



# Papel da proteína Mx1 na resposta a interferons e no processo neoplásico

Brantis-de-Carvalho, C.E.<sup>1</sup>; Boldrin, P.E.G.<sup>1</sup>; Silva Júnior, W.A.<sup>2</sup>;  
Rahal, P.<sup>3</sup>; Tajara, E.H.<sup>4</sup>; Carraro, D.M.<sup>5</sup>; Camargo, A.A.<sup>6</sup>; Zanelli, C.F.<sup>1</sup>; Valentini, S.R.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina – USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

<sup>3</sup> IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

<sup>4</sup> Faculdade de Medicina – FAMERP, São José do Rio Preto, SP, Brasil. Instituto de Biociências – USP, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>5</sup> Hospital do câncer A.C. Camargo – Centro Médico e de pesquisa, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>6</sup> Instituto Ludwig de pesquisa para o Câncer no Hospital Oswaldo Cruz, São Paulo, SP, Brasil.

Recebido 20/10/2011 / Aceito 17/12/2011

## RESUMO

A proteína Mx1 é codificada por um gene induzido por interferon e compartilha a organização de seus domínios, a capacidade de homo-oligomerização e associação com membranas com as grandes dinaminas GTPases. A proteína Mx1 está envolvida na resposta contra um grande número de vírus de RNA, como aqueles pertencentes à família Bunivírus e o vírus influenza. Curiosamente, o gene *MX1* foi encontrado como silenciado por metilação em diversos processos neoplásicos, incluindo carcinomas de cabeça e pescoço de células escamosas. Neste cenário, o silenciamento gênico de *MX1* está associado à imortalização de uma série de linhagens celulares neoplásicas. Assim, Mx1 se destaca como uma das principais proteínas envolvidas nas respostas imunes induzidas por interferon e também desempenha um importante papel no controle do ciclo celular. Aqui discutimos os aspectos funcionais da proteína Mx1 abordando sua atividade antiviral, organização estrutural, envolvimento com neoplasias e, principalmente, os aspectos funcionais obtidos pela determinação de seus parceiros celulares.

**Palavras-Chave:** Interferons. MX1. JAK/STAT. Vírus. Neoplasia. PML-NBs. SUMOilação.

## INTRODUÇÃO

### Interferons

Apesar da descoberta dos interferons ter ocorrido há mais de 50 anos, o estudo dos mesmos se mantém até hoje

como uma área de pesquisa altamente atrativa. Atualmente, os interferons são divididos em três subfamílias: interferons dos Tipos I, II e III. A subfamília do tipo I compreende os interferons  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\omega$ ,  $\kappa$ , e  $\tau$ . A do tipo III é composta pelos interferons  $\lambda$ , também conhecidos como interleucinas IL-29 ( $\lambda 1$ ), IL-28a ( $\lambda 2$ ) e IL-28b ( $\lambda 3$ ), e possuem um “link” evolutivo com a família dos IFNs do tipo I. Essas subfamílias são descritas como mediadoras da potente atividade antiviral e do controle da proliferação celular. Finalmente, a subfamília do tipo II compreende somente o interferon  $\gamma$ , envolvido principalmente na modulação da resposta imune (Chawla-Sarkar et al., 2003; Caraglia et al., 2005; Bonjardim et al., 2009; Li et al., 2009).

A ação de interferons é mediada pela capacidade de induzirem à expressão de uma série de genes (>300 genes) por meio da ativação da via JAK/STAT (Bromberg, 2002; Calò et al., 2003; Chawla-Sarkar, 2003; Brand et al., 2005). Nesta via, a ligação de interferons do tipo I e III aos receptores formados pelas proteínas IFNAR1/IFNAR2 e IL-10R2/IFNLR1, respectivamente, leva à fosforilação e interação de STAT1 e STAT2. O heterodímero formado interage fisicamente com IRF9, formando o complexo conhecido como ISG3, que, através da interação com o elemento ISRE no DNA, promove a expressão de *MX1* e de outros genes importantes para a resposta de imunidade inata a vírus (Figura 1). Por outro lado, o interferon do tipo II liga-se ao receptor formado pelas proteínas IFNGR1/IFNGR2, levando à fosforilação das proteínas STAT1, STAT3, STAT5 as quais formam homodímeros que se ligam ao elemento GAS no DNA e promovem a expressão de uma série de outros genes (Aaronson, 2002; Uzé & Monneron, 2007; Sadler & Williams, 2008).

Neste contexto, interferons induzem à apoptose celular pela ativação de receptores de morte celular. Resumidamente, a sensibilização de células por interferons leva à indução da expressão de TRAIL/Apo2L e Fas/FasL, que recrutam e ativam FADD. A ativação de FADD gera a ativação da cascata de caspases iniciada pela clivagem de pro-caspase 8 em caspase 8, a qual, assim como TRAIL,

*Autor correspondente:* Dr. Sandro Roberto Valentini - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - Rodovia Araraquara-Jaú, Km1 CEP.14801-902 - Araraquara - SP - Brasil - fone: (16)3301-6996 - fax:(16)3301-6940 e-mail:valentsr@fcar.unesp.br

Fas/FasL e caspase 4, tem sua expressão induzida por interferons. Caspase 8 atua como protease sobre Bid, um membro pró-apoptótico da família Bcl2 de proteínas mitocondriais, resultando no rompimento do potencial mitocondrial e na liberação do citocromo C da mitocôndria para o citoplasma, que age como um cofator na estimulação da formação do complexo entre Apaf1 e caspase 9. Este complexo potencializa a ativação de caspase 3, que é seguida por alterações na simetria da membrana citoplasmática, pela clivagem de PARP, pela condensação da cromatina, pela fragmentação do DNA e, finalmente, pela morte celular (Ruiz-Ruiz et al., 2000; Chawla-Sarkar et al., 2001; Chen et al., 2001; De Veer et al., 2001; Chawla-Sarkar et al., 2003; Leaman et al., 2003).

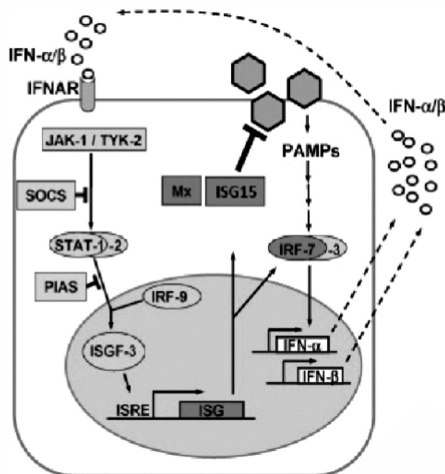


Figura 1. Sinalização por interferon (IFN). Os interferons  $\alpha$  e  $\beta$  ligam-se a seus receptores, presentes na superfície celular, e ativam a expressão de uma série de genes, através da fosforilação consecutiva das proteínas constituintes da via JAK/STAT de sinalização. Os genes expressos mediante a ligação ao receptor atuam nas diversas vias de ação dos interferons, entre eles, IRF-7 atua na amplificação do sinal mediado por receptores de PAMP (padrões moleculares associados a patógenos), levando à transcrição mediada por NF- $\kappa$ B, IRF-3, entre outros, elevando assim a produção e secreção de IFN pelas células. A sinalização por IFN sofre inibição por *feedback* mediada pelas proteínas das famílias SOCS e PIAS (Adaptada de Haller et al., 2007b).

Outro fator envolvido nos mecanismos de ação e regulação da resposta a interferons do tipo I e III é a sua capacidade em induzir à modificação de uma série de proteínas por ISG15 (Figura 2). A via de modificação pela proteína ISG15 se assemelha àquela utilizada por ubiquitina e SUMO-1, na qual a proteína é expressa na forma precursora, a qual é processada para expor a sequência de aminoácidos LRLRGG em sua porção C-terminal, necessária para sua correta ativação e conjugação. Os resíduos de glicina desta região, equivalentes aos de SUMO-1 e Ubiquitina, são adenilados e conjugados por meio de ligações tioéster a resíduos de cisteína de três enzimas: uma enzima de ativação de ubiquitina (E1, UBE1L), uma de conjugação (E2, UBE2E1 ou UBE2L6) e outra de ligação (E3), antes de ser transferida para um resíduo de lisina na proteína alvo. Duas E3 ubiquitinas ligases, HERC5 e TRIM25, foram identificadas por atuar na ligação de ISG15 à proteína alvo via domínio HECT e RING, respectivamente. Este

processo também foi caracterizado como reversível pela atuação de proteases ubiquitina-específicas denominadas USP2, USP3, USP5, USP13 e USP18. Entre as proteínas induzidas por interferon conhecidamente modificadas por ISG15 estão: JAK1, STAT1 e Mx1. Além de proteínas próprias, também foi demonstrado que algumas proteínas virais podem sofrer inibição de sua função via modificação por ISG15. A Figura 2 representa um esquema simplificado de como ocorre a conjugação de ISG15 à proteína alvo. Todas essas enzimas contêm alta homologia de sequência e estrutura com as enzimas envolvidas na via de ubiquitinação (Yuan & Krug, 2001; Zhao et al., 2004; Zhao et al., 2005; Sadler & Willians, 2008).

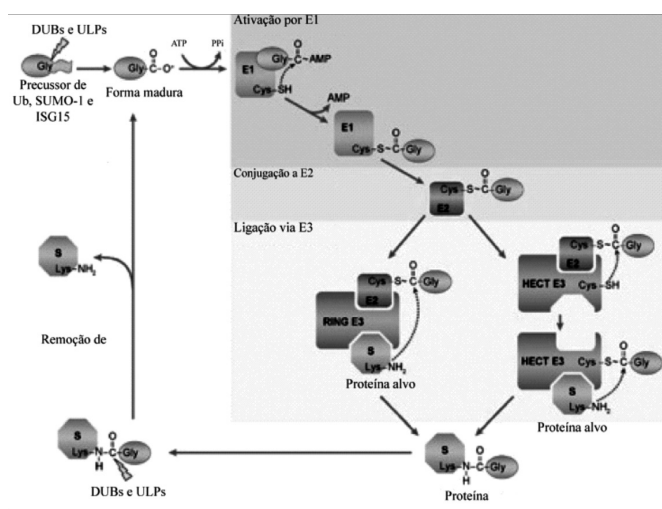


Figura 2. Esquema da conjugação da proteína Ubiquitina (Ub) e de proteínas semelhantes à Ubiquitina (Ubl: SUMO-1 e ISG15) à proteína alvo. Essas proteínas modificadoras são produzidas na forma de precursores inativos que sofrem a ação de proteases específicas (DUB - desubiquitinases ou ULP - Ubl Proteases específicas) para expor na região C-terminal o resíduo de glicina necessário para a formação da ligação tioéster com o resíduo de lisina na proteína alvo da modificação. Esta modificação ocorre em três etapas: (1) Ativação: as Ub e Ubls são ligadas por adenilação a um resíduo de cisteína da Enzima de ativação (E1), envolvendo o gasto de uma molécula de ATP; (2) Conjugação: Ub e Ubls são transferidas para a enzima de conjugação (E2) através de uma transtioilação e, (3) Ligação: Ub e Ubls sofrem a ação das enzimas de ligação (E3), formando a ligação do tipo tioéster com a proteína alvo. As E3 ligases podem atuar tanto mediante a transferência direta de Ub e Ubls para a proteína alvo (RING E3) ou ligando-se covalentemente às proteínas modificadoras antes de transferi-las para a proteína alvo (HECT E3). As Ub e Ubl podem ser removidas pelas proteases que atuam na sua ativação (Adaptado de Kerscher et al., 2006).

## A PROTEÍNA Mx1

### Aspectos estruturais

O gene *MX1* (myxovirus resistance 1), também chamado de *IFI78* (Interferon-inducible protein p78) ou *MxA* para o gene humano, encontra-se entre os genes conhecidos por sua expressão e atuação dependente da indução por interferons do tipo I e III, atuando como mediador da imunidade inata e na resistência a vírus de RNA (Bromberg, 2002; Calò et al., 2003; Brand et al., 2005; Haller et al., 2007a).

A proteína Mx1, um membro da superfamília de GTPases dinaminas, é estruturalmente organizada em domínio de ligação ao GTP (GTPase) e domínio central de interação (CID/MD), em sua porção N-terminal, e domínio efetor de GTPase (GED/LZ), em sua porção C-terminal. Essa família ainda inclui: a proteína dinamina-1 (huDYN1) - que, além dos domínios descritos para Mx1 (huMx1), possui ainda os domínios *pleckstrin homology domain* (PH) e o *proline-rich domain* (PRD). Esta família ainda inclui a proteína Mx2 de humano (huMx2), Mx1 de camundongos (muMx1) e a proteína dinamina-1 (huDYN1), entre outras proteínas (Figura 3A) (Holzinger et al., 2007; Haller et al., 2007a). Ainda quanto à estrutura de Mx1, foi demonstrado, através de ensaios de cristalização, que a região correspondente aos domínios CID e GED é estruturada em 6 alfa-hélices envolvidas na formação de uma única estrutura terciária final (Figura 3B), determinante para a correta formação do homo-oligômero de Mx1 (Gao et al., 2010; Haller et al., 2010).

O homo-oligômero de Mx1 é formado através da interação entre 16 monômeros, os quais se organizam em uma estrutura semelhante a um anel, onde o domínio globular de GTPase encontra-se na face externa do complexo e os domínios CID e GED na face interna (Figura 3C), coordenando a interação (Haller et al., 2010; Gao et al., 2010). Essa capacidade de oligomerização leva à formação de grânulos de Mx1 - frequentemente encontrados em associação com membranas celulares, como a do retículo endoplasmático em mamíferos - sendo necessária para a atividade de GTPase e a manutenção da estabilidade desta proteína, uma vez que uma forma mutada de Mx1 (L612K), incapaz de formar oligômeros, não possui atividade de GTPase e é degradada em aproximadamente duas horas, em contraste com a forma selvagem que tem aproximadamente meia vida de 24 horas (Janzen et al., 2000; Holzinger et al., 2007; Haller et al., 2007a).

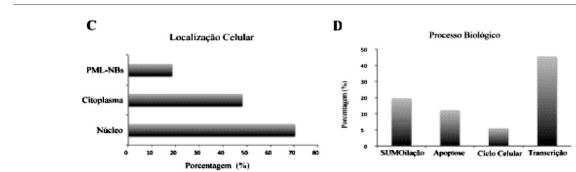
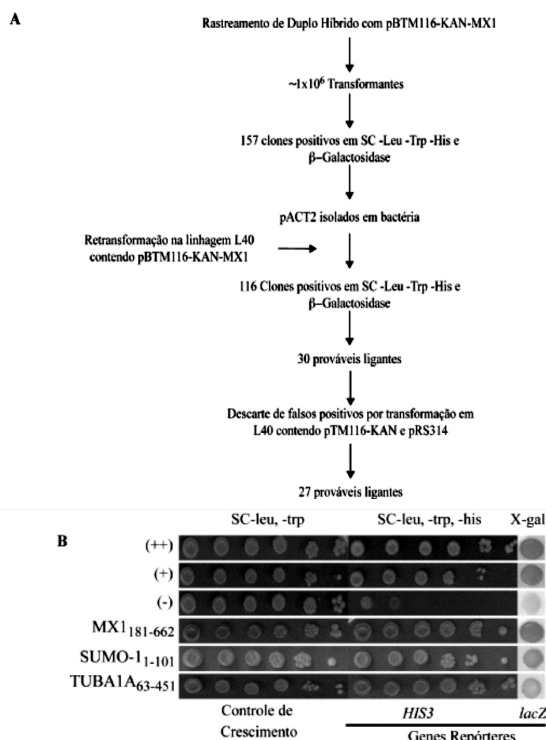


Figura 3. Domínios e estrutura das proteínas Mx e de seu homo-oligômero. (A) Comparação entre a organização dos domínios de Mx1 de humano (huMx1), Mx2 de humano (huMx2), Mx1 camundongos (muMx1) e dinamina-1 de humano (huDyn1). Estas proteínas apresentam os seguintes domínios: o domínio de ligação a GTP, que contém os “motifs” que coordenam a ligação à molécula de GTP (barras) e a região conhecida como domínio de autoassociação (SAD), envolvida na sua dimerização quando ligado à molécula de GTP; o domínio central de interação (CID/MD) e o domínio efetor de GTPase (GED), também chamando de *Zipper* de Leucina em huMx1 (LZ). Além desses, a proteína huDyn1 contém os domínios de ligação a membranas lipídicas (pleckstrin – PH) e o domínio rico em prolina (PR). (B) A estrutura do cristal obtido para a região correspondente aos domínios CID e GED de huMx1, denominado de “stalk”. As posições das alças encontradas e do domínio de ligação a GTP (GTPase) são indicadas na estrutura. (C) Modelo da estruturação do homo-oligômero de huMx1 onde 16 monômeros interagem gerando uma estrutura em anel, a região conhecida como “stalk” está presente no interior da estrutura, sendo a principal responsável pela sua formação enquanto o domínio de ligação a GTP (GTPase) é encontrado em uma posição mais externa à estrutura formada (Adaptado de Haller et al., 2007a e Haller et al., 2011).

Função na resposta imune

As proteínas Mx foram descobertas em estudos de resistência ao vírus da influenza realizados em camundongos, os quais mostraram que os animais isogênicos que apresentavam resistência ao vírus da influenza carregavam uma cópia funcional do gene *MX1* contido no cromossomo 16, ao passo que aqueles animais suscetíveis à infecção apresentavam depleções e/ou mutações que tornavam inativo tal gene (Lindenmann, 1962; Horisberger et al., 1983; Staeheli et al., 1988). Além da identificação de proteínas Mx em camundongo e humano, foram descritas proteínas similares em outros organismos vertebrados e invertebrados (Haller & Weber, 2009).

Como mediadora da resposta imune inata desencadeada por interferons, demonstrou-se a capacidade de Mx1 de inibir a replicação viral através do bloqueio do transporte dos nucleocapsídeos virais para o núcleo. Ainda, Mx1 de humanos apresenta um amplo espectro de atividade antiviral, sendo capaz de reconhecer e inibir vírus de replicação citoplasmática e nuclear, como no caso dos vírus pertencentes às famílias bunivírus, ortomixovírus, paramixovírus, rabdovírus, togavírus, entre outras (Haller et al., 2007b). Neste sentido, foi demonstrado que Mx1 não é capaz de impedir a síntese de RNAs virais, o que ocorre no núcleo celular, porém os experimentos conduzidos mostraram que não só a síntese de proteínas virais, mas também a de proteínas celulares é inibida pela presença de Mx1. Além disso, foi demonstrada a influência da oligomerização de Mx1 durante a resposta antiviral, em um mecanismo no qual um monômero de Mx1 se liga ao capsídeo viral e leva à oligomerização de Mx1 sobre a partícula, estabilizando a ligação, fixando o capsídeo



às membranas celulares e impedindo a ligação dos fatores necessários para a translocação nuclear das proteínas virais (Holzinger et al., 2007; Haller et al., 2007b; Haller et al., 2010).

A Tabela 1 apresenta um resumo das principais isoformas de Mx1 encontradas em vertebrados, sua localização celular e atividade antiviral relatada. Na Tabela 1 também é relatado o tipo de material genético encontrado em cada vírus e seu local de replicação. Como pode ser visto, a proteína citoplasmática Mx1 de humanos (huMx1) é capaz de inibir vírus com replicação nuclear, o que não ocorre em nenhum outro organismo testado até o momento.

**Tabela 1.** Atividade antiviral das proteínas Mx de diferentes organismos

Espécie	Proteína	Localização	Atividade antiviral	Ácido Nucleico	Replicação		
Humano	Mx1	Citoplasma	Influenza A	-ssRNA	Núcleo		
			Influenza B	-ssRNA	Núcleo		
			Influenza C	-ssRNA	Núcleo		
			Thogoto	-ssRNA	Núcleo		
			Parainfluenza Tipo 3	-ssRNA	Citoplasma		
			Febre do Vale Rift	-ssRNA	Citoplasma		
			La Crosse	-ssRNA	Citoplasma		
			Febre hemorrágica Criméia-Congo	-ssRNA	Citoplasma		
			Hantavírus	-ssRNA	Citoplasma		
			Estomatite Vesiculosa	-ssRNA	Citoplasma		
			Febre suína africana	dsDNA	Citoplasma		
			Hepatite B	dsDNA-RT	Núcleo		
			Rubeola	ssRNA	Citoplasma		
			Coxsackievírus	ssRNA	Citoplasma		
			Floresta Semliki	ssRNA	Citoplasma		
			Doença Infeciosa Bursal	ssRNA	Citoplasma		
Camundongos	Mx2	Núcleo/Citoplasma	Não apresenta				
	Mx1	Núcleo	Influenza A	-ssRNA	Núcleo		
			Influenza B	-ssRNA	Núcleo		
Thogoto			-ssRNA	Núcleo			
	Mx2	Citoplasma	Estomatite Vesiculosa	-ssRNA	Citoplasma		
			Hantavírus	-ssRNA	Citoplasma		
Rato	Mx1	Núcleo	Influenza A	-ssRNA	Núcleo		
			Thogoto	-ssRNA	Núcleo		
			Estomatite Vesiculosa	-ssRNA	Citoplasma		
	Mx2	Citoplasma	La Crosse	-ssRNA	Citoplasma		
			Febre do Vale Rift	-ssRNA	Citoplasma		
			Não apresenta				
Rato do Algodão	Mx1	Núcleo	Influenza A	-ssRNA	Núcleo		
			Mx2	Citoplasma	Estomatite Vesiculosa	-ssRNA	Citoplasma
					Febre do Vale Rift	-ssRNA	Citoplasma

#### Ligantes de Mx1

Na tentativa de desvendar a função celular da proteína Mx1, uma série de proteínas ligantes de Mx1 foram identificadas pelas mais diversas técnicas. Neste aspecto, foi demonstrada a interação física por duplo-híbrido e *in vitro* entre huMx1 e proteínas da família TRPC

(*Transient receptor potential channel* 1, 3, 4, 5, 6 e 7). Funcionalmente esta interação levou à observação de que, quando superexpressa concomitantemente com TRPC6 em células HEK293T, a proteína huMx1 leva ao aumento da atividade de entrada de Ca<sup>2+</sup> nas células e que mutantes de ligação a GTP - mas não os defectivos em atividade GTPásica - não apresentavam o mesmo comportamento

(Lussier et al., 2005). Assim sendo, huMx1 seria uma nova proteína envolvida nos mecanismos de controle das funções celulares atribuídas a íons de cálcio, como diferenciação, controle do ciclo celular e apoptose.

Ainda, foi revelado por rastreamento de duplo-híbrido com a proteína muMx1, que esta interage fisicamente com proteínas constituintes de corpúsculos nucleares denominados PML-NBs (Promyelocytic Leukaemia Nuclear Bodies), entre elas DAXX, SP100, TOPORS, BLM, TDG, FLASH, PIAS1 e proteínas da maquinaria de SUMOilação de proteínas Uba2 (E1) e SUMO-1 (Engelhardt et al., 2001), assim como a interação entre huMx1 e PKM/HIPK2 (Trost et al., 2000). Adicionalmente à identificação destas interações, foi demonstrado que homo-oligômeros da proteína muMx1 agrupam-se em grânulos distintos, porém em íntimo contato com os grânulos de PML (PML-NBs) e podem ser visualizados mesmo em células depletadas da proteína PML (Haller et al., 2007a). Assim, a presença de muMx1 em PML-NBs e a formação de grânulos de muMx1 podem estar relacionadas a estruturação de PML-NBs, uma vez que esta é capaz de ligar uma série de componentes deste corpúsculo.

Assim como as proteínas Mx, muitas das proteínas envolvidas na formação dos PML-NBs são transcricionalmente induzidas por interferons do tipo I e III. Tal fato é observado com as proteínas PML e SP100, entre outras, o que aponta para a possibilidade da atuação conjunta destas proteínas no desenvolvimento das respostas celulares à sensibilização por interferons. Além disso, vários dos componentes dos PML-NBs sofrem modificação por SUMO-1 (Figura 2) ou interagem fisicamente com proteínas SUMOiladas via “motif” de interação com SUMO1 (SIM – *SUMO interactive motif*), como a proteína DAXX. Outro fator interessante é a dependência da tripla SUMOilação e da presença de “motifs” SIM em PML, permitindo a interação física com os outros constituintes deste corpúsculo e, conseqüentemente, a formação de PML-NBs. Tais corpúsculos estão envolvidos em uma série de processos celulares como apoptose, controle de expressão gênica, mecanismos de reparo do DNA e resistência a vírus, o que demonstra a importância da SUMOilação de proteínas e da formação dos PML-NBs no controle destes processos (Lin, 2006; Bernardi et al., 2007; Haller et al., 2007a; Krieghoff-Henning & Hofmann, 2008).

Ainda, a SUMOilação pode afetar a localização celular, as interações entre proteínas, a estabilidade proteica e a atividade das proteínas alvo. Em um nível molecular, estas variáveis podem ocorrer por três diferentes mecanismos: primeiro, a SUMOilação pode esconder sítios de interação na proteína alvo, inibindo a interação entre esta e seus parceiros físicos; segundo, a SUMOilação pode criar novos sítios de ligação na proteína alvo e assim facilitar a ligação de outras moléculas como proteínas e DNA. Finalmente, se a proteína alvo também contiver um domínio de interação física com SUMO (SIM), isto pode levar à mudança em sua conformação e, conseqüentemente, em sua atividade (Meulmeester & Melchior, 2008).

Recentemente, nosso grupo realizou um rastreamento de duplo-híbrido com a proteína huMx1, visando elucidar o papel do silenciamento gênico causado pela hipermetilação de seu promotor no desenvolvimento e progressão de carcinomas de cabeça e pescoço (Calmon et al., 2009).

Neste caso, o ensaio de duplo-híbrido foi empregado para rastrear possíveis novos ligantes de huMx1 utilizando uma biblioteca de cDNAs de cérebro fetal humano, de acordo com o esquema apresentado na Figura 4A. Após as etapas de rastreamento, confirmação das interações e remoção de falsos negativos, foram identificados 27 ligantes prováveis (Figura 4A). A Figura 4B ilustra os resultados obtidos na confirmação da interação física entre huMx1 e proteínas previamente descritas como ligantes de muMx1: SUMO-1 (SUMO-1<sub>1-101</sub>), a própria proteína huMx1 (Mx1<sub>181-662</sub>) e TUBA1A (TUBA1A<sub>63-451</sub>) (Horisberger, 1992; Mushinski et al., 2009).

Os gráficos presentes na Figura 4C e 4D mostram os resultados obtidos na análise de ontologia genética dos 27 ligantes prováveis de huMx1 em termos de porcentagem da distribuição dos clones, segundo sua localização celular e envolvimento em processo biológico, respectivamente. A análise de ontologia genética mostrou que os ligantes estão principalmente envolvidos nos processos de regulação da transcrição, da apoptose e no controle do ciclo celular, assim como na SUMOilação de proteínas. Ainda, foram encontradas proteínas constituintes de PML-NBs e de localização nuclear e citoplasmática. Interessantemente, a análise ontológica das proteínas descritas como ligantes de muMx1 é semelhante à obtida para huMx1, independente da diferença de localização celular de Mx1 nesses dois organismos (Engelhardt et al., 2001; Trost et al., 2000).

Apesar de muitos dos ligantes encontrados para as proteínas Mx estarem relacionados à via de modificação pós-traducional de SUMO-1, não há descrição na literatura de que as proteínas Mx sejam SUMOiladas ou atuem diretamente na função desta via. Porém, foi descrito que huMx1 sofre duas modificações pela proteína ISG15 (Zhao et al., 2005), o que provavelmente altere sua capacidade de ligação e iniba a estruturação do homo-oligômero, gerando assim uma forma monomérica de Mx1.

Outro fato importante sobre huMx1 é a associação demonstrada entre as isoformas da proteína PML e a região de contato entre mitocôndrias e retículo endoplasmático, conhecida como membranas associadas a mitocôndrias (MAM). Assim, foi demonstrado que uma porção das proteínas PML (I-VI) não é translocada para o núcleo, podendo ser encontrada em diversos compartimentos citoplasmáticos, entre eles, a região de contato com mitocôndria (MAM) (Carracedo et al., 2011). Em estudo empregando fibroblastos de camundongos normais e depletados de PML (pml<sup>-/-</sup>), foi demonstrado que a presença de PML em associação com mitocôndrias é capaz de modular a liberação de íons Ca<sup>2+</sup> para a mitocôndria, regulando assim o processo apoptótico mediado por indutores conhecidos, como peróxido de hidrogênio, menadiona e tunicamicina (Giorgi et al., 2010). Como citado anteriormente, huMx1 interage fisicamente com proteínas da família TRPC, aumentando o influxo de cálcio (Lussier et al., 2005), interage com PML (Engelhardt et al., 2001), e seus grânulos citoplasmáticos se encontram em associação com a membrana do retículo endoplasmático (Accola et al., 2002; Kochs et al., 2005), o que sugere a possibilidade de Mx1 estar associada ao controle do processo apoptótico através da regulação da disponibilidade de cálcio intracelular ou na liberação deste para mitocôndrias.

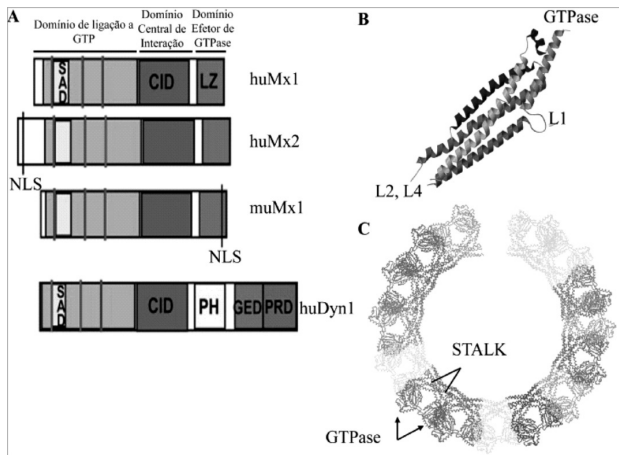


Figura 4. Caracterização funcional de MX1 através da determinação de seus ligantes. (A) Representação esquemática das etapas e resultados do rastreamento de duplo-híbrido em levedura realizado com Mx1 de humano. Neste rastreamento foi empregada uma biblioteca de cDNAs de cérebro fetal humano clonados no vetor pACT2, da qual foi possível isolar 27 prováveis ligantes de Mx1, após a eliminação de falsos positivos. (B) Resultados obtidos no teste de ativação dos genes repórteres HIS3 e lacZ da linhagem L40 de *S. cerevisiae* dos clones codificantes para Mx1 (181-662 aa), SUMO-1 (1-101 aa) e TUBA1A (63-451 aa), cuja interação com muMx1 já havia sido descrita em estudos anteriores. Um transformante de cada linhagem L40 contendo a combinação do plasmídeo pBTM116-KAN-MX1 com um dos plasmídeos isolados da biblioteca pACT2-MX1<sub>181-662</sub>, pACT2-SUMO-1<sub>1-101</sub> e pACT2-TUBA1A<sub>63-451</sub> foi cultivado nos meios de cultura SC-leu,-trp, SC-leu,-trp,-his e testados para atividade de  $\beta$ -galactosidase. L40/pBTM116-AMP-TIF51A + pACT-Dys1 (++), L40/pBTM116-AMP-TIF51A + pACT-Lial1(+), L40/pBTM116-AMP-TIF51A + pACT (-) e L40/pBTM116-KAN-MX1 + pACT (MX1+AD) foram utilizadas como controle positivo forte, positivo fraco e negativo, respectivamente. Após sequenciamento dos clones obtidos e identificação dos genes contidos nestes clones, foi realizada a análise de ontologia genética e agrupados de acordo com sua localização celular (C) e envolvimento em processos biológicos das proteínas codificadas pelos genes identificados (D).

#### Associação com câncer

O silenciamento de diversos genes de resposta a interferons foi relacionado ao processo de desenvolvimento neoplásico devido à sua influência no processo apoptótico (Kulaeva et al., 2003; Fridman et al., 2006). Neste sentido, foi descrito que o gene *MX1* se encontra metilado em carcinoma de células de leucemia mieloide aguda (Desmond et al., 2007), e que seu silenciamento está associado à progressão do câncer e ao fenótipo de imortalização em células tumorais (Kulaeva et al., 2003; Noser, 2007). Além disso, o gene *MX1* é pouco expresso em carcinoma de próstata, onde sua expressão foi ligada à inibição do fenótipo de motilidade e invasão celular (Schulz et al., 2007; Mushinski et al., 2009).

Em concordância com esses dados, nosso grupo identificou o gene *MX1* e este se encontra diferencialmente expresso em linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço (Calmon et al., 2009). Assim, a partir da utilização de uma biblioteca subtrativa de cDNAs obtida da linhagem FaDu (derivada de carcinoma espinocelular de faringe) pré e pós tratamento com o agente inibidor de metilação 5-aza-2'-desoxicitidina (5Aza-dC), foi possível determinar que o gene *MX1* encontrava-se silenciado por metilação na

linhagem FaDu. Após as etapas de validação do resultado inicial, a utilização das técnicas de microarray, PCRs metilação específica e qRT-PCR apontaram que, além da linhagem FaDu, esse gene também se encontrava metilado na linhagem UM-SCC-14A (linhagem derivada de carcinoma escamoso de assoalho de boca). Neste estudo, também foi determinado que há uma correlação estatística entre o aumento do tamanho do tumor e a hipermetilação de *MX1*.

Curiosamente, tratando-se de outras doenças, foi demonstrado uma situação oposta onde o aumento nos níveis de expressão de *MX1* confere uma maior sensibilidade à morte celular induzida por Fas/FasL, irradiação UV e infecção viral (Mibayashi et al., 2002) e que a superexpressão de *MX1* em células de alguns dos grupos de complementação da Anemia Fanconi, está relacionada ao fenótipo característico de indução de morte celular na medula óssea desta doença (Li & Youssoufian, 1997).

#### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Interferons estão entre as primeiras proteínas humanas a serem eficazes no tratamento do câncer e entre os primeiros produtos gerados pela tecnologia do DNA recombinante a serem usados em estudos clínicos (Chawla-Sarkar et al., 2003). Neste contexto, o IFN $\alpha$  é uma das citocinas mais usadas na terapia de diversas neoplasias como os mielomas, melanomas, carcinomas de células renais, tumores de cabeça e pescoço e de células epidermóides, tendo emergido como um importante regulador do crescimento e diferenciação de células cancerosas, afetando a comunicação celular e as vias de transdução de sinal (Caraglia et al., 2005).

Apesar dos efeitos benéficos dos interferons em algumas doenças malignas, mesmo em baixas condições de resposta, parte dos pacientes falha em responder ao tratamento. Assim, a ausência de resposta a interferons é tida como um importante fator no desenvolvimento neoplásico. De acordo com esta observação está o fato de que genes conhecidamente induzidos por interferons e com papel antitumoral foram descritos como diferencialmente metilados em diversas linhagens de células neoplásicas, as quais, após o tratamento com o agente desmetilante 5-azacitidina e interferons, apresentam fenótipos característicos de células apoptóticas, como aumento do tamanho celular e fragmentação de DNA (Karpf et al., 1999; Liang et al., 2002; Kulaeva et al., 2003). Assim, faz-se necessário um melhor entendimento dos mecanismos que mediam a ação antitumoral de interferons e dos fatores responsáveis pela ausência de resposta no tratamento de neoplasias.

De especial interesse, faz-se necessário entender o papel que Mx1 desempenha neste processo, pois seu silenciamento está relacionado à imortalização celular, o que provavelmente se deve à desregulação das vias de ação de interferons. Uma vez que Mx1 é capaz de interagir com as proteínas constituintes dos PML-NBs e da maquinaria de SUMOilação, levanta-se a possibilidade de Mx1 participar, via interferência no processo de SUMOilação, na formação dos PML-NBs, podendo atuar como E3 ligase de seus constituintes. Ainda, as demais investigações sobre seu papel devem buscar identificar a existência de outras modificações pós-traducionais por

SUMO-1 e definir os locais de modificação por ISG15 e como ambas influenciariam na atividade antiviral de Mx1 e na formação do homo-oligômero. Além disso, seria importante investigar a presença de variantes nucleares de Mx1, os quais justificariam a existência de parceiros físicos nucleares para a forma citoplasmática da proteína humana e a associação entre Mx1 e a apoptose desencadeada por Ca<sup>2+</sup> e as novas funções atribuídas à proteína PML.

## ABSTRACT

*Role of Mx1 protein in the response to interferons and neoplastic process*

**The Mx1 protein is encoded by an interferon-induced gene and shares domain organization, homo-oligomerization capacity and membrane association with the large dynamin-like GTPases. The Mx1 protein is involved in the response to a large number of RNA viruses, such as the bunyavirus family and the influenza virus. Interestingly, it has also been found as a methylation-silenced gene in several types of neoplasm, including head and neck squamous cell carcinoma. In this scenario, MX1 gene silencing is associated with immortalization in several neoplastic cell lines. Thus, Mx1 stands out as one of the key proteins involved in interferon-induced immune response and also plays an important role in cell cycle control. Here we discuss some of the functions of the Mx1 protein, including its antiviral activity, protein folding and involvement in neoplasia, as well as those revealed by investigating its cellular partners.**

Keywords: Interferons. MX1. JAK/STAT. Virus. Neoplasia. PML-NBs. SUMOylation.

## REFERÊNCIAS

- Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science*. 2002; 296(5573):1653–5.
- Accola MA, Huang B, Masri Al A, McNiven MA. The antiviral dynamin family member, MxA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2002; 277(24):21829–35.
- Bernardi R, Pandolfi PP. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8(12):1006–16.
- Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG. Interferons: signaling, antiviral and viral evasion. *Immunol Lett*. 2009; 122(1):1–11.
- Brand S, Zitzmann K, Dambacher J, Beigel F, Olszak T, Vlotides G, et al. SOCS-1 inhibits expression of the antiviral proteins 2',5'- $\beta$ OAS and MxA induced by the novel interferon-lambdas IL-28A and IL-29. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 331(2):543–8.
- Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest*. 2002; 109(9):1139–42.
- Calmon MF, Rodrigues RV, Kaneto CM, Moura RP, Silva SD, Mota LDC, et al. Epigenetic Silencing of CRABP2 and MX1 in Head and Neck Tumors. *Neoplasia*. 2009; 11(12):1329–39.
- Calò V, Migliavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, et al. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol*. 2003; 197(2):157–68.
- Caraglia M, Marra M, Pelaia G, Maselli R, Caputi M, Marsico SA, et al. Alpha-interferon and its effects on signal transduction pathways. *J Cell Physiol*. 2005; 202(2):323–35.
- Carracedo A, Ito K, Pandolfi PP. The nuclear bodies inside out: PML conquers the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol*. 2011; 23(3):360–6.
- Chawla-Sarkar M, Lindner D, Liu Y, Williams B, Sen G, Silverman R, et al. Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis*. 2003; 8(3):237–49.
- Chawla-Sarkar M, Leaman DW, Borden EC. Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)-beta compared with IFN-alpha2: correlation with TRAIL/Apo2L induction in melanoma cell lines. *Clin Cancer Res*. 2001; 7(6):1821–31.
- Chen Q, Gong B, Mahmoud-Ahmed AS, Zhou A, Hsi ED, Hussein M, et al. Apo2L/TRAIL and Bcl-2-related proteins regulate type I interferon-induced apoptosis in multiple myeloma. *Blood*. 2001; 98(7):2183–92.
- Desmond JC, Raynaud S, Tung E, Hofmann W-K, Haferlach T, Koeffler HP. Discovery of epigenetically silenced genes in acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2007; 21(5):1026–34.
- Engelhardt O. Interferon-Induced Antiviral Mx1 GTPase Is Associated with Components of the SUMO-1 System and Promyelocytic Leukemia Protein Nuclear Bodies. *Exp Cell Res*. 2001; 271(2):286–95.
- Fridman AL, Tang L, Kulaeva OI, Ye B, Li Q, Nahhas F, et al. Expression profiling identifies three pathways altered in cellular immortalization: interferon, cell cycle, and cytoskeleton. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2006; 61(9):879–89.
- Gao S, Malsburg von der A, Paeschke S, Behlke J, Haller O, Kochs G, et al. Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA. *Nature*. 2010; 465(7297):502–6.
- Giorgi C, Ito K, Lin H-K, Santangelo C, Wieckowski MR, Lebedzińska M, et al. PML regulates apoptosis at endoplasmic reticulum by modulating calcium release. *Science*. 2010; 330(6008):1247–51.
- Haller O, Weber F. The interferon response circuit in antiviral host defense. *Verh K Acad Geneesk Belg*. 2009; 71(1-2):73–86.

- Haller O, Kochs G. Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. *J Interferon Cytokine Res.* 2011; 31(1):79–87.
- Haller O, Gao S, Malsburg von der A, Daumke O, Kochs G. Dynamin-like MxA GTPase: structural insights into oligomerization and implications for antiviral activity. *J Biol Chem.* 2010; 285(37):28419–24.
- Haller O, Stertz S, Kochs G. The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins. *Microbes Infect.* 2007a; 9(14-15):1636–43.
- Haller O, Kochs G, Weber F. Interferon, Mx, and viral countermeasures. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007b; 18(5-6):425–33.
- Holzinger D, Jorns C, Stertz S, Boisson-Dupuis S, Thimme R, Weidmann M, et al. Induction of MxA Gene Expression by Influenza A Virus Requires Type I or Type III Interferon Signaling. *J Virol.* 2007; 81(14):7776–85.
- Horisberger MA. Interferon-induced human protein MxA is a GTPase which binds transiently to cellular proteins. *J Virol.* 1992; 66(8):4705–9.
- Horisberger MA, Staeheli P, HALLER O. Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983; 80(7):1910–4.
- Janzen C, KOCHS G, HALLER O. A monomeric GTPase-negative MxA mutant with antiviral activity. *J Virol.* 2000; 74(17):8202–6.
- Karpf AR, Peterson PW, Rawlins JT, Dalley BK, Yang Q, Albertsen H, et al. Inhibition of DNA methyltransferase stimulates the expression of signal transducer and activator of transcription 1, 2, and 3 genes in colon tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(24):14007–12.
- Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M. Modification of Proteins by Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006; 22(1):159–80.
- Kochs G, Reichelt M, Danino D, Hinshaw J, Haller O. Assay and Functional Analysis of Dynamin-Like Mx Proteins. *Methods Enzymol.* 2005; 404:632–43.
- Krieghoff-Henning E, Hofmann TG. Role of nuclear bodies in apoptosis signalling. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Res.* 2008; 1783(11):2185–94.
- Kulaeva OI, Draghici S, Tang L, Kraniak JM, Land SJ, Tainsky MA. Epigenetic silencing of multiple interferon pathway genes after cellular immortalization. *Oncogene.* 2003; 22(26):4118–27.
- Leaman DW, Chawla-Sarkar M, Jacobs B, Vyas K, Sun Y, Ozdemir A, et al. Novel growth and death related interferon-stimulated genes (ISGs) in melanoma: greater potency of IFN-beta compared with IFN-alpha2. *J. Interferon Cytokine Res.* 2003; 23(12):745–56.
- Li M, Liu X, Zhou Y, Su SB. Interferon- $\gamma$ : the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses. *J Leukoc Biol.* 2009; 86(1):23–32.
- Li Y, Yousoufian H. MxA overexpression reveals a common genetic link in four Fanconi anemia complementation groups. *J Clin Invest.* 1997; 100(11):2873–80.
- Liang G, Gonzales FA, Jones PA, Orntoft TF, Thykjaer T. Analysis of gene induction in human fibroblasts and bladder cancer cells exposed to the methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* 2002; 62(4):961–6.
- Lin D-Y, Huang Y-S, Jeng J-C, Kuo H-Y, Chang C-C, Chao T-T, et al. Role of SUMO-Interacting Motif in Daxx SUMO Modification, Subnuclear Localization, and Repression of Sumoylated Transcription Factors. *Mol Cell.* 2006; 24(3):341–54.
- Lindenmann J. Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus. *Virology.* 1962; 16:203–4.
- Lussier MP. MxA, a Member of the Dynamin Superfamily, Interacts with the Ankyrin-like Repeat Domain of TRPC. *J Biol Chem.* 2005; 280(19):19393–400.
- Meulmeester E, Melchior F. Cell biology: SUMO. *Nature.* 2008; 452(7188):709–11.
- Mibayashi M, Nakad K, Nagata K. Promoted cell death of cells expressing human MxA by influenza virus infection. *Microbiol Immunol.* 2002; 46(1):29–36.
- Mishra RK. Dynamin Interacts with Members of the Sumoylation Machinery. *J Biol Chem.* 2004; 279(30):31445–54.
- Mushinski JF, Nguyen P, Stevens LM, Khanna C, Lee S, Chung EJ, et al. Inhibition of tumor cell motility by the interferon-inducible GTPase MxA. *J Biol Chem.* 2009; 284(22):15206–14.
- Noser JA, Mael AA, Sakuma R, Ohmine S, Marcato P, WK Lee P, et al. The RAS/Raf1/MEK/ERK Signaling Pathway Facilitates VSV-mediated Oncolysis: Implication for the Defective Interferon Response in Cancer Cells. *Mol Ther.* 2007; 15(8):1531–6.
- Ruiz-Ruiz C, Muñoz-Pinedo C, López-Rivas A. Interferon-gamma treatment elevates caspase-8 expression and sensitizes human breast tumor cells to a death receptor-induced mitochondria-operated apoptotic program. *Cancer Res.* 2000; 60(20):5673–80.
- Sadler AJ, Williams BRG. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(7):559–68.
- Schulz WA, Alexa A, Jung V, Hader C, Hoffmann MJ, Yamanaka M, et al. Factor interaction analysis for chromosome 8 and DNA methylation alterations highlights innate immune response suppression and cytoskeletal changes in prostate cancer. *Mol Cancer.* 2007; 6:14.
- Staeheli P, Grob R, Meier E, Sutcliffe JG, HALLER O. Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a



large deletion or a nonsense mutation. *Mol Cell Biol.* 1988; 8(10):4518–23.

Trost M, Kochs G, Haller O. Characterization of a novel serine/threonine kinase associated with nuclear bodies. *J Biol Chem.* 2000; 275(10):7373–7.

Uzé G, Monneron D. IL-28 and IL-29: Newcomers to the interferon family. *Biochimie.* 2007; 89(6-7):729–34.

de Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM, et al. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol.* 2001; 69(6):912–20.

Yuan W, Krug RM. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *EMBO J.* 2001; 20(3):362–71.

Zhao C, Denison C, Huibregtse JM, Gygi S, Krug RM. Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(29):10200–5.

Zhao C, Beaudenon SL, Kelley ML, Waddell MB, Yuan W, Schulman BA, et al. The UbcH8 ubiquitin E2 enzyme is also the E2 enzyme for ISG15, an IFN-alpha/beta-induced ubiquitin-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(20):7578–82.

