIT1 expression as detected after 24 h treatment with IFN- $\alpha$  (Supplementary Figure S7A). The presence of IFIT3 but not IFIT2 dramatically stabilized the expression of IFIT1 (Figure 6A and B). As shown in Figure 6C, the stabilization is dependent on the integrity of the YxxxL motif. Interestingly, mutation of the YxxxL motif in IFIT1 causes a small but reproducible increase in IFIT1 expression in the absence of any other IFITs (compare lanes 1 and 3 in Figure 6C). Since FLAG-tagged IFIT1 and IFIT2 could not be separated by SDS-PAGE we used anti-IFIT1 to detect protein expression. IFIT2 expression in these samples was confirmed as shown in Supplementary Figure S7B.

Finally, we examined whether IFIT3 could enhance IFIT1 activity in cells. HEK293T cells were transfected with IFIT1 alone or co-transfected with either wild type or Y438E/L442E mutant IFIT3, which cannot bind to IFIT1 (Supplementary Figure S6). After 24 h, *in vitro* transcribed and capped mRNAs comprising the Fluc or Nanoluc reporter genes shown in Figure 6D flanked by the ZV 5' and 3' UTRs were transfected into the IFIT-expressing cells, as described in Materials and Methods. The ZV Fluc mRNA is the same as that used in the *in vitro* translation inhibition assays in Figure 3. The ZV Nanoluc mRNA is identical to this reporter but expresses a nano luciferase gene rather than a firefly luciferase gene. As addition of cap1 to the ZV genome renders it resistant to IFIT1 inhibition (Supplementary Figure S4), translation from the cap1 ZV Nanoluc reporter serves as an internal control for RNA transfection efficiency. Translation was quantified by measuring luminescence from the Fluc or Nanoluc reporters and expressed as a ratio of Fluc(cap0)/Nanoluc(cap1) in Figure 6D. IFIT1 alone caused a 20% reduction in cap0 RNA translation compared to empty vector transfected cells. Co-expression with wild type IFIT3 resulted in a two-fold enhancement of this inhibition. In contrast, co-expression with the Y438E/L442E mutant IFIT3 that does not bind wild type IFIT1 had no effect on IFIT1-mediated translation inhibition. These in cell experiments confirm an important role for IFIT3 in promoting the full antiviral effects of IFIT1.

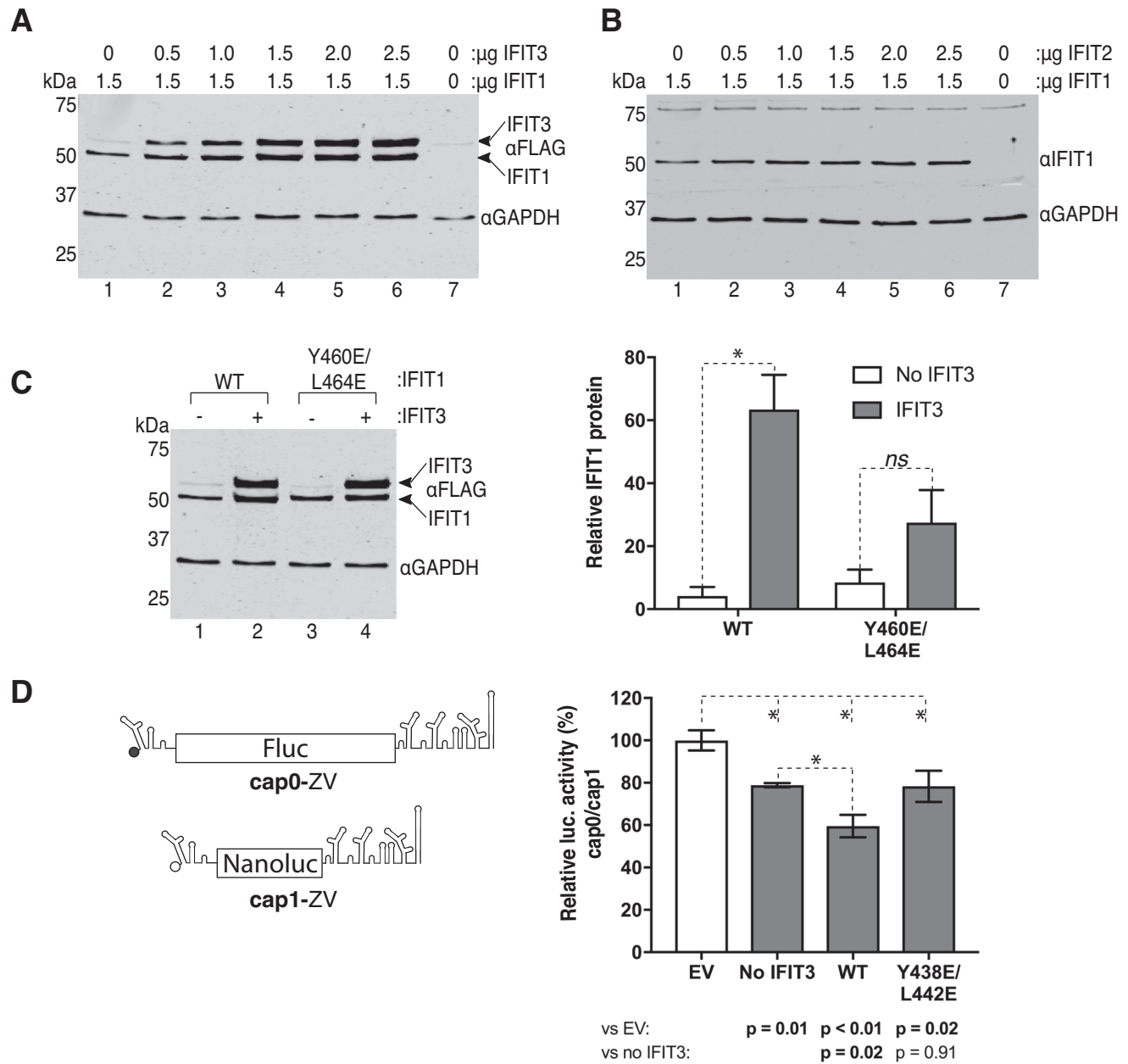
### DISCUSSION

The IFIT family of ISGs are among the most highly up-regulated proteins during the cellular response to viral infection and, while a role for IFITs in regulating translation has long been postulated, the mechanisms by which these proteins function are only recently being revealed. Here, we have presented, to our knowledge, the first *in vitro* reconstitution of the IFIT1:IFIT2:IFIT3 complex. This has enabled us to examine the impact of hetero oligomerisation on IFIT stability, RNA recognition and translation regulation and to understand how this complex assembles.





**Figure 5.** Mutational analysis reveals a key IFIT1:IFIT3 interaction motif. (A) Crystal structure of wild type IFIT1 (PDB: 5W5H). The two chains in the asymmetric unit are colored yellow and green with m7GpppAAAA bound in the cap-binding pocket highlighted in orange. The interface region between the two IFIT1 molecules with Y460 and L464 side chains is enlarged (only labeled for the chain colored green). (B) Sequence alignment of the C-terminal regions of IFIT1 and IFIT3 generated by Clustal Omega. The YxxxL motif is boxed. (C–F) UV<sub>280</sub> absorbance traces of SEC analysis (SuperdexS200 Increase 10/300 column) of wild type (WT) and mutant IFIT1 alone or incubated with IFIT3. (D–F) Gel insets below each trace show SDS-PAGE analysis of each run. Protein gel lanes and corresponding peaks are indicated by lower case letters. The position of IFIT1 and IFIT3 on the protein gels is indicated. The Y460E/L464E+IFIT3 trace in F is adjusted by +10 milli absorbance units (mAU) for clarity. The elution profile of WT IFIT1+IFIT3 is shown in grey shadow for reference. (G) Luciferase activity from RRL incubated with cap0- $\beta$ -globin Fluc RNA and WT or mutant IFIT1 with or without IFIT3 as indicated. Data are normalized to the luciferase activity in the absence of IFIT1 and shown as the mean  $\pm$  the standard error of three separate experiments. Statistical analysis was performed using an unpaired, two-tailed Students T-test. *P* values are indicated, and \* denotes statistical significance.

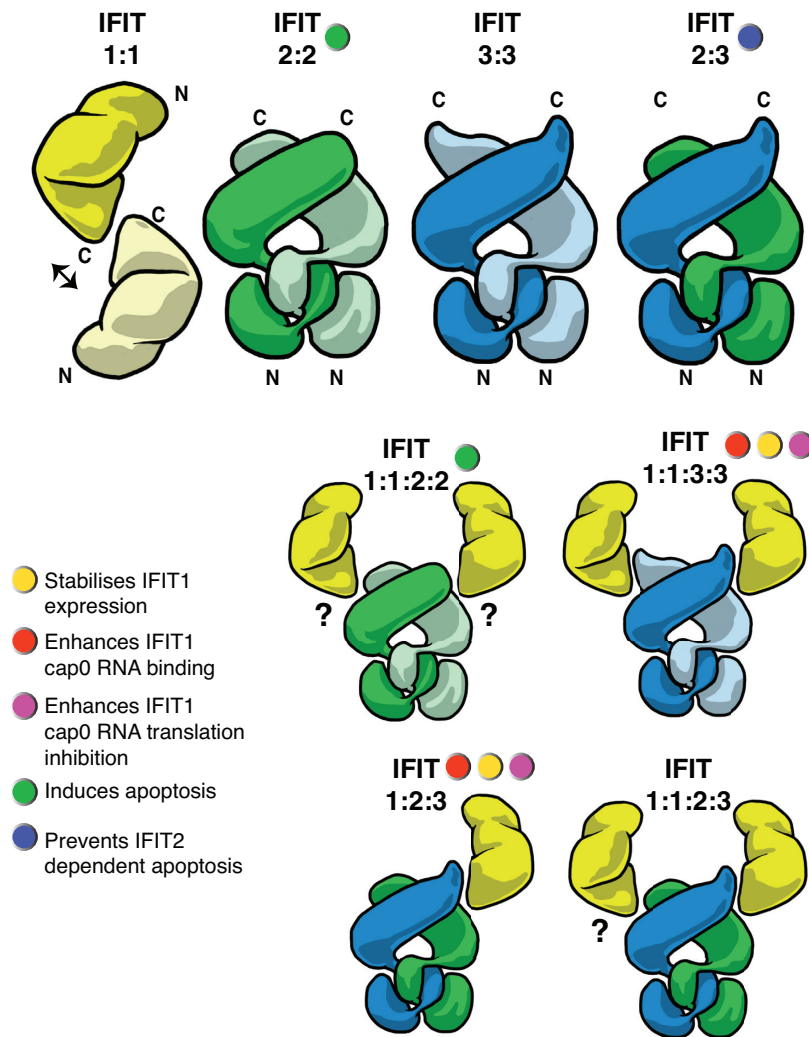


**Figure 6.** IFIT3 stabilizes and promotes IFIT1 activity in cells. (A and B) HEK293T cells were transfected with the indicated amounts of plasmid encoding FLAG-tagged versions of IFIT1, IFIT2 and IFIT3. After 24 hours cell lysates were harvested and analyzed by western blotting. (A) anti-FLAG and (B) anti-IFIT1 blots are shown. Empty vector was used to normalize the amount of DNA used in each transfection. The blots shown are representative of three separate experiments. (C) HEK293T cells were transfected with 1.5 µg of FLAG-tagged wild type (WT) or mutant IFIT1 and 1.5 µg of FLAG-tagged IFIT3 or empty vector as indicated. After 24 h cell lysates were analyzed as in A. The graph on right shows the quantification of the IFIT1 protein expression relative to GAPDH probed as a loading control. Mean  $\pm$  the standard deviation of three biological repeats. (D) Reporter luciferase was measured as described in the Materials and Methods and expressed as the ratio of Fluc (cap0) over Nanoluc (cap1) signal, normalized to the empty vector control, and shown as the mean  $\pm$  the standard deviation of three biological repeats. Statistical analysis was performed using an unpaired, two-tailed Students t-test. *P*-values are indicated, and \* denotes statistical significance.

### IFIT assembly

After initially confirming that IFIT1, IFIT2 and IFIT3 interact in cell lysates in an RNA independent manner we used SEC-MALS to examine IFIT heterocomplex assembly pathways. Figure 7 shows schematic representations of each of the IFIT complexes reconstituted *in vitro* in this study.

Comparison of the different complexes assembled *in vitro* by differential scanning fluorimetry (Figure 2) reveals that although it is the least thermodynamically stable in isolation, the presence of IFIT3 enhances the stability of both IFIT1 and IFIT2. However, our results demonstrate that IFIT3 binds IFIT1 and IFIT2 in very different ways. The IFIT1 and IFIT3 interaction is rapid and oc-



**Figure 7.** Schematic representation of the IFIT complexes analyzed in this study. Cartoons depicting IFIT1 (yellow), IFIT2 (green) and IFIT3 (blue) complexes reconstituted *in vitro* from individually purified proteins. Weak interactions are indicated by reversible arrows. IFIT1 and IFIT2 structures and dimerization interactions have been characterized by X-ray crystallography (BioRxiv: <https://doi.org/10.1101/152850> and (30)). No experimentally derived structure for IFIT3 homo- or heterodimers are currently available. Therefore, IFIT3 and IFIT2:IFIT3 dimerisation, and IFIT1 heterooligomerization are modeled on the IFIT1 dimer (PDB: 5W5H) and IFIT2 dimer (PDB: 4G1T) crystal structures and supported by experimental evidence as discussed in the text. The association of IFIT1 and IFIT2 is less well defined as indicated by the question marks. A traffic light system is used to provide information on the biological roles of the different complexes.

curs at low temperatures. We identified a critical YxxxL motif present in both IFIT1 and IFIT3 that is essential for interaction of the two proteins. This motif is also responsible for the concentration-dependent homodimerization of IFIT1 previously reported (BioRxiv: <https://doi.org/10.1101/152850>) and confirmed here. The dynamic nature of the IFIT1:IFIT1 interaction likely accounts for the ability of IFIT3 to outcompete and form the thermodynamically more stable IFIT1:IFIT3 complex. In contrast, the formation of an IFIT2:IFIT3 complex from individually purified proteins is slow and requires energy, only being detected when incubated at 37°C. This is likely due to the domain swap nature of the interaction between IFIT2 homodimers that must be disrupted for IFIT3 to instead associate. Our SEC-MALS analysis of IFIT2:IFIT3 heterodimer assembly supports this model.

While the YxxxL motif is conserved in mouse *Ifit1b1*, *Ifit3* is truncated such that the YxxxL motif is absent (Supplementary Figure S5). In mice and other rodents, the *Ifit1b1* gene has been duplicated (6) and it is possible that these extra IFITs could compensate for the disrupted murine *Ifit1b1*–*Ifit3* interaction. This suggests species differences in the role of this motif, and in IFIT oligomerization in general, that must be considered when examining phenotypes of small animal models used to examine the impact of IFIT depletion. Importantly, the crystal structure of IFIT5 reveals that, although critical residues of the YxxxL motif are conserved, they are buried in an interface with a terminal helix not present in IFIT1 (8–10), explaining why IFIT5 does not interact with IFIT3 ((12) and Figure 1).

Our IFIT2:IFIT3 interaction studies also have important implications for our understanding of IFIT biology. IFIT2 dimerizes through a domain swap of three  $\alpha$ -helices that

constitute one and a half TPRs of the N-terminal domain (7) (Supplementary Figure S8A and shown schematically in Figure 7). The ability of IFIT3 to sequester IFIT2 into a heterodimeric form demonstrates that IFIT3 can disrupt the domain swapped architecture of IFIT2. It is therefore possible that IFIT3 could interact with IFIT2 in a similar domain swapped manner (modeled schematically in Figure 7, *top right*), consistent with TPRs 1–4 in the N terminus of IFIT2 being sufficient for the interaction (30). Overexpression of IFIT2 induces apoptosis (30,43), while co-expression with IFIT3 but not IFIT1 blocked this effect (30). Moreover, depletion of IFIT3 induced cell death in the U549 human carcinoma cell line, an effect potentiated by co-infection with dengue virus (44). Our data would suggest that the homodimeric form of IFIT2 may be responsible for this phenotype, and that co-expression of IFIT3 can mitigate this effect by disrupting IFIT2 dimerization. It is currently not clear why the cell would evolve such a mechanism for inducing programmed cell death. One potential hypothesis is that dysregulation of ISG induction, perhaps due to infection, could perturb the balance of IFIT2 and IFIT3, promoting cell death to restrict pathogen spread. Interestingly, a poly(AU) RNA binding activity of IFIT2 was localized to the dimer interface surfaces of the C-terminal domain that form a large positively charged pocket (Supplementary Figure S8B) (7). The electrostatic surface potential of an IFIT3 molecular model, based on the IFIT2 crystal structure, is shown in Supplementary Figure S8C. The IFIT3 model lacks a positively-charged nucleic acid binding surface like that of IFIT2. Together, our assembly analysis reveals novel details about IFIT interactions and indicates a central role for IFIT3 in IFIT complex assembly.

### Impact of oligomerization on IFIT1

*In vitro* reconstitution of the human IFIT heterocomplex enabled us to examine the impact of oligomerization on the cap0 mRNA binding and translation inhibition activity of IFIT1. We opted to use an RRL based translation inhibition assay system as this was previously used to demonstrate differential inhibitory effects of IFIT1 on mRNAs from parainfluenza virus 5 (23). IFIT3 and to a lesser extent the IFIT2:IFIT3 heterodimer enhanced the translation inhibition effect of IFIT1 on a ZV reporter mRNA (Figure 3). This effect was even more pronounced when a  $\beta$ -globin reporter mRNA, predicted to have very little secondary structure, was analyzed consistent with an emerging consensus that both the methylation state and structure at the 5' end of an mRNA can influence its susceptibility to IFIT1 inhibition (9,23,24). IFIT2 alone did not enhance translation inhibition by IFIT1 so it is likely that the effect observed in the presence of the IFIT2:IFIT3 complex is a result of IFIT1's binding to IFIT3 in the complex. This can explain why the effect of the IFIT1:IFIT2:IFIT3 complex in RRL was weaker than the IFIT1:IFIT3 complex.

While multiple cellular factors such as competing cap-binding proteins complicate analysis in lysates and cells, our *in vitro* mRNA binding assays reveal that IFIT3 enhances IFIT1 cap0 mRNA binding. When examined in our reverse transcriptase inhibition assays, apparent IFIT1 binding was much less efficient for the structured cap0-ZV reporter than

for the less structured  $\beta$ -globin mRNA and in fact on the ZV construct failed to reach saturation (Figure 4). This is not due to incomplete capping of the mRNA as saturation is possible when IFIT3 is present. Instead, it is more likely that the reverse transcriptase may remove a proportion of the bound IFIT1 as it proceeds in a 5' to 3' direction resulting in the production of a full-length signal even if IFIT1 was initially bound. We conclude therefore that IFIT3 stabilizes the interaction of IFIT1 with the cap0 mRNA in such a way that it is no longer removed by the reverse transcriptase consistent with its role in enhancing translation inhibition by IFIT1. Interestingly, there was no evidence of a shift in the IFIT-dependent toeprint to indicate that the other IFITs in the complex were interacting with the mRNA downstream of the IFIT1 cap0 binding cleft. IFIT5 changes conformation when transitioning between the apo- and RNA-bound state (8), positioning key residues for optimal RNA binding. The crystal structures of IFIT1 bound to different short RNAs show the protein is in a similar closed conformation as the RNA-bound structure of IFIT5 (9). It is therefore likely that IFIT1 cycles through a similar open/closed conformation to interact with RNA. Binding of IFIT3 may promote the closed conformation of IFIT1, stabilising its interaction with target RNAs.

Although the RRL system provides particular advantages for analysis of translational control by IFIT complexes it does not fully recapitulate the cellular environment that IFITs are exposed to. Using a cell-based system we observed that IFIT3 markedly stabilizes the expression of IFIT1 (Figure 6). This stabilization was dependent on the integrity of the YxxxL IFIT1:IFIT3 interaction motif. In contrast IFIT2 had a much smaller effect on IFIT1 expression in cells consistent with the stability of the different complexes observed in the *in vitro* differential scanning fluorimetry assays. Overexpression of wild type IFIT3, but not an IFIT1-binding defective mutant, also enhanced the translation inhibitory effect of IFIT1 on a model ZV reporter mRNA confirming that this interaction is functionally relevant. Therefore, through a single interaction surface IFIT3 stabilizes the expression and enhances the non-self mRNA binding activity of IFIT1.

IFIT1 puts pressure on viruses to maintain mechanisms for generating mRNAs with 5' ends that it cannot bind. Flaviviruses for example, which have genomic RNAs ~11000 bases in length, must dedicate a region of their limited genome to maintain a functional methyltransferase activity. The genomic 5' UTRs of alphaviruses, which lack a methyltransferase activity, also serve as replication promoters that function more efficiently when unstructured. However, they must forfeit optimal replication to maintain a stable stem structure at the very end of their genomes to avoid IFIT1 restriction (26,27). Together, our results provide novel details about IFIT interactions and how oligomerisation affects IFIT1 stability, non-self RNA binding and translation inhibition. Our reconstituted complexes provide a solid foundation for future molecular analysis of IFIT assembly and function.

### SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.



## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Janet Deane for providing access to equipment for SEC-MALS experiments and to George Katibah and Kathleen Collins for the gift of the IFIT1 expression plasmid.

## FUNDING

Royal Society/Wellcome Trust Sir Henry Dale Fellowship [202471/Z/16/Z]; Royal Society Research Grant [RG140708 to T.R.S.]; University of Cambridge, Department of Pathology PhD studentship (to H.V.M.); King's Scholarship from the Malaysian government (to X.Y.L.); Wellcome Trust PhD studentship [105389/Z/14/Z to T.J.S.]; CAPES Computational Biology [23038.010048/2013-27 to R.C.F. and D.S.M.]; Academy of Medical Sciences/UK [NAF004/1005 to D.S.M.]; SCG is a Sir Henry Dale Fellow [098406/Z/12/Z] co-funded by the Wellcome Trust and Royal Society. Funding for open access charge: Wellcome Trust Sir Henry Dale Fellowship [202471/Z/16/Z to T.S.].

*Conflict of interest statement.* None declared.

## REFERENCES

- Randall, R.E. and Goodbourn, S. (2008) Interferons and viruses: An interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.*, **89**, 1–47.
- Schoggins, J.W., Wilson, S.J., Panis, M., Murphy, M.Y., Jones, C.T., Bieniasz, P. and Rice, C.M. (2011) A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature*, **472**, 481–485.
- Liu, Y., Zhang, Y.B., Liu, T.K. and Gui, J.F. (2013) Lineage-specific expansion of IFIT gene family: an insight into coevolution with IFN gene family. *PLoS One*, **8**, e66859.
- Zhou, X., Michal, J.J., Zhang, L., Ding, B., Lunney, J.K., Liu, B. and Jiang, Z. (2013) Interferon induced IFIT family genes in host antiviral defense. *Int. J. Biol. Sci.*, **9**, 200–208.
- Grandvaux, N., Servant, M.J., TenOever, B., Sen, G.C., Balachandran, S., Barber, G.N., Lin, R. and Hiscott, J. (2002) Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J. Virol.*, **76**, 5532–9.
- Daugherty, M.D., Schaller, A.M., Geballe, A.P. and Malik, H.S. (2016) Evolution-guided functional analyses reveal diverse antiviral specificities encoded by ifit1 genes in mammals. *Elife*, **5**, e14228.
- Yang, Z., Liang, H., Zhou, Q., Li, Y., Chen, H., Ye, W., Chen, D., Fleming, J., Shu, H. and Liu, Y. (2012) Crystal structure of ISG54 reveals a novel RNA binding structure and potential functional mechanisms. *Cell Res.*, **22**, 1328–1338.
- Abbas, Y.M., Pichlmair, A., Górna, M.W., Superti-Furga, G. and Nagar, B. (2013) Structural basis for viral 5'-PPP-RNA recognition by human IFIT proteins. *Nature*, **494**, 60–64.
- Abbas, Y.M., Laudenbach, B.T., Martínez-Montero, S., Cencic, R., Habjan, M., Pichlmair, A., Damha, M.J., Pelletier, J. and Nagar, B. (2017) Structure of human IFIT1 with capped RNA reveals adaptable mRNA binding and mechanisms for sensing N1 and N2 ribose 2'-O methylations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **114**, E2106–E2115.
- Katibah, G.E., Lee, H.J., Huizar, J.P., Vogan, J.M., Alber, T. and Collins, K. (2013) tRNA binding, structure, and localization of the human interferon-induced protein IFIT5. *Mol. Cell*, **49**, 743–750.
- Feng, F., Yuan, L., Wang, Y.E., Crowley, C., Lv, Z., Li, J., Liu, Y., Cheng, G., Zeng, S. and Liang, H. (2013) Crystal structure and nucleotide selectivity of human IFIT5/ISG58. *Cell Res.*, **23**, 1055–1058.
- Allan, R.K. and Ratajczak, T. (2011) Versatile TPR domains accommodate different modes of target protein recognition and function. *Cell Stress Chaperones*, **16**, 353–367.
- Pichlmair, A., Lassnig, C., Eberle, C.-A., Górna, M.W., Baumann, C.L., Burkard, T.R., Bürckstümmer, T., Stefanovic, A., Krieger, S., Bennett, K.L. *et al.* (2011) IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA. *Nat. Immunol.*, **12**, 624–630.
- Kumar, P., Sweeney, T.R., Skabkin, M.A., Skabkina, O.V., Hellen, C.U.T. and Pestova, T.V. (2014) Inhibition of translation by IFIT family members is determined by their ability to interact selectively with the 5'-terminal regions of cap0-, cap1- and 5'ppp-mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 3228–3245.
- Habjan, M., Hubel, P., Lacerda, L., Benda, C., Holze, C., Eberl, C.H., Mann, A., Kindler, E., Gil-Cruz, C., Ziebuhr, J. *et al.* (2013) Sequestration by IFIT1 impairs translation of 2'-O-unmethylated capped RNA. *PLoS Pathog.*, **9**, e1003663.
- Kimura, T., Katoh, H., Kayama, H., Saiga, H., Okuyama, M., Okamoto, T., Umemoto, E., Matsuura, Y., Yamamoto, M. and Takeda, K. (2013) Ifit1 inhibits Japanese encephalitis virus replication through binding to 5' capped 2'-O unmethylated RNA. *J. Virol.*, **87**, 9997–10003.
- Li, S.-H., Dong, H., Li, X.-F., Xie, X., Zhao, H., Deng, Y.-Q., Wang, X.-Y., Ye, Q., Zhu, S.-Y., Wang, H.-J. *et al.* (2013) Rational design of a flavivirus vaccine by abolishing viral RNA 2'-O methylation. *J. Virol.*, **87**, 5812–5819.
- Daffis, S., Szretter, K.J., Schriewer, J., Li, J., Youn, S., Errett, J., Lin, T.Y., Schneller, S., Zust, R., Dong, H. *et al.* (2010) 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature*, **468**, 452–456.
- Szretter, K.J., Daniels, B.P., Cho, H., Gainey, M.D., Yokoyama, W.M., Gale, M., Virgin, H.W., Klein, R.S., Sen, G.C. and Diamond, M.S. (2012) 2'-O methylation of the viral mRNA cap by West Nile virus evades Ifit1-dependent and -independent mechanisms of host restriction in vivo. *PLoS Pathog.*, **8**, e1002698.
- Züst, R., Dong, H., Li, X.F., Chang, D.C., Zhang, B., Balakrishnan, T., Toh, Y.X., Jiang, T., Li, S.H., Deng, Y.Q. *et al.* (2013) Rational design of a live attenuated dengue vaccine: 2'-O-methyltransferase mutants are highly attenuated and immunogenic in mice and macaques. *PLoS Pathog.*, **9**, e1003521.
- Züst, R., Cervantes-Barragan, L., Habjan, M., Maier, R., Neuman, B.W., Ziebuhr, J., Szretter, K.J., Baker, S.C., Barchet, W., Diamond, M.S. *et al.* (2011) Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat. Immunol.*, **12**, 137–143.
- Menachery, V.D., Yount, B.L., Josset, L., Gralinski, L.E., Scobey, T., Agnihothram, S., Katze, M.G. and Baric, R.S. (2014) Attenuation and restoration of SARS-CoV mutant lacking 2' O methyltransferase activity. *J. Virol.*, **88**, 4251–4264.
- Young, D.F., Andrejeva, J., Li, X., Inesta-Vaquera, F., Dong, C., Cowling, V.H., Goodbourn, S. and Randall, R.E. (2016) Human IFIT1 inhibits mRNA translation of rubulaviruses but not other members of the Paramyxoviridae family. *J. Virol.*, **90**, 9446–9456.
- Menachery, V.D., Gralinski, L.E., Mitchell, H.D., Dinnon, K.H. III, Leist, S.R., Yount, B.L. Jr, Graham, R.L., McAnarney, E.T., Stratton, K.G., Cockrell, A.S. *et al.* (2017) Middle east respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein 16 is necessary for interferon resistance and viral pathogenesis. *mSphere*, **2**, e00346-17.
- Dubin, D.T., Stollar, V., Hsueh, C.C., Timko, K. and Guild, G.M. (1977) Sindbis virus messenger RNA: the 5'-termini and methylated residues of 26 and 42 S RNA. *Virology*, **77**, 457–470.
- Hyde, J.L., Gardner, C.L., Kimura, T., White, J.P., Liu, G., Trobaugh, D.W., Huang, C., Tonelli, M., Paessler, S., Takeda, K. *et al.* (2014) A viral RNA structural element alters host recognition of nonself RNA. *Science*, **343**, 783–787.
- Reynaud, J.M., Kim, D.Y., Atasheva, S., Rasaloukaya, A., White, J.P., Diamond, M.S., Weaver, S.C., Frolova, E.I. and Frolov, I. (2015) IFIT1 differentially interferes with translation and replication of alphavirus genomes and promotes induction of type I interferon. *PLoS Pathog.*, **11**, e1004863.
- Guo, J., Hui, D.J., Merrick, W.C. and Sen, G.C. (2000) A new pathway of translational regulation mediated by eukaryotic initiation factor 3. *EMBO J.*, **19**, 6891–6899.
- Saikia, P., Fensterl, V. and Sen, G.C. (2010) The inhibitory action of P56 on select functions of E1 mediates interferon's effect on human Papillomavirus DNA replication. *J. Virol.*, **84**, 13036–13039.

30. Stawowczyk, M., Van Scoy, S., Kumar, K.P. and Reich, N.C. (2011) The interferon stimulated gene 54 promotes apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **286**, 7257–7266.
31. Chavali, P.L., Stojic, L., Meredith, L.W., Joseph, N., Nahorski, M.S., Sanford, T.J., Sweeney, T.R., Krishna, B.A., Hosmillo, M., Firth, A.E. *et al.* (2017) Neurodevelopmental protein Musashi-1 interacts with the Zika genome and promotes viral replication. *Science*, **357**, 83–88.
32. Niesen, F.H., Berglund, H. and Vedadi, M. (2007) The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat. Protoc.*, **2**, 2212–2221.
33. Emmott, E. and Goodfellow, I. (2014) Identification of protein interaction partners in mammalian cells using SILAC-immunoprecipitation quantitative proteomics. *J. Vis. Exp.*, **89**, e51656.
34. Tyanova, S., Temu, T., Carlson, A., Sinitcyn, P., Mann, M. and Cox, J. (2015) Visualization of LC-MS/MS proteomics data in MaxQuant. *Proteomics*, **15**, 1453–1456.
35. Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M.Y., Geiger, T., Mann, M. and Cox, J. (2016) The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods*, **13**, 731–740.
36. Dolinsky, T.J., Czodrowski, P., Li, H., Nielsen, J.E., Jensen, J.H., Klebe, G. and Baker, N.A. (2007) PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic Acids Res.*, **35**, W522–W525.
37. Dolinsky, T.J., Nielsen, J.E., McCammon, J.A. and Baker, N.A. (2004) PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.*, **32**, W665–W667.
38. Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J. and McCammon, J.A. (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 10037–10041.
39. Rabbani, M.A.G., Ribaud, M., Guo, J.-T. and Barik, S. (2016) Identification of interferon-stimulated gene proteins that inhibit human parainfluenza virus type 3. *J. Virol.*, **90**, 11145–11156.
40. Rifo, R.S., Ricci, E.P., Décimo, D., Moncorgé, O. and Ohlmann, T. (2007) Back to basics: the untreated rabbit reticulocyte lysate as a competitive system to recapitulate cap/poly(A) synergy and the selective advantage of IRES-driven translation. *Nucleic Acids Res.*, **35**, e121.
41. Alvarez, D.E., De Lella Ezcurra, A.L., Fucito, S. and Gamarnik, A.V. (2005) Role of RNA structures present at the 3' UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology*, **339**, 200–212.
42. Zhao, L., Kroenke, C.D., Song, J., Piwnicka-Worms, D., Ackerman, J.J.H. and Neil, J.J. (2008) Intracellular water-specific MR of microbead-adherent cells: The HeLa cell intracellular water exchange lifetime. *NMR Biomed.*, **21**, 159–164.
43. Reich, N.C. (2013) A death-promoting role for ISG54/IFIT2. *J. Interferon Cytokine Res.*, **33**, 199–205.
44. Hsu, Y.L., Shi, S.F., Wu, W.L., Ho, L.J. and Lai, J.H. (2013) Protective roles of interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT3) in dengue virus infection of human lung epithelial cells. *PLoS One*, **8**, e79518.

# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## Genome-wide analyses reveal a highly conserved Dengue virus envelope peptide which is critical for virus viability and antigenic in humans

Received: 13 July 2016

Accepted: 14 October 2016

Published: 02 November 2016

Renata C. Fleith<sup>1</sup>, Francisco P. Lobo<sup>2</sup>, Paula F. dos Santos<sup>1</sup>, Mariana M. Rocha<sup>1</sup>, Juliano Bordignon<sup>3</sup>, Daisy M. Strottmann<sup>3</sup>, Daniel O. Patricio<sup>1</sup>, Wander R. Pavanelli<sup>4</sup>, Maria Lo Sarzi<sup>5</sup>, Claudia N. D. Santos<sup>3</sup>, Brian J. Ferguson<sup>6</sup> & Daniel S. Mansur<sup>1</sup>

Targeting regions of proteins that show a high degree of structural conservation has been proposed as a method of developing immunotherapies and vaccines that may bypass the wide genetic variability of RNA viruses. Despite several attempts, a vaccine that protects evenly against the four circulating *Dengue virus* (DV) serotypes remains elusive. To find critical conserved amino acids in dengue viruses, 120 complete genomes of each serotype were selected at random and used to calculate conservation scores for nucleotide and amino acid sequences. The identified peptide sequences were analysed for their structural conservation and localisation using crystallographic data. The longest, surface exposed, highly conserved peptide of Envelope protein was found to correspond to amino acid residues 250 to 270. Mutation of this peptide in DV1 was lethal, since no replication of the mutant virus was detected in human cells. Antibodies against this peptide were detected in DV naturally infected patients indicating its potential antigenicity. Hence, this study has identified a highly conserved, critical peptide in DV that is a target of antibodies in infected humans.

Dengue is a mosquito-borne disease caused by a group of viruses collectively known as *Dengue virus*, belonging to the *Flaviviridae* family. It affects nearly 390 million people every year worldwide<sup>1</sup> with symptoms ranging from mild fever to severe shock syndrome. Although recently different vaccination strategies have achieved reasonable levels of protection, a vaccine that protects uniformly against the circulating serotypes is not available<sup>2</sup>. This is partly due to the high variability among these viruses, which can lead to partially protective immune responses and antibody dependent enhancement (ADE) of infection when non-neutralising antibodies facilitate virus entry by Fc gamma receptors<sup>3–6</sup>.

Dengue viruses (DV) are enveloped, ssRNA viruses with a single open reading frame encoding three structural and seven non-structural proteins<sup>7</sup>. The genetic variance amongst DV results in diverse immune responses such that they are classified into four serogroups (DV1–4) based on antigenic diversity<sup>8,9</sup>. Although mutations occur randomly in the genome, viral proteins show a combination of regions that are permissive to multiple mutations, which enable immune evasion through antigenic variation, and regions where amino acid residues critical for structure and viral fitness are conserved<sup>10</sup>. In general, regions exposed to the immune system are prone to variation, however, even the envelope (E) protein, the main antigenic determinant on the virion, retains highly conserved cryptic peptides<sup>10,11</sup>. It has been demonstrated that those conserved regions in structural proteins have an important role in viral fitness and might be targets of broadly neutralising antibodies in viruses such as HIV

<sup>1</sup>Laboratory of Immunobiology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil. <sup>2</sup>Department of General Biology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. <sup>3</sup>Laboratory of Molecular Virology, Instituto Carlos Chagas, Curitiba, Brazil. <sup>4</sup>Department of Pathology, Universidade Estadual de Londrina, Brazil. <sup>5</sup>Secretary for Health, Cambé, Brazil. <sup>6</sup>Department of Pathology, University of Cambridge, Cambridge, UK. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.S.M. (email: daniel.mansur@ufsc.br)

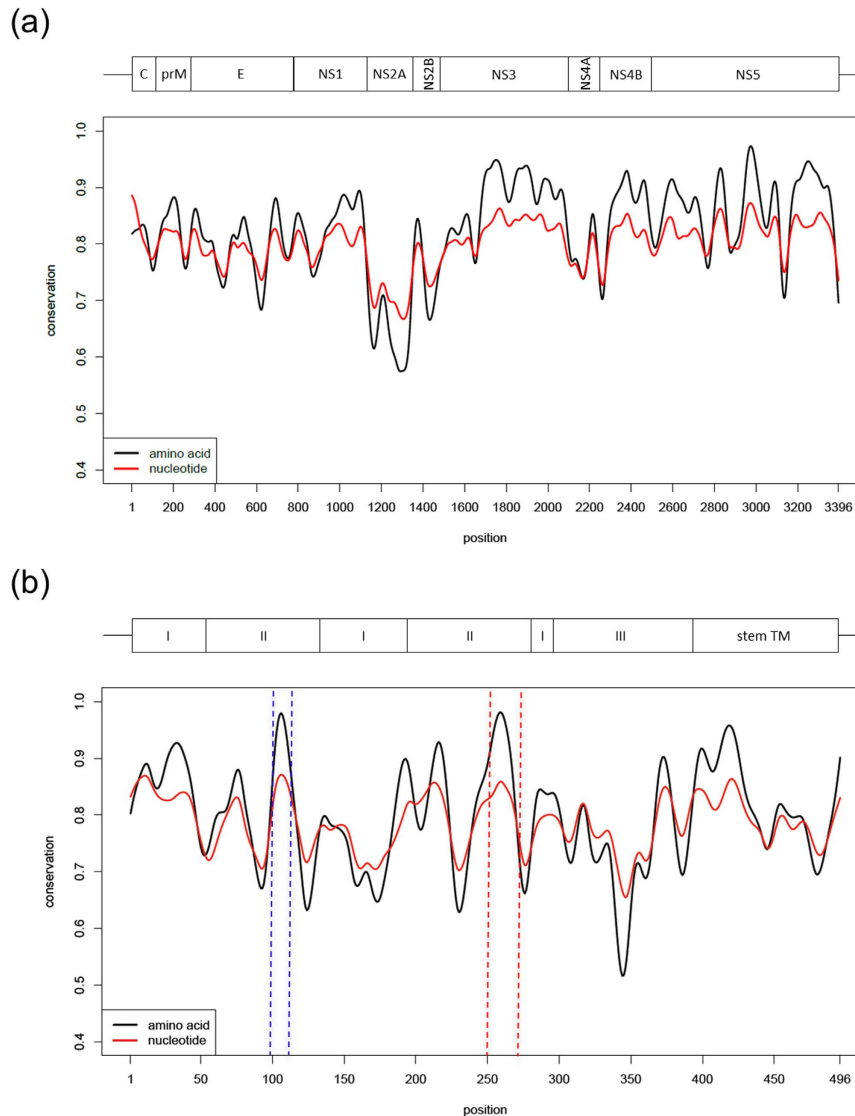
and Influenza A virus. For instance, although the majority of the protective immune response against influenza virus is provided by antibodies against the head of haemagglutinin (HA), new classes of multi-neutralising antibodies have been isolated that target the highly conserved HA stalk region<sup>12–17</sup>. Antibodies with similar properties have also been found that target functionally conserved regions of HIV glycoprotein 120<sup>18–22</sup>. In both cases these regions are being evaluated as vaccine targets and the antibodies elicited have been used to study immunoprophylaxis strategies.

In this context, the sequence conservation of DV was evaluated, with the aim of identifying conserved regions in the E protein. All complete genome sequences available on access date for DV4 in NCBI (120 sequences) were analysed along with the same number of genomes for each other DV serotype, that were randomly selected through their NCBI sorting numbers (access on November, 26, 2013). This unbiased dataset, comprising 480 sequences (all sequence IDs in Supplementary Data) allowed ample representation of the known variability observed in this taxonomic unit. The 480 GenBank files obtained in the previous step were processed using custom PERL scripts written using BioPerl module<sup>23</sup> to extract protein and coding sequences. MUSCLE software was then used to align protein sequences with default parameters and these alignments, together with CDS data, were used to create a codon alignment. For both protein and codon alignments conservation scores were calculated based on the ratio of the count for the most frequent character (amino acids or nucleotides plus gaps) at a given position and the total number of sequences evaluated (480). To detect local conserved regions the fitting of a smooth curve to protein and codon conservation score data was carried out using `smooth.spline` function implemented in R language with smoothing parameter set to 0.4. The conservation scores varied from 0.4 to 1 (scores for all peptides are available in Supplementary Table), where a score closer to 1 corresponds to a higher conservation of the region across all analysed sequences (Fig. 1a). Although structural proteins are more variable in general, some regions in E demonstrated to be conserved as the non-structural proteins average. To analyse the E protein with greater resolution we repeated this procedure with its sequences separated from the full genome. This revealed two main peaks of conservation on the envelope protein (Fig. 1b). Further analyses revealed that the first of these sites is the fusion peptide. This peptide was first described in 1989, comprises a hydrophobic loop highly conserved in all flaviviruses, that is normally buried at the E dimeric form and becomes exposed at the tip of the fusogenic trimer (Fig. 2a,b)<sup>24–26</sup>. The second most significant peak of conservation was also mapped into domain II of the E protein and comprised residues 250–270 (polyprotein residues 530–551). Internally located in pre-fusion E dimer, covering the final residues of the ij loop, the  $\alpha$ B helix and the beginning of the kl loop, the structure of this peptide (from now  $E_{250-270}$ ) was visualised using available structures of DV E proteins in pre- and post-fusion forms (Fig. 2a,b).  $E_{250-270}$  is the longest conserved peptide that is solvent-exposed in the E protein trimer, which is responsible for fusion of the viral envelope to the host membrane (Fig. 2b). Comparison of the localisation and structure of this DV peptide with those of other flavivirus E proteins shows its cross-species conservation (Fig. 2a,b). To visualise this conservation at the amino-acid sequence level, WebLogo was used<sup>27</sup> to create a representation for the region spanning the peptide (columns 530–551). WebLogo was run using standard parameters and considering equiprobable amino acid frequencies. The same strategy was employed to compare the conservation of  $E_{250-270}$  in other flaviviruses. 120 sequences of *Japanese encephalitis virus* (JEV), 120 of *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV), 120 of *West Nile virus* (WNV), were selected randomly from GenBank as well as the 70 sequences of *Yellow fever virus* (YFV) and 63 of *Zika virus* (ZKV), available, aligned with MUSCLE and visualized all together with WebLogo. Sixteen out of 21 amino acids in this peptide were 100% conserved in every DV sequence evaluated, being DV4 the most divergent among the four serotypes. When compared to other Flaviviruses at least seven amino acids from  $E_{250-270}$  are highly conserved (V250, L253, G254, Q256, G258, L264, G266; Fig. 2c and Supplementary Figure). These data indicate that  $E_{250-270}$  is conserved both at the sequence and structural levels across multiple flaviviruses.

As there is no specific reported function associated with the region where  $E_{250-270}$  is located in DV, to establish the significance of this highly conserved peptide, a DV was generated with a mutated  $E_{250-270}$  peptide (Fig. 3a). Several hydrophobic side chains were removed by mutation of five amino acid residues to alanine. These changes were designed to remove some of the most conserved side chains across all E protein sequences whilst minimising structural disruption across the peptide. Prediction of the effect of these substitutions on the three-dimensional structure of the envelope protein was carried out with Modeller<sup>28</sup> using the complete E protein x-ray crystallographic structure as a template<sup>29</sup> (Fig. 3b). PROCHECK<sup>30</sup>, WHAT IF<sup>31</sup> and Verify3D<sup>32</sup> algorithms were used to ensure the satisfaction of stereochemical restraints indicating that the amino acid substitutions could be tolerated by the E protein without gross structural disruption. More studies will be necessary to fully evaluate the impact of these mutations on E protein biology.

An infectious clone of DV1, strain BR/90, was used to construct the mutant virus<sup>33</sup>. Firstly, three silent nucleotide changes were inserted to add restriction enzyme cleavage sites (C368T, T1663G, G1822C, based on GenBank AF226685.2) and then alanine substitutions were introduced in E protein amino acids 250–253 and 255 by gene synthesis and conventional cloning (Fig. 3a). The resultant infectious clone, named Conserved Surface Mutant 1 (CSMut1), was fully sequenced and no modifications other than those desired were observed. CSMut1 and matching wild type (WT) were *in vitro* transcribed using MegaScript T7 synthesis kit (Ambion), supplemented with m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G RNA Cap Structure Analog (New England Biolabs). RNA was purified (RNeasy Mini Kit, Qiagen), and transfected into Huh7.5 cells with Lipofectin (Invitrogen). Cells and supernatant were recovered at indicated hours post transfection (h.p.t.) and the RNA extracted using RNeasy Mini Kit or QIAamp Viral RNA Mini Kit, respectively (both Qiagen). Using RT-qPCR for non-structural protein 5 (NS5) mRNA (5' GCAAACATCTTCAGGGGAAGT 3', 5' GCTCCCGTACCTCTCCTACC 3'), only decreasing quantities of CSMut1 NS5 transcript were observed in both cell associated RNA or culture supernatant, suggesting an impaired ability of this mutant virus to replicate (Fig. 3c). The WT virus, on the other hand retained detectable levels of cell-associated DV RNA and increasing amounts of DV RNA in the culture supernatant consistent with efficient



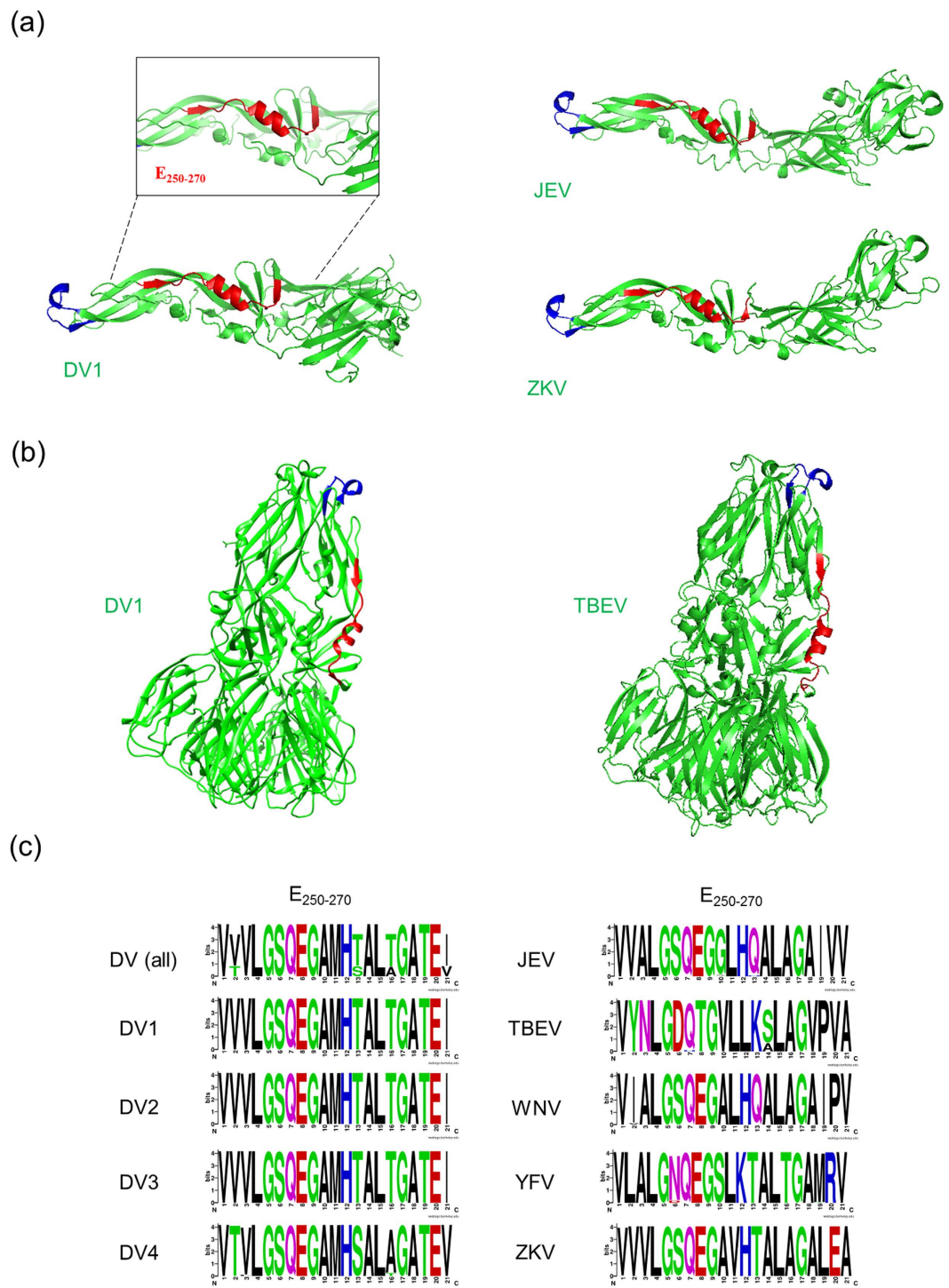


**Figure 1. Genome-wide analysis of DV conserved sites.** Conservation profile of nucleotides (red line) and amino acids (black line) of 480 dengue coding sequences (CDS) (a) and their respective envelope proteins (b). The “x” axis represents the position of amino acid residues in the DV CDS (a) or Envelope protein (b) and “y” axis represents the conservation score, where 1 indicates the highest conservation. The two most highly conserved peptides in the envelope protein (b) are the fusion peptide (residues E<sub>99–112</sub>, highlighted in the blue box) and E<sub>250–270</sub> (red box). Above “a” the schematic DV CDS. C: capsid; prM: membrane precursor; E: envelope; NS: non-structural. Above “b” the scheme of E protein domains (I, II, I), the stem segment and transmembrane anchor (TM).

replication with the expected kinetics for this virus (Fig. 3c). Furthermore, CSMut1 growth was not detected by plaque assay (data not shown).

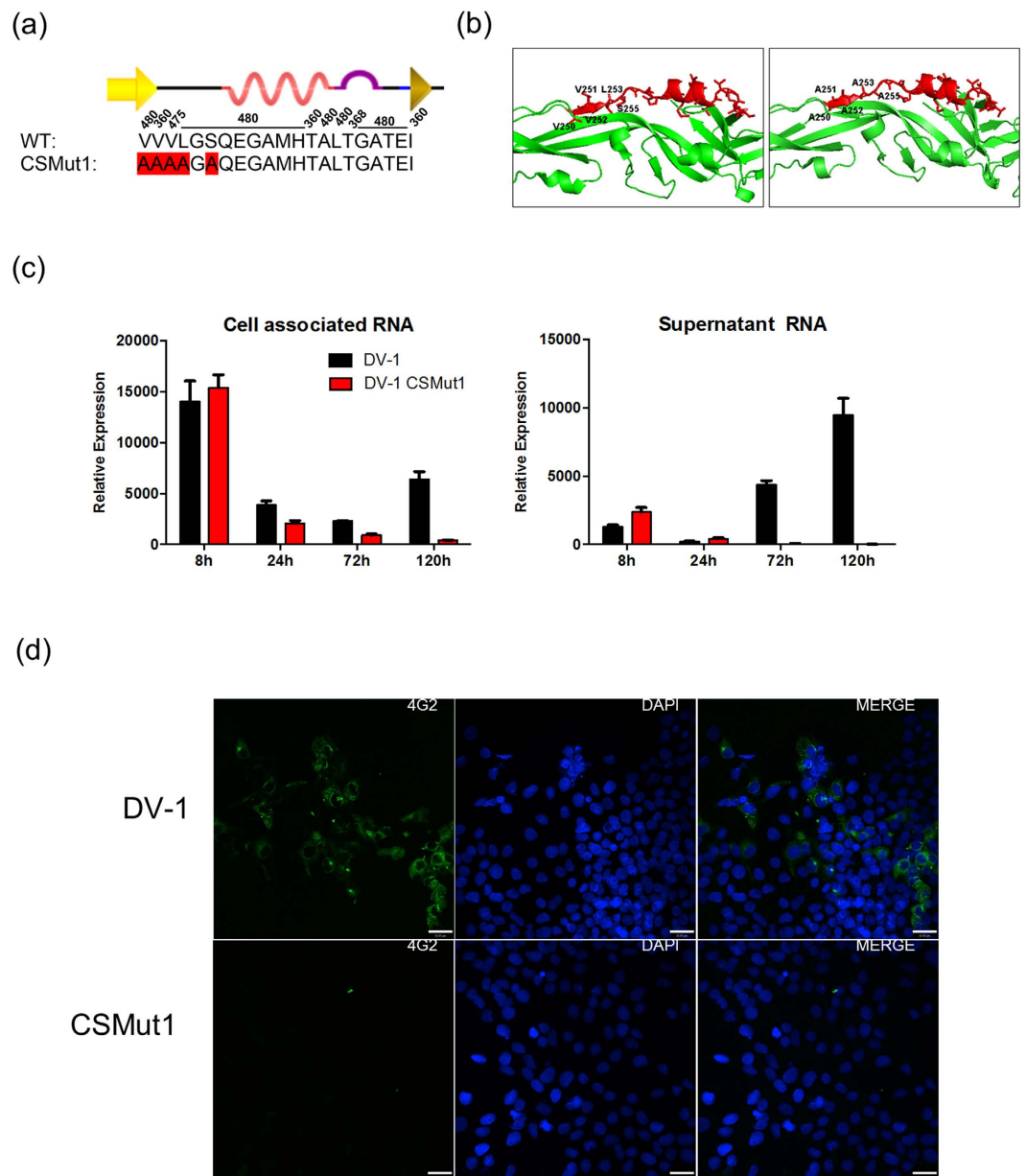
The impact of CSMut1 on DV1 was also assessed by immunofluorescence for the viral envelope antigen in Huh7.5 cells<sup>34</sup>. Briefly, Huh7.5 cells were transfected with wild type or CSMut1 RNA using Lipofectin, fixed after 120 hours, and stained with monoclonal anti-E antibody (4G2 - ATCC® HB-112™), using Alexa Fluor 488 rabbit anti-mouse IgG (H + L, Life Technologies) as a secondary antibody, and DAPI counter stain (Molecular Probes). In agreement with RNA detection (Fig. 3c), E protein expression was not observed in cells transfected with CSMut1 RNA, suggesting that the mutant virus was not able to spread in Huh7.5 cells (Fig. 3d). To understand whether the impairment caused by CSMut1 was restricted to the mammalian host, similar experiments to those described above were performed in a C6/36 *Aedes albopictus* cell line. The results were remarkably similar to those in human cells (data not shown), suggesting that the defect caused by the mutations were not due to a host specific factor.

These data show that, despite the great diversity among the serotypes of dengue viruses there are at least two polypeptides within its main antigenic determinant that are highly conserved at both the sequence and structural levels. These two regions were also reported during analysis of pan-DV sequences as potential immune-relevant



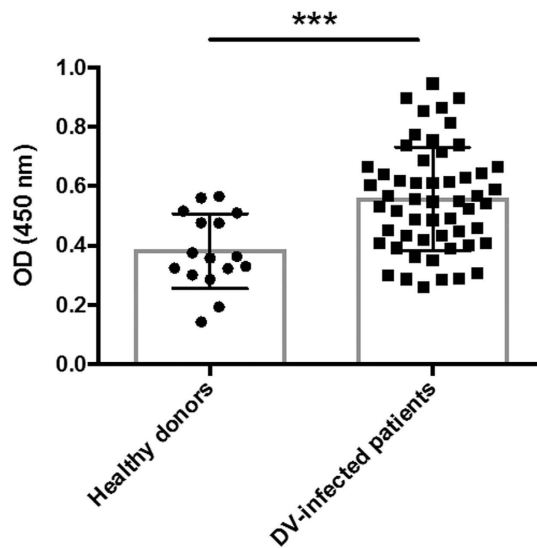
**Figure 2.** E<sub>250-270</sub> sequence and structural conservation in different flaviviruses. (a) The fusion peptide (in blue) and E<sub>250-270</sub> (in red) are highlighted in envelope monomer structures of DV1, JEV and ZKV and (b) in the trimeric form of DV1 and TBEV. PDB ids: 4GSX, 3P54, 5JHM and 1URZ. (c) WebLogo schematic showing the amino acid composition per site in E<sub>250-270</sub> of DV and other flavivirus. Polar amino acids (G,S,T,Y,C) are colored in green, neutral (Q,N) in purple, basic (K,R,H) in blue, acidic (D,E) in red and hydrophobic (A,V,L,I,P,W,F,M) in black.

T cell determinants<sup>11</sup>. These peptides are generally buried in dimeric E form, and are thought to become fully exposed only in the E fusogenic form of mature virion<sup>35</sup>. This assumption suggests that once hidden to the humoral immune response, these regions remain conserved due to the absence of selective pressure from host immunity. To test this, the presence of antibodies against E<sub>250-270</sub> was assessed in patient sera. Serum samples



**Figure 3. CSMut1 design, modelling and infectivity.** (a) The wild type  $E_{250-270}$  and CSMut1 sequences are shown with mutated amino acids highlighted in red. (b) Wild type (on the left) and CSMut1 model (on the right) with  $E_{250-270}$  in red. (c) Relative quantification of DV NS5 RNA in Huh7.5 cells transfected with wild type and CSMut1 genomes at different time points. Cell associated RNA is shown in the left panel and supernatant extracted RNA in the right panel. (d) DV E-protein immunofluorescence staining of WT and CSMut1 120 hours after genome transfection in Huh7.5 cells (bars correspond to  $32\mu\text{M}$ ).

were obtained from an outbreak in Paraná state, Brazil (2013) according to the approved guidelines of Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz), within Instituto Carlos Chagas (Curitiba, Brazil). Experiments involving human subjects were approved by the committee of ethics and research (Comitê de Ética e Pesquisa – CEP) of Fiocruz-RJ under protocol 617/11. Informed consent was obtained from all donors. 70 serum samples were evaluated for DV infection (by NS1, IgM and IgG ELISAs). Samples corresponded to 54 DV1 sera designated positive by at least one assay and from patients in the acute phase of disease (up to the seventh day after the onset of symptoms) and 16 control sera from non-infected individuals. An indirect ELISA protocol was used to identify anti- $E_{250-270}$  IgG antibodies<sup>36</sup> (Fig. 4). Briefly, plates were coated with synthetic  $E_{253-270}$  peptide (it was not possible to solubilise a full length  $E_{250-270}$  peptide), blocked and incubated with serum samples. An HRP-linked, goat anti-human IgG (H + L, Invitrogen) was used as secondary antibody, and the plates were treated with *o*-phenylenediamine in citrate phosphate buffer containing 30% hydrogen peroxide. These ELISA data demonstrated this peptide to be antigenic in human natural infections, despite its predicted buried nature in the dimeric E form. One explanation for the development of antibodies to this site would be the dynamic movement of the virus particle, described

**E<sub>250-270</sub> antibodies in human sera**

**Figure 4.** E<sub>250-270</sub> antigenicity. Presence of antibodies against E<sub>250-270</sub> analysed by ELISA. 54 serum samples positive for DV infection and 16 from non-infected controls. Absorbance values read at 450nm. \*\*\*p = 0.0004, error bars are  $\pm$  standard deviation.

as ‘breathing’<sup>37,38</sup>. In agreement, Ramanathan, B. *et al.*<sup>39</sup> predict the peptide as being a potential linear epitope, and the Rey group described a broadly neutralising monoclonal antibody that interacts with the first valine of E<sub>250-270</sub><sup>40</sup>. Therefore, two other reasons for conservation could be explored i) structure and ii) function. Modelling of the mutant E protein did not show evidence of structure destabilisation, even though the mutated residues were conserved across almost all analysed virus sequences, suggesting that E<sub>250-270</sub> might have a functional role in the DV life cycle. In agreement with our data other groups suggest that amino acids within this region are key to the E protein biology. Accordingly, a single substitution at V251A moderately restricts DV replication and viral particle production in C6/36 and Vero cells, and reduces viral E protein detection by immunofluorescence in C6/36 and BHK-21 transfected cells<sup>41</sup>. Moreover, it was demonstrated that G266 and I270 substitutions to tryptophan affected viral replication in mammals and insect cells, and the I270W reduced fusion<sup>42</sup>. In contrast the study of Christian *et al.* using replicons with random point mutations in E protein did not verify significant differences in E expression, budding and infectivity when mutating residues of the peptide’s N-terminus (such as V251, and others mutated in CSMut1), or residues 266 and 270<sup>43</sup>. This could be related due to the amino acid utilized in substitutions, restrictions of the replicon’s method, and the contribution of multiple mutations as present in CSMut1. On the other hand, they suggests that other residues in peptide’s C-terminus, M258, H259 and A265, could have important role in fusion and, if mutated, greatly reduce or practically abolish viral replication<sup>43</sup>. These residues could form latch contacts with M proteins preventing the premature triggering of E protein. M258 forms with other residues a hydrophobic path that appears to be important to interact with F400 of E stem region in DV1 trimer, and histidine protonation, among them H259, enable the dissociation of E and M protein contacts<sup>29,43</sup>. The undetectable level of replication observed to CSMut1 demonstrated the importance of E<sub>250-270</sub> to viral infectivity and further investigations should be done to elucidate the exact function this conserved peptide. Moreover the detection of antibodies anti E<sub>250-270</sub> in natural infected patients point the possibility to the use of these peptide as immunological target, as recently shown<sup>36</sup>.

Our strategy enables identification of the most conserved regions in DV genomes, other flavivirus such as ZKV, and also the rational designing of mutant viruses to investigate the importance of these regions in viral fitness and infectivity. As carried out for E<sub>250-270</sub> peptide, a systematic analysis of other highly conserved regions could suggest potential immunological/pharmacologic target for dengue treatment and control. Moreover, these knowledge can be extrapolated for other ssRNA genome viruses, and contribute to understand the evolution of their cryptic conserved peptides.

## References

1. Bhatt, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature* **496**, 504–507, doi: 10.1038/nature12060 (2013).
2. Schwartz, L. M., Halloran, M. E., Durbin, A. P. & Longini, I. M. Jr. The dengue vaccine pipeline: Implications for the future of dengue control. *Vaccine* **33**, 3293–3298, doi: 10.1016/j.vaccine.2015.05.010 (2015).
3. Sabin, A. B. Research on dengue during World War II. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **1**, 30–50 (1952).
4. Halstead, S. B. & O’Rourke, E. J. Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature* **265**, 739–741 (1977).
5. Dejnirattisai, W. *et al.* Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science* **328**, 745–748, doi: 10.1126/science.1185181 (2010).



6. Goncalvez, A. P., Engle, R. E. St., Claire, M., Purcell, R. H. & Lai, C. J. Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection *in vitro* and *in vivo* and strategies for prevention. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 9422–9427, doi: 10.1073/pnas.0703498104 (2007).
7. Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R. & Rice, C. M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual review of microbiology* **44**, 649–688, doi: 10.1146/annurev.mi.44.100190.003245 (1990).
8. Kuno, G., Chang, G. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N. & Cropp, C. B. Phylogeny of the genus Flavivirus. *Journal of virology* **72**, 73–83 (1998).
9. Holmes, E. C. & Twiddy, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **3**, 19–28 (2003).
10. Drake, J. W. & Holland, J. J. Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 13910–13913 (1999).
11. Khan, A. M. *et al.* Conservation and variability of dengue virus proteins: implications for vaccine design. *PLoS neglected tropical diseases* **2**, e272, doi: 10.1371/journal.pntd.0000272 (2008).
12. Ekiert, D. C. *et al.* A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science* **333**, 843–850, doi: 10.1126/science.1204839 (2011).
13. Corti, D. *et al.* A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science* **333**, 850–856, doi: 10.1126/science.1205669 (2011).
14. Wang, T. T. *et al.* Broadly protective monoclonal antibodies against H3 influenza viruses following sequential immunization with different hemagglutinins. *PLoS pathogens* **6**, e1000796, doi: 10.1371/journal.ppat.1000796 (2010).
15. Wang, T. T. *et al.* Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 18979–18984, doi: 10.1073/pnas.1013387107 (2010).
16. Sui, J. *et al.* Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nature structural & molecular biology* **16**, 265–273, doi: 10.1038/nsmb.1566 (2009).
17. Tharakaraman, K., Subramanian, V., Cain, D., Sasisekharan, V. & Sasisekharan, R. Broadly neutralizing influenza hemagglutinin stem-specific antibody CR8020 targets residues that are prone to escape due to host selection pressure. *Cell host & microbe* **15**, 644–651, doi: 10.1016/j.chom.2014.04.009 (2014).
18. Balazs, A. B. *et al.* Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis. *Nature* **481**, 81–84, doi: 10.1038/nature10660 (2012).
19. Walker, L. M. *et al.* Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* **477**, 466–470, doi: 10.1038/nature10373 (2011).
20. Wu, X. *et al.* Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science* **329**, 856–861, doi: 10.1126/science.1187659 (2010).
21. Caskey, M. *et al.* Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117. *Nature* **522**, 487–491, doi: 10.1038/nature14411 (2015).
22. Scharf, L. *et al.* Broadly Neutralizing Antibody 8ANC195 Recognizes Closed and Open States of HIV-1 Env. *Cell* **162**, 1379–1390, doi: 10.1016/j.cell.2015.08.035 (2015).
23. Stajich, J. E. *et al.* The Bioperl toolkit: Perl modules for the life sciences. *Genome research* **12**, 1611–1618, doi: 10.1101/gr.361602 (2002).
24. Roehrig, J. T., Hunt, A. R., Johnson, A. J. & Hawkes, R. A. Synthetic peptides derived from the deduced amino acid sequence of the E-glycoprotein of Murray Valley encephalitis virus elicit antiviral antibody. *Virology* **171**, 49–60 (1989).
25. Roehrig, J. T., Johnson, A. J., Hunt, A. R., Bolin, R. A. & Chu, M. C. Antibodies to dengue 2 virus E-glycoprotein synthetic peptides identify antigenic conformation. *Virology* **177**, 668–675 (1990).
26. Seligman, S. J. Constancy and diversity in the flavivirus fusion peptide. *Virology journal* **5**, 27, doi: 10.1186/1743-422X-5-27 (2008).
27. Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M. & Brenner, S. E. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome research* **14**, 1188–1190, doi: 10.1101/gr.849004 (2004).
28. Marti-Renom, M. A. *et al.* Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **29**, 291–325, doi: 10.1146/annurev.biophys.29.1.291 (2000).
29. Klein, D. E., Choi, J. L. & Harrison, S. C. Structure of a dengue virus envelope protein late-stage fusion intermediate. *Journal of virology* **87**, 2287–2293, doi: 10.1128/JVI.02957-12 (2013).
30. Laskowski, R. A., Moss, D. S. & Thornton, J. M. Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *Journal of molecular biology* **231**, 1049–1067, doi: 10.1006/jmbi.1993.1351 (1993).
31. Vriend, G. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *Journal of molecular graphics* **8**, 52–56, 29 (1990).
32. Luthy, R., Bowie, J. U. & Eisenberg, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* **356**, 83–85, doi: 10.1038/356083a0 (1992).
33. Suzuki, R., de Borja, L., Duarte dos Santos, C. N. & Mason, P. W. Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1. *Virology* **362**, 374–383, doi: 10.1016/j.virol.2006.11.026 (2007).
34. Zanluca, C., Mazzarotto, G. A., Bordignon, J. & Duarte Dos Santos, C. N. Development, characterization and application of monoclonal antibodies against Brazilian Dengue virus isolates. *PLoS one* **9**, e110620, doi: 10.1371/journal.pone.0110620 (2014).
35. Modis, Y., Ogata, S., Clements, D. & Harrison, S. C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* **427**, 313–319, doi: 10.1038/nature02165 (2004).
36. Mareze, V. A. *et al.* Tests in mice of a dengue vaccine candidate made of chimeric Junin virus-like particles and conserved dengue virus envelope sequences. *Applied microbiology and biotechnology* **100**, 125–133, doi: 10.1007/s00253-015-6973-7 (2016).
37. Cockburn, J. J. *et al.* Mechanism of dengue virus broad cross-neutralization by a monoclonal antibody. *Structure* **20**, 303–314, doi: 10.1016/j.str.2012.01.001 (2012).
38. Lok, S. M. *et al.* Binding of a neutralizing antibody to dengue virus alters the arrangement of surface glycoproteins. *Nature structural & molecular biology* **15**, 312–317, doi: 10.1038/nsmb.1382 (2008).
39. Ramanathan, B. *et al.* Synthetic B-Cell Epitopes Eliciting Cross-Neutralizing Antibodies: Strategies for Future Dengue Vaccine. *PLoS one* **11**, e0155900, doi: 10.1371/journal.pone.0155900 (2016).
40. Rouvinski, A. *et al.* Recognition determinants of broadly neutralizing human antibodies against dengue viruses. *Nature* **520**, 109–113, doi: 10.1038/nature14130 (2015).
41. Kroschewski, H., Sagripanti, J. L. & Davidson, A. D. Identification of amino acids in the dengue virus type 2 envelope glycoprotein critical to virus infectivity. *The Journal of general virology* **90**, 2457–2461, doi: 10.1099/vir.0.011486-0 (2009).
42. Butrapet, S. *et al.* Amino acid changes within the E protein hinge region that affect dengue virus type 2 infectivity and fusion. *Virology* **413**, 118–127, doi: 10.1016/j.virol.2011.01.030 (2011).
43. Christian, E. A. *et al.* Atomic-level functional model of dengue virus Envelope protein infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 18662–18667, doi: 10.1073/pnas.1310962110 (2013).

## Acknowledgements

We thank André Báfica that contributed to data discussion and critical reading of the manuscript. This work had financial support from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, grant number: Biocomputacional 23038.010048/2013-27) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq, grant number: 404339/2012-3; Cnpq, Grant number: 552258/2011-3). Fleith, R.C. is currently enrolled at the Bioinformatics programme at Universidade Federal de Minas Gerais and is supported by CAPES. Ferguson, B.J. is supported by an Isaac Newton Trust/Wellcome Trust ISSF/University of Cambridge research grant.

## Author Contributions

D.S.M., R.C.F., F.P.L. and B.J.F. designed the study and wrote the manuscript. R.C.F., F.P.L., P.F.S., M.M.R., B.J.F. and D.O.P. carried out the experiments. W.R.P., J.B. and M.L.S. collected the samples. C.N.D.S. and D.M.S. helped constructing reagents and discussed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**How to cite this article:** Fleith, R. C. *et al.* Genome-wide analyses reveal a highly conserved Dengue virus envelope peptide which is critical for virus viability and antigenic in humans. *Sci. Rep.* **6**, 36339; doi: 10.1038/srep36339 (2016).

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

# Tests in mice of a dengue vaccine candidate made of chimeric Junin virus-like particles and conserved dengue virus envelope sequences

Vania Aparecida Mareze<sup>1</sup> · Cristina Silvia Borio<sup>2</sup> · Marcos F. Bilen<sup>2</sup> · Renata Fleith<sup>1</sup> · Santiago Mirazo<sup>3</sup> · Daniel Santos Mansur<sup>1</sup> · Juan Arbiza<sup>3</sup> · Mario Enrique Lozano<sup>2</sup> · Oscar Bruña-Romero<sup>1</sup>

Received: 12 May 2015 / Revised: 18 August 2015 / Accepted: 31 August 2015 / Published online: 19 September 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

**Abstract** Two new vaccine candidates against dengue virus (DENV) infection were generated by fusing the coding sequences of the self-budding Z protein from Junin virus (Z-JUNV) to those of two cryptic peptides (Z/DENV-P1 and Z/DENV-P2) conserved on the envelope protein of all serotypes of DENV. The capacity of these chimeras to generate virus-like particles (VLPs) and to induce virus-neutralizing antibodies in mice was determined. First, recombinant proteins that displayed reactivity with a Z-JUNV-specific serum by immunofluorescence were detected in HEK-293 cells transfected with each of the two plasmids and VLP formation was also observed by transmission electron microscopy. Next, we determined the presence of antibodies against the envelope peptides of DENV in the sera of immunized C57BL/6 mice. Results showed that those animals that received Z/DENV-P2 DNA coding sequences followed by a boost with DENV-P2

synthetic peptides elicited significant specific antibody titers ( $\geq 6.400$ ). Finally, DENV plaque-reduction neutralization tests (PRNT) were performed. Although no significant protective effect was observed when using sera of Z/DENV-P1-immunized animals, antibodies raised against vaccine candidate Z/DENV-P2 (diluted 1:320) were able to reduce in over 50 % the number of viral plaques generated by infectious DENV particles. This reduction was comparable to that of the 4G2 DENV-specific monoclonal cross-reactive (all serotypes) neutralizing antibody. We conclude that Z-JUNV-VLP is a valid carrier to induce antibody-mediated immune responses in mice and that Z/DENV-P2 is not only immunogenic but also protective in vitro against infection of cells with DENV, deserving further studies. On the other side, DENV's fusion peptide-derived chimera Z/DENV-P1 did not display similar protective properties.

✉ Oscar Bruña-Romero  
oscar.bruna.romero@ufsc.br

Vania Aparecida Mareze  
vaniamareze@gmail.com

Cristina Silvia Borio  
cristinaborio@gmail.com

Marcos F. Bilen  
mbilen@unq.edu.ar

Renata Fleith  
rcfvet@gmail.com

Santiago Mirazo  
smirazo@fcien.edu.uy

Daniel Santos Mansur  
daniel.mansur@ufsc.br

Juan Arbiza  
jarbiza@fcien.edu.uy

Mario Enrique Lozano  
mario.lozano@unq.edu.ar

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología, Inmunología e Parasitología, Centro de Ciencias Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina - MIP/CCB/UFSC, Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima, Setor F, Bloco A, sala 309, Florianópolis, SC CEP 88.040-970, Brazil

<sup>2</sup> Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular, Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina

<sup>3</sup> Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

**Keywords** Recombinant vaccines · Dengue · Dengue virus envelope · Junin virus · Virus-like particles

## Introduction

Dengue is a mosquito-borne disease caused by a Flavivirus that has become a global public health threat in recent years, due to its high prevalence (over a hundred countries worldwide) (WHO/TDR 2009). In 2013, a study made by cartographic approaches estimated that there are 390 million dengue infections per year, of which only 96 million are apparent (Bhatt et al. 2013). At present, there are officially four dengue virus serotypes (DENV 1–4) that infect humans, although a fifth serotype was found in Malaysian primates in 2013 (Normile 2013). There is no current vaccine available to cope with this health problem, although enormous research efforts have been deployed and several candidates have been tested (Capeding et al. 2014; George et al. 2015; Guy et al. 2011; Kanesa-thasan et al. 2001; Kirkpatrick et al. 2015; Kitchener et al. 2006; Osorio et al. 2014; Thomas et al. 2013; Villar et al. 2015).

The envelope protein (E) of Flaviviruses is responsible for virion assembly, receptor binding, and fusion to the host cell membrane, and it is also the main target for neutralizing antibodies (Chambers et al. 1990). Protein E is associated with its cell receptor before virus endocytosis is triggered. After that, fusion of DENV envelope to the target cell membrane takes place because of an E protein rearrangement under the low endosomal pH. Low pH exposes the *fusion loop* of E, inserting the fusion peptide into the membrane of the host cell and induces a subsequent rearrangement of lateral monomers. Consequently, there is a conformational change of the E homodimer to a trimer state. The trimeric structure folds, forms a hairpin, and generates the fusion pore that allows RNA release in the cytoplasm and continuation of the virus cycle (Alen and Schols 2012; Modis et al. 2004). These conformational changes also contribute to displaying other highly conserved cryptic regions present in E. The high degree of conservation observed in some of these cryptic regions is mainly due to the fact that they are not constantly submitted to the host's immune pressure that will repeatedly select sequence variants.

Virus-like particles (VLPs) are self-mounting tri-dimensional empty structures that are generated by some virus proteins. These particulate antigens are efficiently detected by our immune system which rapidly initiates specific immune responses against them. Good examples are the hepatitis B virus (HBV) or papillomavirus (HPV) vaccines, for which a single antigen with these features, i.e., the HBsAg in the case of HBV or the L1 protein for HPV, is preventive (Wheeler et al. 2008). Another example described in the literature is the Z protein from Junin virus (Z-JUNV). Junin virus is transmitted by rodents in rural Argentina, causing Argentine hemorrhagic

fever (AHF), a severe disease that can cause neurological manifestations. The Z protein from JUNV is considered a matrix viral protein with relevant properties, such as interactions with cellular factors or induction of viral budding (Urata and de la Torre 2011). Studies conducted by researchers of our group in the past demonstrated the ability of Z to generate VLPs (Goni et al. 2010), suggesting a possible use of Z as a carrier system for antigenic peptides (Borio et al. 2012).

Our hypothesis for this study was that fusing relevant DENV peptides to the C-terminal region of Z-JUNV would generate VLP structures that could induce significant antibody-mediated immune responses, which might interact with the DENV infection process. We chose two highly conserved peptides (99–100 % conservation at amino acid level among all DENV serotypes) previously identified by members of our group within domain II of the E protein (Fleith et al., manuscript in preparation). Our previous experience with prime-boost protocols suggested that we might be successful in our quest by administering these peptide sequences as two different immunogenic formulations, which turned out to be the case. We show here (i) the steps followed for generating the molecular constructions, (ii) the adapted immunization protocol used to immunize animals, and (iii) the preliminary results obtained using sera of immunized animals to neutralize DENV and prevent infection of live cells.

## Materials and methods

**Plasmids** A plasmid (pZ/GFP) containing Z-JUNV and GFP (green fluorescent protein) coding sequences was used as control in all experiments and has been previously described (Borio et al. 2012). To generate the DENV immunogens, pZ/GFP was digested with *Bam*HI and *Not*I to remove the GFP open-reading frame. Long synthetic oligonucleotides with partial *Bam*HI or *Not*I flanking sites encoding the conserved peptides DENV-P1 (sense 5'-GATCCGGTGTTGACCGTGGTTGGGGTAACGGTTGCGGTCTGTTCGGTAAAGGTGGTTAGGC-3' and antisense 5'GGCCGCCTAACCACCTTTACCGAACAGACCGCAACCGTTACCCCAACCACGGTCAACACCG3') and DENV-P2 (sense 5'GATCCGTTGTTGTTCTGGGTTCTCAGGAAGGTGCGATGCACACCGCGCTGACCGGTGCGACCGAAATCTAGGC3' and antisense 5'-GGCCGCC TAGATTTCCGGTCGCACCGGTCAGCGCGGTGTGCATCGCACCTTCCTGAGAACCAGAACACAACG-3') were annealed in vitro and used to replace the GFP coding sequence. The size of Z-JUNV (291 bp) was increased to 342 and 364 bp, respectively, because of these long oligonucleotide additions. After gel and sequencing confirmation, the new plasmids, pZ/DENV-P1 and pZ/DENV-P2, were purified using a cesium chloride gradient to obtain endotoxin-free DNA for cell transfection and immunization. DNAs were

quantified in a Picodrop® equipment and the purity was determined by calculating their absorbance ratios 260/280 and A260/230.

**Synthetic peptides, vaccine formulations, and immunization protocol** This project was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation. Eight weeks old male C57BL/6 mice (4 animals per group) were immunized using a heterologous prime-boost protocol. The protocol consisted of a priming DNA dose (50 µg) in *Bordetella pertussis* monophosphoryl lipid A (MPLA; kind gift of Dr. Isaias Raw and Dr. Flavia S. Kubrusly, Butantan Institute, Sao Paulo, Brazil) by intramuscular injection (posterior muscles of the thigh: biceps femoris and/or abductor) followed 6 weeks later by a booster subcutaneous inoculation of 20 µg of synthetic peptides DENV-P1 (VDRGWGNGCGLFGKGG) and DENV-P2 (KLH-CLGSQEGAMHTALTGATEI, with the three initial valine residues exchanged by a cysteine for synthesis viability) in incomplete Freund's adjuvant (IFA). Fifteen days after, the last immunization blood was collected for serologic assays.

**Cell culture and fluorescence microscopy** HEK 293 (ATCC® CRL-1573™) human kidney cells were grown in aseptic conditions, in six-well cell culture plates using DMEM medium supplemented with 10 % fetal bovine serum (Gibco, Life Technologies). Low-confluence (30–50 %) cells were transfected using Lipofectamine 2000 CD (Invitrogen, Life Technologies) with 1 µg DNA/well of the Z-VLPs encoding plasmids (control, Z-VLP/GFP; samples, Z/DENV-P1 or Z/DENV-P2). Forty-eight hours later, these cells were analyzed by indirect immunofluorescence assay. Cells were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with 4 % formaldehyde in PBS for 20 min, washed and permeabilized with 0.1 % Triton X-100 in PBS for 10 min before a new wash was performed, and the primary antibody (polyclonal anti-Z-JUNV produced in rabbit, kindly provided by Dr. Mario Enrique Lozano) diluted 1:2000 in PBS/1 % BSA/0.1 % Triton X-100 was added to the wells for 1 h at room temperature. After extensive washes, the anti-rabbit secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 555 (Molecular Probes) diluted 1:500 in the same buffer was added for a 1-h final incubation at room temperature. After another round of washes, pictures were taken in an inverted fluorescence microscope (Olympus IX71).

**Virus-like particle purification and transmission electron microscopy** For purification of VLPs, transfection was carried out using mixtures of plasmids and Lipofectamine 2000 CD (Invitrogen)-DNA/Lipofectamine ratio 1:4, each of them being added to three 150-cm<sup>2</sup> cell culture flasks containing 70–80 % confluent HEK 293 cells. Seventy-two hours later, transfected cell culture supernatants were collected and

clarified (2800 g/20 min, room temperature) and VLPs in the supernatant were purified by ultracentrifugation on a sucrose cushion (30 % sucrose—96,000g/2 h/4 °C) in polyallomer tubes placed in a Sw41.Ti rotor of an Optima XE-100 Beckman Coulter® centrifuge. Pellets were resuspended in PBS and stored at 4 °C for a maximum of 7–10 days. A drop of 25 µL of the purified VLPs was placed on nickel grids covered with parlodion and coated with carbon. The contrast was made with uranyl acetate (2 %) for 1 min in the dark and dried with filter paper. These grids were analyzed on a JEM-1011 TEM microscope the following day.

**ELISA assay and statistical analysis** Ninety six-well plates (MAXISORP, NUNC, Thermo Scientific®) were pretreated with 0.25 % glutaraldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 5.8 (4 h/room temperature), washed three times with the same sodium phosphate buffer, and then sensitized at 4 °C/overnight with the relevant synthetic peptides (0.5 µg/well) in borate buffered saline (0.1 M boric acid, 25 mM sodium tetraborate, 0.15 M sodium chloride pH = 8.4). The following day, the liquid was removed from the plates, which were washed three times with 0.1 % Tween 20 in PBS. Pools of sera obtained from immunized mice were used as source of primary antibodies. Sera were diluted 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, or 1:3200 in PBS/0.1 % Tween20/1 % BSA before incubation for 1 h and 30 min at 37 °C. An anti-mouse IgG, HRP conjugated and produced in goat (Sigma-Aldrich®), was used at a dilution of 1:10.000 as secondary antibody. OPD (ImunoPierce, Thermo Scientific®) was used as a chromogen for 20 min in the dark, followed by a stop solution (2.5 M sulfuric acid), and reading at 490 nm (TECAN® model infinite M200). Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA, *p* value ≤0.05.

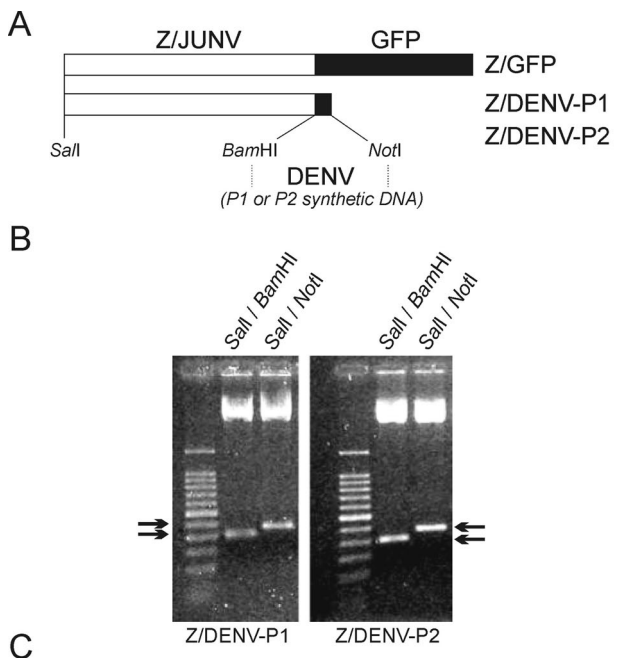
**Plaque reduction neutralization tests** Plaque reduction neutralization tests (PRNT) were performed according to WHO recommendations, with minor modifications. Different dilutions (1:40, 1:80, 1:160, and 1:320) of inactivated sera (56 °C, 30 min), obtained 2 weeks after the booster dose, were incubated with the DENV-2 virus at 37 °C for 1 h. The mouse monoclonal flavivirus group-specific antibody 4G2 (hybridoma D1-4G2-4-15, ATCC HB-112, (Falconar 1999) was used at the same dilutions as a positive neutralizing control. After that, HuH7.5 cells (ATCC PTA-8561) were incubated at 37 °C for 1 h and 30 min in a 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere with the mixture of serum plus virus. Then, the mix was removed and a 1.6 % carboxymethylcellulose/DMEM/10 % fetal bovine serum solution was added to the wells. Five days later, the cells were fixed with 3 % paraformaldehyde and stained with crystal violet. The plaque-forming units (p.f.u/well) were then counted using a stereomicroscope.



## Results

### Design of the DENV candidate vaccines

Two conserved peptides present on the envelope of 480 available sequences of DENV analyzed, regardless of their serotype, were used in our study to test their behavior as hypothetical cryptic B-cell epitopes. Two chimerical vaccine candidates were designed combining the 3D structure and self-budding capacities of the Z protein of JUNV and each of these two peptide sequences. Figure 1a shows a schematic view of the two constructs as well as some molecular details of the constructions, including an experimental control construct that comprises Z-JUNV fused to the green fluorescent protein (GFP). The new recombinant plasmid constructs were analyzed by restriction enzyme digestion as well as by DNA



MGNCNGASKSNQPDSSRATQPAAEFRVVAHSSLYGRYNCKCCWFA  
 DTNLITCNDHYLCLRCHQGMLRNSDLNICWKPLPTTITVPVEPTAPP  
PGSVDRGWNGCGFLFGKG

MGNCNGASKSNQPDSSRATQPAAEFRVVAHSSLYGRYNCKCCWFA  
 DTNLITCNDHYLCLRCHQGMLRNSDLNICWKPLPTTITVPVEPTAPP  
PGSVVVLGSGEGAMHTALTGATEI

**Fig. 1** Vaccine candidates used in our study. **a** Schematic representation of the chimeric constructs depicting the most relevant components. **b** Agarose gel electrophoresis of restriction fragments obtained after digestion of the relevant plasmid constructs; (left panel) lane 1: 100-bp molecular weight marker; lane 2: Z/DENV-P1 digested with *SalI* and *BamHI*; lane 3: Z/DENV-P1 digested with *SalI* and *NotI* (right panel) lane 1: 100-bp molecular weight marker; lane 2: Z/DENV-P2 digested with *SalI* and *BamHI*; lane 3: Z/DENV-P2 digested with *SalI* and *NotI*. **c** Amino acid sequences of Z/DENV-P1 (upper) and Z/DENV-P2 (lower). Underlines indicated the residues inserted to give flexibility to the hinge region between Z-JUNV and DENV peptides. In bold are marked sequences of the DENV epitopes

sequencing. Figure 1b shows the results of the restriction enzyme analyses of the clones. Plasmids were digested with *BamHI/SalI* or *BamHI/NotI* and were subsequently separated by agarose gel electrophoresis. Bands of the expected sizes were observed for Z-JUNV alone (291 bp), Z/DENV-P1 (342 bp), or Z/DENV-P2 (364 bp). Figure 1c shows the complete amino acid sequence of both antigens, as deduced from the sequenced DNAs, confirming the adequacy to the design planned. Two small amino acids (one glycine and one serine) were artificially included at the fusion site between both sequences in an attempt to generate some flexibility (Wegner et al. 2002) and thus permit better antibody recognition of the DENV peptides.

### In vitro characterization of the Z-JUNV chimeras

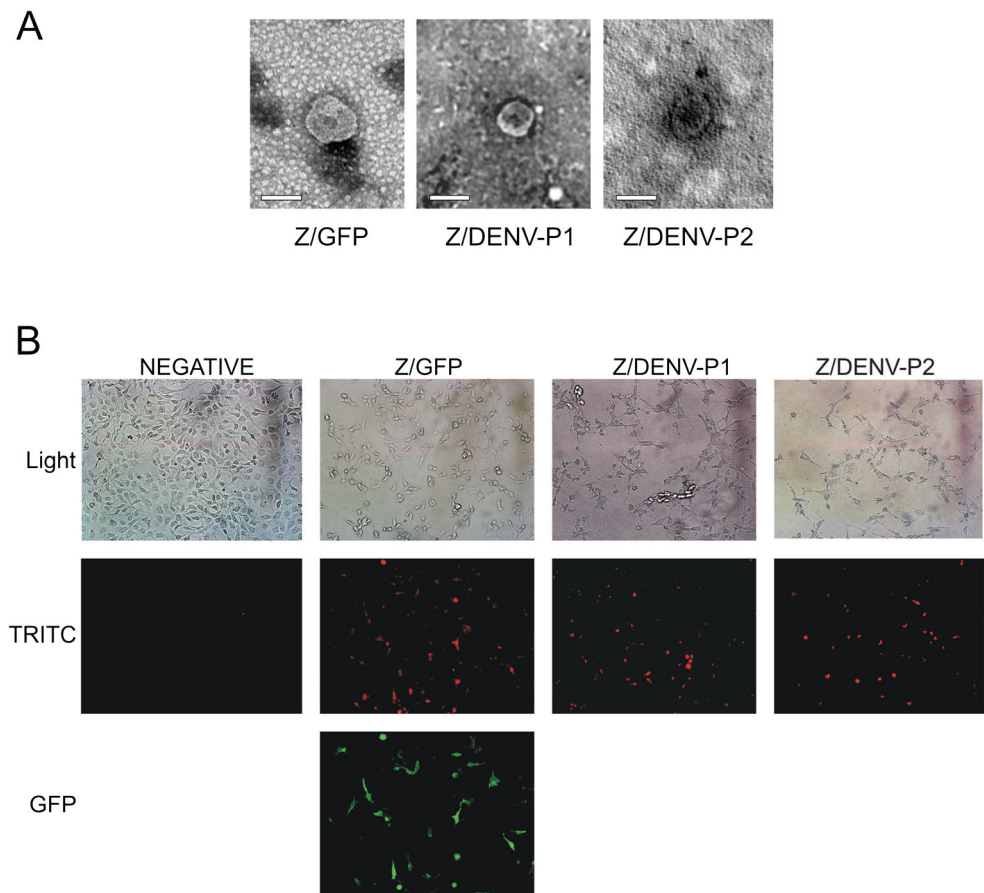
Once generated, the capacity of these constructs to generate VLPs was tested. To this aim, we transfected HEK 293 cells with each of the three Z-JUNV recombinant constructs. First, to determine whether or not the VLPs were being generated by the transfected cells, transmission electron microscopy analyses (TEM) of the cell supernatants concentrated by sucrose gradients was performed. Figure 2a shows representative micrographs of the structures observed after the analysis of each group of cells. According to the images obtained, the expression products generated by HEK 293 cells transfected with Z/GFP, Z/DENV-P1, and Z/DENV-P2 were able to self-mount into virus-like structures that displayed sizes compatible with those previously predicted for equivalent JUNV structures, e.g., 50–100 nm (Borio et al. 2012).

Once the Junin virus-like structures were observed by TEM, we next decided to study the reactivity of those structures with antibodies that specifically recognize Z-JUNV protein by immunofluorescence. Immune reactivity represents a strong indication of the correct identity of the protein and, in some cases, of its correct tridimensional structure as well. Figure 2b displays the results of the immunofluorescence assays with a highly specific anti-Z rabbit polyclonal serum. As can be seen in this figure, only HEK 293 cells that had been transfected with Z-JUNV recombinant chimeras were specifically recognized by the antibodies present in the serum of animals. Altogether, the above data suggests that VLPs based on the Z self-budding protein of JUNV were generated and correctly mounted by the transfected cells.

### In vivo induction of a specific anti-DENV and anti-JUNV humoral immune response

As per our previous observations, Z-JUNV VLPs were being formed in the plasmid-transfected cells and were structurally correct. Subsequently, we analyzed by ELISA the capacity of these constructs to induce a humoral immune response against the JUNV-DENV chimera in mice. For this, we immunized

**Fig. 2** *In vitro* analyses of the vaccine candidates. **a** Transmission electron microscopy micrographs representative of each of the sucrose gradient-purified Z/JUNV virus-like particles. **b** Light microscopy or immunofluorescence analyses of HEK 293 cells untransfected or transfected with pZ/GFP (positive control), or the vaccine candidates Z/DENV-P1 or Z/DENV-P2. A specific rabbit anti-Z/JUNV antiserum was used as source of primary antibodies for the recognition of Z, and TRITC was the fluorophore conjugated to the secondary anti-rabbit antiserum. GFP detection under a UV microscope was also performed for Z/GFP-transfected cells for positive confirmation of transfection efficiency. *White bars* in A represent a size of 100 nm



C57BL/6 mice i.m. with 50 µg/dose of each plasmid construct in *Bordetella pertussis* monophosphoryl-lipid A (MPLA) stable emulsion, to mimic previous reports that showed the beneficial effect of this adjuvant to induce broad immune responses after DNA immunization (Sasaki et al. 1997). Plasmids had been previously purified by cesium chloride isopycnic ultracentrifugation to eliminate *E. coli* endotoxin contents (LPS final content <2 ng/ml or 20 EU/ml). Six weeks after the priming dose, a 20 µg/mouse s.c. booster dose of synthetic DENV-P1 or DENV-P2 peptides in incomplete Freund's adjuvant was administered to the mice (Fig. 3a).

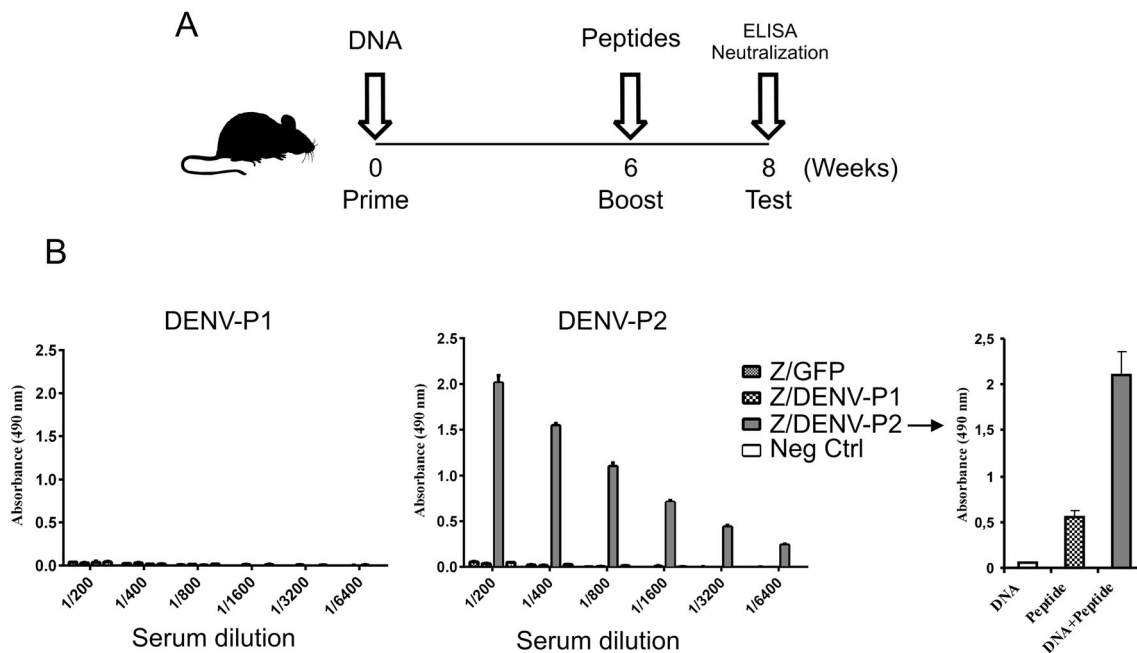
As expected, a single immunization with the recombinant plasmids displayed no significant antibody reactivity against P1 or P2 in either group of mice at the time of boost (data not shown). However, after boosting this initial immune response with synthetic peptides encoding the DENV E sequences under study, a different picture showed up. Figure 3b shows that, although no significant antibody reactivity could be observed in the sera of animals immunized with chimeras and peptides of the P1 sequence (left panel), titers of over 6,400 could be detected in all animals that had been immunized against the DENV E protein P2 sequence (middle panel,  $p \leq 0.001$  in all cases when compared to control or P1-immunized mice). Furthermore, the right panel in Fig. 3b shows that these antibody

levels were not generated by a single immunization after either DENV-P2 plasmid DNA or synthetic peptide administrations (nor DENV-P1 peptide either, data not shown) and were only elicited by the combined DNA/peptide prime-boost immunization protocol.

#### Neutralization of DENV infection by sera of immunized mice

Since we had detected a significant anti-DENV humoral immune response in those animals immunized with the DENV P2 products, we next wanted to determine whether the antibodies raised against the P2 sequence could have any effect on the virus particles. DENV mouse models are not widely available, and those that exist do not mimic the course of, or the immune responses risen against, natural human infections. Thus, we performed the traditional *in vitro* neutralization studies, since neutralizing the interaction between the virus particles and the host cell could represent a protective activity for the vaccinated human host. To this aim, we performed the plaque-reduction neutralization tests (PRNT) using sera of all immunized mice and controls.

Figure 4a shows representative pictures of the plaques generated by DENV 5 days after infecting HuH7 cells with



**Fig. 3** *In vivo* immunogenicity studies of the vaccine candidates. **a** Prime-boost regime used in our experiments and tests performed using the resultant mice sera. **b** Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) performed to detect the presence of reactive anti-DENV-P1 (*left*) or DENV-P2 (*middle*) antibodies in each group of mice immunized

according to the protocol depicted in A. The level of antibodies elicited by each DENV-P2 immunogen when administered individually or combined in the prime-boost protocol is shown in the *right panel*. Results represent mean values and standard deviations of a pool of sera from four different animals (mean  $\pm$  SD,  $n = 8$ )

clarified serotype 2 dengue viruses. As can be observed in that figure, when compared to the control cells or with cells that received the DENV suspensions pre-incubated with sera of mice immunized with DENV P1 constructs, a significant reduction in the number of lysis plaques (the cytopathic effect of DENV on HuH7 cells) could be observed in those cell monolayers that had received DENV pre-incubated with sera of animals containing antibodies against DENV P2, suggesting a significant neutralizing effect of the antibodies present in these mice sera. All control sera, including those elicited after immunization with individual immunogens, did not display a significant neutralizing activity.

In Fig. 4b, a graphical representation of the number of plaques detected in each group of wells at a dilution of 1:320 is shown. Additionally, the same figure shows the percentage of reduction of plaques by effect of the antibodies present in the relevant sera or after using the 4G2 neutralizing monoclonal antibody. A significant mean reduction of 62.5 % in the number of viral plaques was observed when using the sera of P2-immunized mice, only surpassed by the widely neutralizing monoclonal antibody.

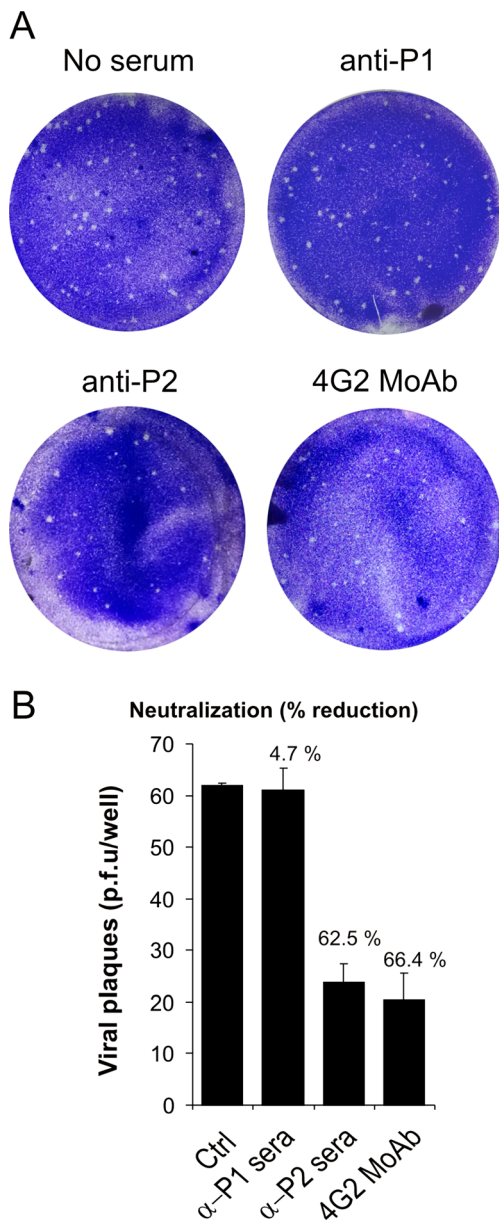
## Discussion

Several human trials of DENV vaccine formulations have been completed so far, with a majority based on attenuated DENV particles or DENV/yellow-fever virus (YFV)

recombinant viruses. Those candidates displayed, at best, limited protective activities (Capeding et al. 2014; George et al. 2015; Guy et al. 2011; Kanesa-athan et al. 2001; Kirkpatrick et al. 2015; Kitchener et al. 2006; Osorio et al. 2014; Thomas et al. 2013; Villar et al. 2015). Most studies reported no differences between placebo and immunized individuals regarding the number of serious adverse events (SAE) on the field. However, all of the vaccine candidates include in their formulation the Envelope (E) and pre-membrane (prM) proteins of the virus, which have recently been confirmed to be related to antibody-dependent enhancement (ADE) of the disease (de Alwis et al. 2014).

In an attempt to avoid ADE, we chose two cryptic epitopes within the E protein of DENV and engineered them to become part of a VLP. Two conserved peptides present on the envelope of 480 available sequences of DENV analyzed, regardless of their serotype, were identified by our collaborators (Fleith et al. manuscript in preparation) while studying conservation versus solvent exposition and tridimensional structure of the E protein. Both peptides are exposed on the surface of the E protein trimer formed during fusion, but not on the dimer present on the surface of the mature viral particles, suggesting that they could behave as cryptic epitopes for antibody recognition. Additionally, they display critical activities for the virus (P1 corresponds with the sequence of the fusion peptide and P2 has an unknown function but according to Fleith's manuscript blocks virus cycle progression when mutated). By fusing these peptides to a harmless JUNV-





**Fig. 4** Plaque-reduction neutralization tests (PRNTs) to detect antiviral immune responses in immunized mice. **a** Crystal violet stained HuH-7 cell monolayers cultured in six-well plates and incubated for 5 days with mixtures of DENV-2 viruses and sera of the different groups of mice ( $n = 4$  per group) or with monoclonal antibody 4G2, as indicated. Sera were used at a dilution of 1:320. Plaques of cell lysis were counted with a stereomicroscope. **b** Graphical representation of the mean number ( $\pm$  SD) of plaque-forming units counted per well of a six-well plate incubated with the mixtures of sera (or monoclonal antibody 4G2) and DENV-2 particles, indicating also the percentage of reduction in the number of plaques detected at a serum dilution of 1:320

VLP, we generated a DENV vaccine candidate that is not only theoretically safer (not infectious and not inflammatory by itself) but also easier to produce in a large scale than those based on attenuated viral particles currently under evaluation as experimental human vaccines. Thus, our formulation includes only non-infectious DNA that encodes the VLPs

fused—or subsequently boosted—with short DENV envelope peptides, but not the whole virion or the pre-membrane/envelope proteins of DENV included within the YFV vectors. In our candidate, each immunogenic component is precisely defined and the relevant DENV sequences represent conserved DENV epitopes that could possibly be part of a future universal vaccine.

Initially, *in vitro* analyses of the vaccine candidates showed that the constructions were molecularly correct and were able to generate particulate structures that looked like VLPs under electron microscopy. Indirect immunofluorescence assays also showed that Z protein had been successfully expressed in transfected HEK 293 cells. Therefore, when put altogether, the results of sequencing, immunofluorescence, and transmission electron microscopy did confirm the correct expression of Z/DENV-P1 and Z/DENV-P2 from the plasmid DNA vaccines. In this work, we preferred to use DNA vaccines because they are easier to obtain and purify, lowering the cost when compared to the Z-JUNV-purified VLPs. Administering DNA will also ensure that protein folding, glycosylation, or other post-translational modifications will mimic those of the natural Z-JUNV protein.

*In vivo* analyses of the humoral immune responses induced by the immunizations showed that the vaccine candidate based on P1 (the DENV fusion peptide) did not seem to induce any detectable humoral response. At first, we held the technology responsible for this, believing that the peptide might have not stacked to the plate. However, later negative data on the virus-neutralizing capacities of antibodies present in the sera of P1-immunized animals showed that, even in the case that antibodies would be present in those mice, those would not display any detectable effect on the viral particles, and thus, P1 could not be considered as a feasible vaccine candidate. The better response detected against Z/DENV-P2 may reflect that it is indeed a better immunogen, at least in our experimental setup. Besides, it is worth noting that we could not detect antibody reactivity (contrary to the NS1 protein tested side by side, data not shown) against this peptide in any of the dengue patients sera tested. This, together with the fact that this antibody epitope is displayed only on the surface of the envelope protein trimer during the last events of the invasion process, suggests that it may not be significantly presented to the immune system during natural infection. If that is the case, it is quite possible that it does not participate in ADE phenomena or other unwanted side effects linked to antibody recognition of the DENV infectious particles.

When looking at the neutralizing activity of Z/DENV-P2, contrary to Z/DENV-P1, we could observe that this immunogen potentially neutralize virus entry. In 2014, members of our group carried out a study on the function of DENV-P2 peptide for the virus (Fleith et al., manuscript in preparation). The original P2 sequence (aa 250–270) was mutated and the resulting DENV genome obtained was sub-cloned into a

bacterial artificial chromosome (BAC). The infectious clone obtained by simultaneous substitution of residues 250–253 and 255 with alanines had a significant impact in reducing the replication and spread of the virus in insect and human cells. These results indicate the important role of this peptide for the virus and suggest that antibodies against it may interfere with the virus cycle irreversibly.

Other authors have pursued vaccination against dengue by using peptidic immunogens. Rocha and colleagues (2014) conducted a study using three conserved peptides present on the envelope protein: pep01 (MAKDKPTLDIELGGGGMAKMKPTLDIELGGGGMAKMKPTLDFELGGGMAQGGKPTLDFEL) in domain I, pep02 (WLWHKQWFLDLPLPWGGGGWVHRQWFFDLPLPWGGGGWLVHRQWFLDLPLPWGGGGWLVHVKQWFLDLPLW), and pep03 (LVTFKTAHAKKQEVGGGGLVTFKNAHAHAKKQEVGGGGLVTFKNPHAKKQDVGGGGLVTFKVPHAKRQDV) included in domain II. Immunizations were performed in BALB/c mice with three immunizations of 50 µg of these peptides in incomplete Freund's adjuvant, and results showed significant humoral immunogenicity. Contrary to us, antibody reactivity of 16 human sera was observed against these three peptides, suggesting that none of them are cryptic sequences. None of the peptides tested coincide with P2 and, unfortunately, the antibodies induced were unable to neutralize dengue virus particles *in vitro* in a PRNT assay.

A more promising recent study characterized 145 monoclonal antibodies against dengue virus and detected two new conformational epitopes, the fusion loop epitope (FLE) and the envelope dimer epitope (EDE), the latter being broadly reactive across the dengue serocomplex and fully neutralizing against DENV (Dejnirattisai et al. 2015). The authors show that it is possible to completely neutralize DENV infectious particles using picomolar concentrations of one of these antibodies (EDE). However, despite describing epitopes in the same regions of our P1 (FLE) and P2 (EDE) peptides, they do not coincide, since FLE and EDE are formed by amino acid residues present in both units of the E dimer, but not in any of them separately.

Concerning the prime-boost immunization regime, other authors have also successfully used protocols similar to ours to test vaccine candidates against DENV infection. A report by Azevedo et al. (Azevedo et al. 2013) describes intense protection against a DENV-2 challenge after priming BALB/c mice with plasmid DNA construct encoding E and boosting those animals with a chimeric YFV with the prM and E genes replaced by those of DENV. Two doses of DNA, two doses of YFV recombinant, or both vectors admixed or given by different routes also protected the animals and promoted 100 % survival. No specific epitopes were defined for the antibodies detected in the PRNT assay, and the authors used a mouse brain-adapted DENV-2 strain inoculated intracerebrally, a model that is far from mimicking either natural infections or

the protective mechanisms induced after an infected *Aedes* mosquito bite.

Some obstacles that we already envision for our P2 vaccine candidate include the fact that DNA vaccines, such as pZ/DENV-P2, although easier to obtain, do not immunize well larger animals or humans (Saade and Petrovsky 2012). The possibility of using purified Z-JUNV VLPs for immunization is however very attractive, since it could possibly be immunogenic during all stages of the pipeline of vaccine development. However, additional research has to be performed now to scale up the production of these VLPs, thus recovering large quantities of these structures in a purified form. Large-scale peptide synthesis, on the contrary, has been made broadly available nowadays, and it is thus feasible to believe that formulations based on synthetic peptides in adjuvants can become part of a near future widely used mass-vaccines development technologies. Other hurdles include for example the fact that, although in theory ADE should not be a concern, this possibility cannot be ruled out until specific tests have been performed.

This was a proof-of-concept study in which we demonstrated the immunogenicity of a DENV/JUNV chimera and protection against DENV-2. Although feasible to expect, because of the conservation of P2 sequence among all serotypes, we did not test protection against the other three DENV serotypes. This has to be performed in the near future. Finally, we have not determined the cellular immune responses that might have been induced after immunization or whether these would be mediated by CD4 or CD8. However, in preliminary tests run with the available on-line bioinformatics freeware, results did not reveal the presence of any CD4 or CD8 epitopes within P1 or P2 sequences, neither for mice nor for available human MHC haplotypes.

In conclusion, we have described here the use of a peptide sequence that is highly conserved among all DENV isolates and serotypes as a candidate vaccine formulation that induces antibodies with neutralizing activity against DENV-2 and that should therefore be considered for further tests in order to develop an antigen formulation that might serve as a universal DENV virus vaccine.

**Acknowledgments** We want to express our gratitude to Camila Hüpner, Renata Pinheiro Gonzales, Mariana Oliveira Dias for their technical contributions and scientific discussions, as well as the staff of our support laboratories at UFSC (LCME and LAMEB) for their kindness and patience with the students.

**Ethical statement/Conflict of interest** The Argentinian-Brazilian Biotechnology Center (CABBIO) and the Brazilian agency Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) gave financial support to this study. OBR was also granted with a CNPq fellowship.

The authors of this manuscript hereby declare that they are official inventors of a Patent, with application number 62147274, provisionally submitted on April 14th, 2015, to the United States Patent and Trademark Office (USPTO).

## References

- Alen MM, Schols D (2012) Dengue virus entry as target for antiviral therapy. *J Trop Med* 2012:628475. doi:10.1155/2012/628475
- Azevedo AS, Goncalves AJ, Archer M, Freire MS, Galler R, Alves AM (2013) The synergistic effect of combined immunization with a DNA vaccine and chimeric yellow fever/dengue virus leads to strong protection against dengue. *PLoS One* 8(3):e58357. doi:10.1371/journal.pone.0058357
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI (2013) The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496(7446):504–507. doi:10.1038/nature12060
- Borio CS, Bilen MF, Arguelles MH, Goni SE, Iserte JA, Glikmann G, Lozano ME (2012) Antigen vehiculation particles based on the Z protein of Junin virus. *BMC Biotechnol* 12:80. doi:10.1186/1472-6750-12-80
- Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SR, Ismail HI, Chotpitayasunondh T, Chua MN, Luong CQ, Rusmil K, Wirawan DN, Nallusamy R, Pitisuttithum P, Thisyakorn U, Yoon IK, van der Vliet D, Langevin E, Laot T, Hutagalung Y, Frago C, Boaz M, Wartel TA, Tomieporth NG, Saville M, Bouckennooghe A (2014) Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet* 384(9951):1358–1365. doi:10.1016/S0140-6736(14)61060-6
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM (1990) Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 44:649–688. doi:10.1146/annurev.mi.44.100190.003245
- de Alwis R, Williams KL, Schmid MA, Lai CY, Patel B, Smith SA, Crowe JE, Wang WK, Harris E, de Silva AM (2014) Dengue viruses are enhanced by distinct populations of serotype cross-reactive antibodies in human immune sera. *PLoS Pathog* 10(10):e1004386. doi:10.1371/journal.ppat.1004386
- Dejnirattisai W, Wongwiwat W, Supasa S, Zhang X, Dai X, Rouvinsky A, Jumnainsong A, Edwards C, Quyen NT, Duangchinda T, Grimes JM, Tsai WY, Lai CY, Wang WK, Malasit P, Farrar J, Simmons CP, Zhou ZH, Rey FA, Mongkolsapaya J, Screaton GR (2015) A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. *Nat Immunol* 16(2):170–177. doi:10.1038/ni.3058
- Falconar AK (1999) Identification of an epitope on the dengue virus membrane (M) protein defined by cross-protective monoclonal antibodies: design of an improved epitope sequence based on common determinants present in both envelope (E and M) proteins. *Arch Virol* 144(12):2313–2330
- George SL, Wong MA, Dube TJ, Boroughs KL, Stovall JL, Luy BE, Haller AA, Osorio JE, Eggemeyer LM, Irby-Moore S, Frey SE, Huang CY, Stinchcomb DT (2015) Safety and immunogenicity of a live attenuated tetravalent dengue vaccine candidate in flavivirus-naive adults: a randomized, Double-Blind Phase I Clinical Trial. *J Infect Dis*. doi:10.1093/infdis/jiv179
- Goni SE, Borio CS, Romano FB, Rota RP, Pilloff MG, Iserte JA, Tortorici MA, Stephan BI, Bilen MF, Ghiringhelli PD, Lozano ME (2010) Expression and purification of Z protein from Junin virus. *J Biomed Biotechnol* 2010:970491. doi:10.1155/2010/970491
- Guy B, Barrere B, Malinowski C, Saville M, Teyssou R, Lang J (2011) From research to phase III: preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* 29(42):7229–7241. doi:10.1016/j.vaccine.2011.06.094
- Kanesa-thasan N, Sun W, Kim-Ahn G, Van Albert S, Putnak JR, King A, Raengsakulrach B, Christ-Schmidt H, Gilson K, Zahradnik JM, Vaughn DW, Innis BL, Saluzzo JF, Hoke Jr CH (2001) Safety and immunogenicity of attenuated dengue virus vaccines (Aventis Pasteur) in human volunteers. *Vaccine* 19(23–24):3179–3188. doi:10.1016/S0264-410X(01)0002-02
- Kirkpatrick BD, Durbin AP, Pierce KK, Carmolli MP, Tibery CM, Grier PL, Hynes N, Diehl SA, Elwood D, Jarvis AP, Sabundayo BP, Lyon CE, Larsson CJ, Jo M, Lovchik JM, Luke CJ, Walsh MC, Frasier EA, Subbarao K, Whitehead SS (2015) Robust and balanced immune responses to all 4 dengue virus serotypes following administration of a single dose of a live attenuated tetravalent dengue vaccine to healthy. *Flavivirus-Naive Adults J Infect Dis*. doi:10.1093/infdis/jiv082
- Kitchener S, Nissen M, Nasveld P, Forrat R, Yoksan S, Lang J, Saluzzo JF (2006) Immunogenicity and safety of two live-attenuated tetravalent dengue vaccine formulations in healthy Australian adults. *Vaccine* 24(9):1238–1241. doi:10.1016/j.vaccine.2005.09.029
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC (2004) Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427(6972):313–319. doi:10.1038/nature02165
- Normile D (2013) Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science* 342(6157):415. doi:10.1126/science.342.6157.415
- Osorio JE, Velez ID, Thomson C, Lopez L, Jimenez A, Haller AA, Silengo S, Scott J, Boroughs KL, Stovall JL, Luy BE, Arguello J, Beatty ME, Santangelo J, Gordon GS, Huang CY, Stinchcomb DT (2014) Safety and immunogenicity of a recombinant live attenuated tetravalent dengue vaccine (DENVax) in flavivirus-naive healthy adults in Colombia: a randomised, placebo-controlled, phase I study. *Lancet Infect Dis* 14(9):830–838. doi:10.1016/S1473-3099(14)70811-4
- Rocha RP, Livonesi MC, Fumagalli MJ, Rodrigues NF, da Costa LC, Dos Santos MC, de Oliveira Rocha ES, Kroon EG, Malaquias LC, Coelho LF (2014) Evaluation of tetravalent and conserved synthetic peptides vaccines derived from Dengue virus Envelope domain I and II. *Virus Res* 188:122–127. doi:10.1016/j.virusres.2014.04.009
- Saade F, Petrovsky N (2012) Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines* 11(2):189–209. doi:10.1586/erv.11.188
- Sasaki S, Tsuji T, Hamajima K, Fukushima J, Ishii N, Kaneko T, Xin KQ, Mohri H, Aoki I, Okubo T, Nishioka K, Okuda K (1997) Monophosphoryl lipid A enhances both humoral and cell-mediated immune responses to DNA vaccination against human immunodeficiency virus type 1. *Infect Immun* 65(9):3520–3528
- Thomas SJ, Eckels KH, Carletti I, De La Barrera R, Dessy F, Fernandez S, Putnak R, Toussaint JF, Sun W, Bauer K, Gibbons RV, Innis BL (2013) A phase II, randomized, safety and immunogenicity study of a re-derived, live-attenuated dengue virus vaccine in healthy adults. *AmJTrop Med Hyg* 88(1):73–88. doi:10.4269/ajtmh.2012.12-0361
- Urata S, de la Torre JC (2011) Arenavirus budding. *Adv Virol* 2011:180326. doi:10.1155/2011/180326
- Villar L, Dayan GH, Arredondo-Garcia JL, Rivera DM, Cunha R, Deseda C, Reynales H, Costa MS, Morales-Ramirez JO, Carrasquilla G, Rey LC, Dietze R, Luz K, Rivas E, Miranda Montoya MC, Cortes Supelano M, Zambrano B, Langevin E, Boaz M, Tomieporth N, Saville M, Noriega F (2015) Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *N Engl J Med* 372(2):113–123. doi:10.1056/NEJMoa1411037
- Wegner GJ, Lee HJ, Corn RM (2002) Characterization and optimization of peptide arrays for the study of epitope-antibody interactions using surface plasmon resonance imaging. *Anal Chem* 74(20):5161–5168
- Wheeler CM, Bautista OM, Tomassini JE, Nelson M, Sattler CA, Barr E (2008) Safety and immunogenicity of co-administered quadrivalent human papillomavirus (HPV)-6/11/16/18 L1 virus-like particle (VLP) and hepatitis B (HBV) vaccines. *Vaccine* 26(5):686–696. doi:10.1016/j.vaccine.2007.11.043
- WHO/TDR (2009) Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition, WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1. WHO, Geneva