

INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

# **ESTUDO DO TRÁFEGO NUCLEOCITOPLASMÁTICO DO VÍRUS DA HEPATITE DELTA**

**NATÁLIA MARIA BEZERRA DE FREITAS**

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS,  
ESPECIALIDADE DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ORIENTADOR: PROF. DOUTOR CELSO CUNHA

LISBOA  
2009



## AGRADECIMENTOS

---

Gostaria de agradecer a todos os que directa ou indirectamente contribuíram para a concretização deste projecto/tese.

O meu mais profundo agradecimento é dirigido ao Prof. Doutor Celso Cunha, pela orientação, confiança, motivação nas horas difíceis, pela partilha e sobretudo pela amizade.

Gostaria de agradecer a todos os membros da Unidade de Biologia Molecular, destacando o contributo inestimável da Carolina Alves.

Não posso deixar de dirigir um agradecimento especial à D. Fernanda. O meu sincero obrigada pelos inúmeros gestos de carinho.

Uma nota de apreço a duas meninas lindas por ajudarem a pintar as paredes do laboratório.

Gostaria, também, de agradecer à entidade financiadora, Fundação para a Ciência e a Tecnologia, pela atribuição de uma bolsa de doutoramento e pelos subsídios facultados para participação em encontros científicos.

Por último, gostaria de agradecer aos meus pais, à família, à Inês, ao Pedro, à Louise, a todos os meus amigos, à Misha e à Vicky, pelo amor incondicional, sem dispersão estatística.



## RESUMO

---

O vírus da hepatite delta (HDV) é o agente etiológico responsável pelas formas mais graves e mortais de doença viral hepática para as quais não existe uma terapia eficaz.

O virião do HDV é formado por uma molécula de RNA circular e de cadeia simples associada a múltiplas cópias do antígeno delta e pelos antígenos de superfície do HBV (HBsAg). Os HBsAgs são glicoproteínas associadas ao retículo endoplasmático das células e são indispensáveis para a montagem e empacotamento de partículas delta infecciosas capazes de infecção e transmissão.

A replicação do genoma do HDV ocorre no núcleo das células por um mecanismo de círculo rolante, onde o RNA genómico do vírus serve de molde à síntese de moléculas multiméricas de RNA antigenómico, as quais possuem actividade ribozímica e se auto-clivam a intervalos precisos. Após clivagem, os antigenomas monoméricos religam-se e servem de molde à síntese de novas cadeias de RNA genómico por um mecanismo semelhante. Tanto o RNA como os HDAs acumulam-se preferencialmente no núcleo das células. No entanto, a interacção das RNPs do HDV com os HBsAgs tem lugar exclusivamente no citoplasma. Foi demonstrado que as RNPs do HDV fazem um vai-vém contínuo entre o núcleo e o citoplasma e que a exportação nuclear das RNPs virais é um processo independente da presença de HBsAg, sendo mediado pelo RNA do HDV. O mecanismo oposto, ou seja, a importação das RNPs do HDV é um mecanismo mediado pelos antígenos delta que envolve o reconhecimento de sinais de localização nuclear pelas proteínas celulares especializadas no transporte nuclear através do poro nuclear.

O presente trabalho teve como objectivo identificar os sinais presentes no RNA do HDV e nos HDAGs, e as proteínas celulares envolvidas no transporte núcleo-citoplasmático das RNPs do vírus. Com o objectivo de identificar os elementos de exportação nuclear presentes no RNA do HDV procedeu-se à construção e expressão de uma série de mutantes de deleção de um plasmídeo (pDL542) que codifica exclusivamente para o RNA genómico do vírus. Para a construção dos mutantes de deleção utilizou-se uma abordagem que se baseia na utilização da exonuclease III (Exo III). Os cDNAs do HDV com dimensões progressivamente menores, resultantes da digestão com a Exo III, foram clonados e utilizados para transfectar células Huh7. A identificação dos RNAs defectivos na exportação nuclear foi efectuada por comparação do padrão de distribuição intracelular de cada mutante de deleção com a localização do RNA genómico do HDV do tipo selvagem, através de experiências de hibridação *in situ*.

A presença de sinais de exportação nuclear no RNA do HDV foi também estudada por quantificação dos níveis de expressão da proteína CAT em extractos de células transfectadas com o vector repórter pDM138, no qual foram inseridos vários fragmentos de cDNA que codificam para diferentes partes do RNA genómico e antigenómico do vírus. Como resultado da transcrição do vector repórter pDM138 são produzidos mRNAs que possuem a ORF da proteína CAT inserida numa região intrónica do genoma do HIV-1. A exportação e acumulação citoplasmática destes mRNAs depende da presença de sequências funcionais na exportação e está correlacionada com o aumento dos níveis da expressão da proteína CAT. Deste modo, a presença de um sinal de exportação numa sequência de RNA pode ser facilmente investigada por quantificação da proteína repórter CAT.

O estudo da distribuição intracelular dos RNAs produzidos a partir dos mutantes de deleção do plasmídeo pDL542 não permitiu identificar nenhuma sequência no RNA genómico do vírus essencial para a exportação nuclear, uma vez que todos os mutantes de deleção do RNA genómico do HDV apresentam o mesmo padrão de distribuição intracelular do RNA genómico do tipo selvagem. No entanto, registou-se uma redução significativa no número de células transfectadas em que o RNA viral foi detectado no citoplasma, quando se analisaram as formas truncadas do RNA genómico sem as sequências compreendidas entre os nucleótidos 1211 e 1487, e 476 e 512.

Os resultados dos ensaios de quantificação da expressão da proteína CAT após transfecção de células Huh7 com os vectores pDM138 que codificam para diferentes partes do RNA genómico do HDV mostraram a presença de três sequências no genoma do vírus capazes de causar um aumento na expressão da proteína CAT superior ao observado em células

transfectadas com o vector pDM138 parental. Duas das sequências analisadas (nt 1191-1414 e 415-613) sobrepõem-se parcialmente com as regiões identificadas no genoma do HDV, na ausência das quais se observa uma redução significativa na percentagem de células com marcação citoplasmática. Em conjunto, estes resultados poderão indicar que o RNA genómico possui mais do que um elemento *cis* envolvido na exportação nuclear e que a eficiência do transporte do núcleo para o citoplasma está relacionada com o número de sinais de exportação presentes no genoma do vírus.

A aplicação da mesma abordagem experimental para a pesquisa de sinais de exportação no antigenoma do HDV mostrou que este RNA viral possui um elemento *cis*, situado entre os nt 1263 a 1466, funcionalmente equivalente ao PRE do HBV. A actividade do sinal de exportação do antigenoma do HDV parece depender, da orientação da sequência identificada em relação à ORF da proteína CAT e da exportina CRM1. Demonstrou-se ainda, que o aumento da expressão da proteína repórter, induzido pela sequência compreendida entre os nt 1263 e 1466 do RNA antigenómico do HDV, resulta da exportação e acumulação citoplasmática de mRNAs repórter contendo a ORF da proteína CAT inserida no intrão.

Estes ensaios foram conduzidos na ausência de replicação viral e conseqüente acumulação dos HDAG, sugerindo que os antígenos delta não são necessários para o transporte do RNA antigenómico do HDV do núcleo para o citoplasma. A análise funcional do elemento de exportação no transporte do RNA antigenómico para o citoplasma foi efectuada por comparação da distribuição intracelular do antigenoma do HDV com e sem o sinal de exportação nuclear. A redução de 60% na proporção de RNA no citoplasma em relação à quantidade de RNA antigenómico nas fracções nucleares, avaliada por qRT-PCR, mostra que o sinal de exportação situado entre os nt 1263 e 1466 altera a distribuição do antigenoma do HDV. Adicionalmente, utilizando uma abordagem similar demonstrou-se que os RNAs genómicos e antigenómicos do HDV, na ausência de replicação do vírus, são exportados em quantidades semelhantes.

A abordagem utilizada para a identificação das sequências de aminoácidos do HDAG necessárias para a importação nuclear consistiu na expressão de diferentes subregiões do cDNA do HDAG clonadas na mesma grelha de leitura do gene da proteína repórter *c-myc*-PK que, na ausência de NLS funcionais, se acumula exclusivamente no citoplasma das células. Após análise detalhada dos aminoácidos do HDAG necessários e suficientes para promover a importação nuclear da proteína *c-myc*-PK confirmou-se a importância do NLS identificado na localização intracelular do HDAG nativo.

Neste trabalho, obtiveram-se evidências sólidas que a importação nuclear do HDAg é dirigida por um único NLS, constituído por uma sequência contínua de 10 aminoácidos (EGAPPAKRAR), que se situam nas posições 66 a 75 na proteína. Esta sequência corresponde ao primeiro domínio do NLS bipartido anteriormente identificado no HDAg como sendo essencial para a importação nuclear de uma proteína repórter, diferindo apenas pela presença de um resíduo de ácido glutâmico adicional. Foi ainda demonstrado, que o NLS do HDAg não é específico para células hepáticas. As experiências de cromatografia de afinidade e de espectrometria de massa realizadas com o objectivo de identificar as proteínas celulares que interagem especificamente com o NLS do HDAg não permitiram elucidar o mecanismo pelo qual o antigénio delta é importado para o núcleo. Contudo, a identificação de proteínas de ligação a elementos do citoesqueleto poderá indicar o envolvimento desta estrutura no mecanismo de importação nuclear dos HDAg e das RNPs do HDV.

## ABSTRACT

---

The hepatitis delta virus is the causative agent of one of the most severe and mortal forms of virus-induced liver disease for which there is no effective treatment.

HDV infectious particles consist of a circular ssRNA molecule of about 1.7 Kb, small and large delta antigens, and hepatitis B surface antigens (HBsAgs). The HBsAgs are localised in the cytoplasm inside the endoplasmic reticulum and are essential in assembly of hepatitis delta virus particles capable of infection and transmission.

HDV genome replication occurs in the nucleus via a rolling-circle mechanism where the incoming genome serves as a template for production of complementary multimeric antigenomic RNA that harbour ribozymes capable of self-cleaving at precise monomeric intervals. After cleavage, the resulting monomeric antigenomes recircularize and are used as templates for genome synthesis by a similar mechanism. Both HDV RNA and HDAg accumulate preferentially in the cell nucleus. Nevertheless, the interaction between HDV RNPs and HBsAgs takes place in the cytoplasm. It was shown that HDV RNPs shuttle continuously between the nucleus and the cytoplasm and nuclear export of HDV RNPs is a mechanism independent of the presence of HBsAgs, possibly being mediated by the virus RNA. In contrast, HDV RNPs nuclear import is a process mediated by HDAg that relies on nuclear localization signal recognition by the cellular proteins specialised in the nuclear transport across the nuclear pore.

The main objective of this work was to identify the signals present on the HDV RNA and HDAgs, and the cellular proteins involved in the nucleocytoplasmic traffic of HDV RNPs.

In order to identify the *cis* elements responsible for HDV RNA export we constructed and expressed a series of sequential deletion mutants of a plasmid (pDL542) that exclusively encodes for the genomic HDV RNA. For the construction of HDV cDNA deletion mutants we employed a strategy that utilizes the enzyme Exo III. The resulting cDNAs fragments were then subcloned and used to transfect Huh7 cells. The screening procedure to identify virus RNAs

defective in nuclear export was performed comparing the intracellular distribution pattern of each deletion mutant to the wild type HDV genomic RNA.

The presence of export signals on HDV RNA was further investigated by quantification of CAT protein expression after transfection of Huh7 cells with pDM138 reporter plasmids containing several cDNA fragments that code for different parts of genomic and antigenomic HDV RNA. The mRNA molecules derived by transcription of pDM138 reporter plasmid contain the CAT gene inserted within the second intron of HIV-1 sequence. Export and cytoplasmic accumulation of the unspliced reporter mRNAs depends on the presence of a functional transport element and is correlated to an increase in CAT protein expression. Therefore, the export activity of a RNA sequence can be easily determined by quantifying the CAT protein expression levels after transfection.

Analysis of intracellular distribution pattern by *in situ* hybridization assays of the HDV RNAs produced by plasmid pDL542 deletion mutants did not allow us to identify any sequence motifs essential for HDV RNA nuclear export. All of the deletion mutants analysed displayed the same pattern of distribution as observed for wild type HDV genomic RNA. However, we noticed a significant reduction in the number of cells displaying cytoplasmic staining when HDV RNA deletion mutants without the sequences comprising nucleotides 1211 to 1487 and 476 to 512 were analysed.

Quantification of CAT protein expression after transfection with pDM138 vectors coding for different parts of genomic HDV RNA showed the presence of three sequences in the virus genome capable of enhancing CAT protein expression above the background level detected in cells transfected with empty plasmid pDM138. Two of the sequences tested (nt 1191-1414 and 415-613) partially overlap the regions identified in genomic HDV RNA by deletion analysis that cause a reduction in the percentage of cells displaying cytoplasmic staining for virus RNA.

Taking together, these studies suggest that HDV genome possibly contains more than one nuclear export signal and the efficiency of HDV RNA nuclear export may be related to the number of export signals present in virus genome.

Using the same approach to search for export motifs in the virus antigenome we found that antigenomic HDV RNA contains a *cis* element, localised between nucleotides 1263 and 1466 that is functionally equivalent to HBV PRE. The activity of the HDV antigenome export signal seems to be orientation-dependent and may rely on CRM1 function. We also showed, that the increment in expression of the reporter protein induced by the sequence comprising nt 1263 to 1466 of antigenomic HDV RNA results from nuclear export and cytoplasmic accumulation of reporter mRNAs that carry the ORF of the reporter protein within the intron.

The experiments described above were conducted in the absence of viral replication and the consequent accumulation of HDAg, implying that delta antigens are not necessary for the transport of antigenomic HDV RNA from the nucleus to the cytoplasm.

The functional analysis of the identified transport element in transport of HDV antigenome to the cytoplasm was performed by comparing the intracellular distribution of antigenomic HDV RNA with or without the nuclear export signal, by qRT-PCR experiments. We observed, a 60% reduction in the proportion of RNA detected in the cytoplasm relative to the amount of antigenomic HDV RNA in the nuclear fractions of Huh7 cells transfected with a construct that expresses HDV antigenome without the export element. These results show that the sequence between nucleotides 1263 and 1466 interferes with intracellular distribution of HDV antigenome. Additionally, using an identical approach we demonstrated that genomic and antigenomic HDV RNA in the absence of virus replication are exported at similar amounts to the cytoplasm.

The strategy adopted for identification of the amino acid sequence in HDAg necessary for nuclear import consisted in expression of different portions of HDAg cDNA fused in frame with the coding sequence for c-myc-PK protein, which untagged to a functional NLS localises solely in the cytoplasm. After the identification and characterization of the minimal amino acid sequence in the delta antigen capable of promoting nuclear import of c-myc-PK we analysed the functional importance of the NLS identified here in the intracellular localization of the native HDAg.

We obtained strong evidence that nuclear import of HDAg is directed by a 10-amino acid NLS (EGAPPAKRAR), located in positions 66-75. This sequence corresponds to the first amino acid stretch, differing only in the presence of an additional glutamic acid residue, of a bipartite NLS previously identified in HDAg and considered to be essential for nuclear localization of a reporter protein.

We also demonstrated that HDAg NLS is not specific for hepatic cells. The affinity chromatography experiments followed by mass spectrometry performed in order to identify the cellular proteins that interact with the HDAg NLS did not allowed to elucidate the mechanism of HDAg nuclear import. However, the identification of cytoskeleton binding proteins as HDAg NLS interacting partners may indicate the involvement of this structure in the mechanism of HDAg and HDV RNPs nuclear import.



### ARTIGOS PUBLICADOS

**Freitas N.** and Cunha C. (2009). *Mechanisms and signals for the nuclear import of proteins*. Current Genomics (accepted).

Mota S., Mendes M., **Freitas N.**, Penque D., Coelho A. V. and Cunha C. (2008) *Proteome analysis of a human liver carcinoma cell line stably expressing hepatitis delta virus ribonucleoproteins*. Journal of Proteomics. Vol. 74, pp 616-627.

Alves C., **Freitas N.** and Cunha C. (2008) *Characterization of the nuclear localization signal of the hepatitis delta virus antigen*. Virology, Vol. 370, pp 12-21.

Cunha C., **Freitas N.** and Mota S. (2003). *Development in Hepatitis Delta Research*. The Internet Journal of Tropical Medicine. Volume 1 Number 2.

### MANUSCRITOS EM PREPARAÇÃO

**Freitas N.** and Cunha C. Identification of a constitutive nuclear export element in Hepatitis delta virus RNA



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

$\beta$ -2-MG	$\beta$ -2-microglobulina
$\beta$ -Gal	$\beta$ -galactosidase
aa	Aminoácido
ACN	Acetonitrilo
ADAR	Deaminase de adenosina
ALT	Alanina-transaminases
bp	Pares de bases
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Acetiltransferase do cloranfenicol
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
c-myc	Proteína proto-oncogênica c-myc

CTE	<i>Constitutive transport element</i>
DAPI	4,6-Diamino-2 fenilindole
DIG	Digoxigenina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase I	Desoxirribonuclease I
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
Exo III	Exonuclease III
FBS	Soro bovino fetal
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	Desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato
GST	Glutathione S-transferase
HBcAg	Antigénio do core do vírus da hepatite B
HBsAg	Antigénio de superfície do vírus da hepatite B
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HDAg	Antigénio delta
HDV	Vírus da hepatite delta
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana 1
hnRNP	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear
Hsc70	Proteína de choque térmico de 71 kDa, também denominada de HSPA8
IBB	Domínio de ligação à importina- $\beta$
Imp- $\alpha$	Importina- $\alpha$
Imp- $\beta$	Importina- $\beta$
INF- $\alpha$	Interferão- $\alpha$
INF-PEG	Interferão conjugado com polietileno glicol
kb	Quilo bases
kDa	Quilo Dalton
L-HDAg	Antigénio grande do vírus da hepatite delta
LMB	Leptomomicina B
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption/ionization</i>
Mat $\alpha$ 2	Proteína <i>mating-type</i> $\alpha$ 2
miRNA	microRNA
MIU	Milhões de unidades internacionais
MOPS	Ácido propanosulfónico
mRNA	RNA mensageiro
NEE	elemento de exportação nuclear
NES	Sinal de exportação nuclear
NF- $\kappa$ B p50	Subunidade p50 do factor de transcrição NF- $\kappa$ B

NF-κB p65	Subunidade p65 do factor de transcrição NF-κB
NLS	Sinal de localização nuclear
NP-40	Nonidet P-40
NPC	Complexo do poro nuclear
nt	Nucleótido
ORF	Grelha aberta de leitura
p53	Proteína p53
PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Solução salina tamponada por fosfatos
PCR	Reacção da polimerase em cadeia
PFA	Paraformaldeído
PK	Cinase do piruvato
PRE	Elemento regulador pós-transcricional do vírus da hepatite B
PVP	Polivinilpirrolidona
qRT-PCR	Transcrição Reversa-Reacção da polimerase em cadeia em tempo real
RanGDP	GTPase Ran ligada a GDP
RanGTP	GTPase Ran ligada a GTP
RBD	Domínio de ligação a RNA
RCC1	Factor de intercâmbio de GTP
RNA	Ácido ribonucleico
RNA pol II	RNA polimerase II
RNAi	RNA de interferência
RNase	Ribonuclease
RNP	Ribonucleoproteína
rplL23a	Proteína ribossomal L23a
rpm	Rotações por minuto
RRE	<i>Rev response element</i> do vírus da imunodeficiência humana 1
SDS	Dodecilsulfato de sódio
S-HDAg	Antigénio pequeno do vírus da hepatite delta
SREBP2	Proteína de ligação ao elemento regulador de estero 2
ssRNA	RNA de cadeia simples
SV40	Vírus símio 40
TOF	<i>Time of flight</i>
Triton X-100	Polioxietileno-t-octilfenol
tRNA	RNA de transferência
Tween 20	Monolaurato de polioxietileno 20 sorbitano
UsnRNA	Pequenos RNAs nucleares ricos em uridina
UsnRNP	Pequenas ribonucleoproteínas nucleares ricas em uridina
WHV	Vírus da hepatite de marmota
WPRE	Elemento regulador pós-transcricional do vírus da hepatite de marmota

## ÍNDICE GERAL

---

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	vii
PUBLICAÇÕES	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
ÍNDICE GERAL	xvi
ÍNDICE DE FIGURAS	xxi
ÍNDICE DE TABELAS	xxv

<b>CAPÍTULO I - O VÍRUS DA HEPATITE DELTA</b>	<b>1</b>
<b>I.1 INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>3</b>
I.1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS E EPIDEMIOLÓGICOS	3
I.1.2 TRATAMENTO	7
I.1.3 PREVENÇÃO CONTRA A INFECÇÃO PELO HDV	9
I.1.4 O GENOMA DO HDV E OS ANTIGÉNIOS DELTA	10
I.1.5 CICLO DE REPLICAÇÃO DO HDV	14
I.1.5.1 ENTRADA DO HDV NA CÉLULA HEPÁTICA	14
I.1.5.2 REPLICAÇÃO E TRANSCRIÇÃO DO GENOMA DO HDV	15
I.1.5.3 FORMAÇÃO DE PARTÍCULAS VIRAIS DO HDV	22
<b>CAPÍTULO II - EXPORTAÇÃO DO RNA DO HDV</b>	<b>23</b>
<b>II.1 INTRODUÇÃO</b>	<b>25</b>
II.1.1 O TRANSPORTE NÚCLEO-CITOPLASMÁTICO	25
II.1.2 RECEPTORES DE TRANSPORTE	26
II.1.3 MODELOS EXPLICATIVOS PARA O TRANSPORTE NUCLEAR	28
II.1.4 EXPORTAÇÃO NUCLEAR DE RNAs NÃO CODIFICANTES	30
II.1.4.1 A EXPORTAÇÃO NUCLEAR DO RNA DE TRANSFERÊNCIA (tRNA)	30
II.1.4.2 EXPORTAÇÃO NUCLEAR DE MICRORNAs (miRNAs)	34
II.1.4.3 EXPORTAÇÃO NUCLEAR DOS PEQUENOS RNAs RICOS EM URIDINA (U snRNAs)	35
II.1.4.4 EXPORTAÇÃO NUCLEAR DO RNA RIBOSSÓMICO (rRNA)	37
II.1.5 EXPORTAÇÃO NUCLEAR DE RNAs CODIFICANTES	40
II.1.5.1 EXPORTAÇÃO NUCLEAR DO RNA MENSAGEIRO (mRNA)	40
<b>II.2 OBJECTIVOS</b>	<b>47</b>
<b>II.3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>49</b>
II.3.1 CONSTRUÇÃO DE MUTANTES DE DELEÇÃO DO cDNA DO HDV	49
II.3.2 VECTORES	52
II.3.2.1 CLONAGEM DE FRAGMENTOS DE cDNA DO HDV NO VECTOR REPÓRTER pDM138	52
II.3.2.1.1 VECTOR REPÓRTER pDM138	52
II.3.2.1.2 VECTORES REPÓRTER pDM138-PRE(+) E pDM138-PRE(-)	53
II.3.2.1.3 CLONAGEM DO cDNA DO HDV NO VECTOR REPÓRTER pDM138	54

<b>II.3.2.1.4</b> CLONAGEM DE 8 FORMAS TRUNCADAS DA SEQUÊNCIA DE 1263 A 1466 DO cDNA ANTIGENÓMICO DO HDV NO VECTOR pDM138	57
<b>II.3.2.2</b> CLONAGEM DE FRAGMENTOS DO cDNA ANTIGENÓMICO DO HDV NO VECTOR pDL481	58
<b>II.3.2.2.1</b> CONSTRUÇÃO DO VECTOR pDL481 $\Delta$ NEE	60
<b>II.3.2.2.2</b> CONSTRUÇÃO DOS VECTORES pDL481 $\Delta\delta$ E pDL481 $\Delta$ NEE $\delta$	61
<b>II.3.3</b> CULTURA DE CÉLULAS EUCARIOTAS	62
<b>II.3.4</b> TRANSFEÇÃO TRANSITÓRIA DE CÉLULAS EUCARIOTAS	63
<b>II.3.5</b> QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA ACETILTRANSFERASE DO CLORANFENICOL DE <i>E. coli</i> EM EXTRACTOS CELULARES	64
<b>II.3.6</b> QUANTIFICAÇÃO DA ENZIMA $\beta$ -GALACTOSIDASE DE <i>E. coli</i> EM EXTRACTOS CELULARES	65
<b>II.3.7</b> NORTHERN BLOT	66
<b>II.3.7.1</b> MARCAÇÃO DE SONDAS DE DNA DE CADEIA SIMPLES POR PCR ASSIMÉTRICO COM DIGOXIGENINA-11-dUTP	66
<b>II.3.7.2</b> NORTHERN BLOT, GÉIS DE AGAROSE DESNATURANTES, TRANSFERÊNCIA, FIXAÇÃO E CONDIÇÕES DE HIBRIDAÇÃO	68
<b>II.3.8</b> RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL	69
<b>II.3.9</b> WESTERN BLOT	72
<b>II.3.10</b> HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i>	74
<b>II.3.10.1</b> MARCAÇÃO DE SONDAS POR <i>NICK-TRANSLATION</i> COM DIGOXIGENINA-11-dUTP	74
<b>II.3.10.2</b> HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i>	75
<b>II.3.11</b> MICROSCOPIA CONFOCAL	76
<b>II.3.12</b> IMUNOPRECIPITAÇÃO DE RIBONUCLEOPROTEÍNAS	77
<b>II.3.12.1</b> FIXAÇÃO DAS RNPs DO HDV E CONDIÇÕES DE IMUNOPRECIPITAÇÃO	77
<b>II.3.12.2</b> RT-PCR	79
<b>II.4 RESULTADOS</b>	<b>81</b>
<b>II.4.1</b> DISTRIBUIÇÃO INTRACELULAR DOS MUTANTES DE DELEÇÃO DO RNA GENÓMICO DO HDV	81
<b>II.4.2</b> IDENTIFICAÇÃO DO(S) ELEMENTO(S) DE EXPORTAÇÃO NUCLEAR PRESENTES NO RNA DO HDV	88
<b>II.4.2.1</b> CLONAGEM DO cDNA DO HDV NO VECTOR pDM138	88
<b>II.4.2.2</b> QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CAT EM EXTRACTOS PROTEICOS DE CÉLULAS Huh7	93
<b>II.4.2.3</b> CLONAGEM DE FRAGMENTOS DE cDNA DO HDV NO VECTOR pDM138	98
<b>II.4.2.4</b> ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE RNA GENÓMICO DO HDV NA EXPORTAÇÃO NUCLEAR DE mRNAs HETERÓLOGOS	99
<b>II.4.2.5</b> O RNA ANTIGENÓMICO DO HDV POSSUI UM ELEMENTO <i>CIS</i> FUNCIONALMENTE EQUIVALENTE AO PRE DO HBV	100

II.4.2.6 A EXPORTAÇÃO NUCLEAR DE mRNAs REPÓRTER MEDIADA PELO MOTIVO A7AS É SENSÍVEL À LEPTOMICINA	102
II.4.2.7 O AUMENTO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CAT RESULTA DA PRESENÇA DE mRNAs REPÓRTER NO CITOPLASMA	104
II.4.2.8 ANÁLISE DETALHADA DA SEQUÊNCIA DO ANTIGENOMA DO HDV NECESSÁRIA PARA PROMOVER A EXPORTAÇÃO NUCLEAR	106
II.4.3 A SEQUÊNCIA COMPREENDIDA ENTRE OS NUCLEÓTIDOS 1263 A 1466 ALTERA A DISTRIBUIÇÃO INTRACELULAR DO ANTIGENOMA DO HDV	110
II.4.4 A EXPORTINA CRM1 NÃO FORMA COMPLEXOS COM AS RNPs DO HDV	117
<b>II.5 DISCUSSÃO</b>	<b>121</b>
<b>CAPÍTULO III - IMPORTAÇÃO NUCLEAR DO HDAg</b>	<b>139</b>
<b>III.1 INTRODUÇÃO</b>	<b>141</b>
III.1.1 IMPORTAÇÃO NUCLEAR DE PROTEÍNAS	141
III.1.2 SINAIS DE LOCALIZAÇÃO NUCLEAR	142
III.1.3 VIAS DE IMPORTAÇÃO NUCLEAR DE PROTEÍNAS	145
III.1.4 A IMPORTAÇÃO NUCLEAR DO ANTIGÊNIO DELTA	152
<b>III.2 OBJECTIVOS</b>	<b>155</b>
<b>III.3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>157</b>
III.3.1 VECTORES	157
III.3.1.1 VECTOR pcDNA1-c-myc-PK	157
III.3.1.2 CLONAGEM DE SEQUÊNCIAS DE cDNA DO HDAg NO VECTOR pcDNA1-c-myc-PK	158
III.3.1.3 CONSTRUÇÃO DO VECTOR pGFP-C1-S-HDAgΔNLS	162
III.3.1.4.1 CONSTRUÇÃO DO VECTOR pCl-neo-S-HDAg	163
III.3.1.4.2 CONSTRUÇÃO DO VECTOR pCl-neo-S-HDAgΔNLS	164
III.3.1.4.3 CONSTRUÇÃO DO VECTOR pCl-neo-S-HDAgE66A	164
III.3.2 CULTURA E TRANSFECCÃO TRANSITÓRIA DE CÉLULAS EUCARIOTAS	165
III.3.3 IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRECTA	165
III.3.4 MICROSCOPIA	166
III.3.5 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM <i>E. coli</i>	167
III.3.5.1 CONSTRUÇÃO DO VECTOR pGEX-6p-2-3X-HDAg-NLS	167
III.3.5.2 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO GST	168
III.3.5.3 PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	168

<b>III.3.5.4</b>	<b>SDS-PAGE E WESTERN BLOT</b>	<b>169</b>
<b>III.3.6</b>	<b>PREPARAÇÃO DE EXTRACTOS PROTEICOS DE CÉLULAS Huh7 PARA ENSAIOS DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE</b>	<b>170</b>
<b>III.3.7</b>	<b>SELECÇÃO DE PROTEÍNAS COM AFINIDADE PARA O NLS DO HDAg</b>	<b>171</b>
<b>III.3.8</b>	<b>PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM TCA</b>	
<b>III.3.9</b>	<b>IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS COM AFINIDADE PARA O NLS DO HDAg</b>	<b>171</b>
<b>III.3.9.1</b>	<b>SDS-PAGE E COLORAÇÃO COM BRILLIANT BLUE G-250</b>	<b>171</b>
<b>III.3.9.2</b>	<b>PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ESPECTROMETRIA DE MASSA</b>	<b>172</b>
<b>III.3.9.3</b>	<b>ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF-TOF</b>	<b>173</b>
<b>III.4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>175</b>
<b>III.4.1</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DO SINAL DE LOCALIZAÇÃO NUCLEAR DO ANTIGÉNIO DELTA</b>	<b>175</b>
<b>III.4.1.1</b>	<b>O NLS BIPARTIDO DO HDAg, COMPREENDIDO ENTRE OS AMINOÁCIDOS 67 A 88, NÃO É SUFICIENTE PARA PROMOVER A IMPORTAÇÃO NUCLEAR DA PROTEÍNA <i>c-myc</i>-PK</b>	<b>175</b>
<b>III.4.1.2</b>	<b>OS AMINOÁCIDOS DA EXTREMIDADE N-TERMINAL DO HDAg NÃO SÃO NECESSÁRIOS PARA A LOCALIZAÇÃO NUCLEAR DA PROTEÍNA</b>	<b>178</b>
<b>III.4.1.3</b>	<b>OS AMINOÁCIDOS 34 A 44 DO HDAg NÃO SÃO CAPAZES DE PROMOVER A IMPORTAÇÃO DA PROTEÍNA <i>c-myc</i>-PK</b>	<b>180</b>
<b>III.4.1.4</b>	<b>OS AMINOÁCIDOS 67 A 88 DO HDAg, EMBORA INSUFICIENTES, SÃO NECESSÁRIOS PARA A LOCALIZAÇÃO NUCLEAR DA PROTEÍNA REPÓRTER</b>	<b>181</b>
<b>III.4.1.5</b>	<b>O NLS DO HDAg LOCALIZA-SE ENTRE OS AMINOÁCIDOS 58 A 88</b>	<b>182</b>
<b>III.4.1.6</b>	<b>O AMINOÁCIDO 66 É ESSENCIAL PARA A ACTIVIDADE DO NLS DO HDAg</b>	<b>183</b>
<b>III.4.1.7</b>	<b>O NLS DO HDAg NÃO É BIPARTIDO</b>	<b>185</b>
<b>III.4.1.8</b>	<b>OS AMINOÁCIDOS 66 A 75 DO HDAg SÃO SUFICIENTES PARA A LOCALIZAÇÃO NUCLEAR DA PROTEÍNA <i>c-myc</i>-PK</b>	<b>187</b>
<b>III.4.2</b>	<b>OS AMINOÁCIDOS DE 66 A 75 SÃO ESSENCIAIS PARA A IMPORTAÇÃO NUCLEAR DO HDAg</b>	<b>189</b>
<b>III.4.3</b>	<b>SELECÇÃO DE PROTEÍNAS CELULARES COM AFINIDADE PARA O NLS DO HDAg</b>	<b>192</b>
<b>III.4.3.1</b>	<b>O PÉPTIDO FORMADO POR TRÊS CÓPIAS, DISPOSTAS <i>EM TANDEM</i>, DO NLS DO HDAg É CAPAZ DE PROMOVER A IMPORTAÇÃO NUCLEAR DA PROTEÍNA <i>c-myc</i>-PK</b>	<b>193</b>
<b>III.4.3.2</b>	<b>PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES</b>	<b>194</b>
<b>III.4.3.3</b>	<b>SELECÇÃO DE PROTEÍNAS CELULARES COM AFINIDADE PARA O NLS DO HDAg</b>	<b>196</b>
<b>III.5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>207</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>223</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

- Figura II.3.1.1.** Representação esquemática do plasmídeo pDL542 e da estratégia baseada na utilização da Exo III para construção de mutantes de deleção do cDNA do HDV. **51**
- Figura II.3.1.2.** Representação esquemática dos vectores repórter pDM128 e pDM138 (Hope et al., 1990; Huang et al., 1991). **53**
- Figura II.3.1.3.** Representação esquemática dos vectores pDM138-PRE(+) e pDM138-PRE(-) (Huang and Yen, 1995). **54**
- Figura II.3.2.1.** Representação esquemática do plasmídeo pDL481 e da estratégia utilizada na construção dos vectores pDL481 $\Delta$ NEE, pDL481 $\Delta\delta$  e pDL481 $\Delta$ NEE $\delta$ . **59**
- Figura II.4.1.1.** Análise por electroforese em gel de agarose do plasmídeo pDL542 (coluna nº1) e dos 17 mutantes de deleção (colunas nº2 a nº18) digeridos com a enzima de restrição *HindIII*. **82**

<b>Figura II.4.1.2.</b> Representação esquemática das sequências dos mutantes de deleção do cDNA genómico do HDV originadas por digestão do plasmídeo pDL542 com a Exo III.	<b>83</b>
<b>Figura II.4.1.3.</b> Distribuição intracelular do RNA genómico do HDV em células Huh7 transfectadas com o plasmídeo pDL542 (A e B).	<b>84</b>
<b>Figura II.4.1.4.</b> Distribuição intracelular do RNA do HDV e dos HDAg em células Huh7-D12.	<b>85</b>
<b>Figura II.4.1.5.</b> Distribuição intracelular dos mutantes de deleção do RNA genómico do HDV (A e B).	<b>86</b>
<b>Figura II.4.2.1.</b> Análise por electroforese em gel de agarose a 1% dos fragmentos de cDNA do HDV amplificados por PCR a partir do vector pDL542 e dos mutantes de deleção do vector pDL542 T0 a T13.	<b>89</b>
<b>Figura II.4.2.2.</b> Análise por electroforese em gel de agarose a 1% dos fragmentos de cDNA do HDV amplificados por PCR a partir dos mutantes de deleção do plasmídeo pDL542 T14 a T16.	<b>89</b>
<b>Figura II.4.2.3.</b> Análise por electroforese em gel de agarose a 1% dos vectores pDM138-pDL542 e pDM138-T0 a T16 digeridos com a enzima de restrição <i>EcoRI</i> .	<b>91</b>
<b>Figura II.4.2.4.</b> Análise por electroforese em gel de agarose a 1% dos vectores pDM138-T8 e T9 com a enzima de restrição <i>XbaI</i> .	<b>91</b>
<b>Figura II.4.2.5.</b> Análise por electroforese em gel agarose a 1% dos vectores pDM138-T10 a T12 digeridos com a enzima <i>XbaI</i> e dos vectores pDM138-T7 e pDM138-T13 a T16 digeridos com a enzima de restrição <i>PstI</i> .	<b>91</b>
<b>Figura II.4.2.6.</b> Exemplo de uma recta de calibração para a proteína CAT.	<b>94</b>
<b>Figura II.4.2.7.</b> Exemplo de uma recta de calibração para a proteína $\beta$ -Gal.	<b>94</b>
<b>Figura II.4.2.8.</b> Valores médios de expressão da proteína CAT em extractos de células Huh7 transfectadas com os vectores pDM138, pDM138-PRE(+) e pDM138-PRE(-).	<b>95</b>
<b>Figura II.4.2.9.</b> Valores médios de expressão da proteína CAT em extractos de células Huh7 transfectadas com os vectores pDM138, pDM138-pDL542, pDM138-T0 a T7 e pDM138-T9 a T10, que codificam para as sequências completa ou parciais do RNA genómico do HDV.	<b>96</b>
<b>Figura II.4.2.10.</b> Valores médios de expressão da proteína repórter CAT em extractos de células Huh7 transfectadas com os vectores pDM138-PRE(-), pDM138-PRE(+), pDM138-T8 e pDM138-T11 a T16, que codificam para sequências parciais do RNA genómico do HDV.	<b>97</b>
<b>Figura II.4.2.11.</b> Valores médios de expressão da proteína repórter CAT em extractos de células Huh7 transfectadas com os vectores pDM138, pDM138-PRE(+), pDM138-PRE(-) e pDM138-A2 a A10, em que o cDNA do HDV foi clonado na orientação <i>sense</i> .	<b>99</b>
<b>Figura II.4.2.12.</b> Valores médios de expressão da proteína repórter CAT em extractos de células Huh7 transfectadas com os vectores pDM138, pDM138-PRE(+), pDM138-PRE(-) e pDM138-A2AS a A10AS, em que o cDNA do HDV foi clonado na orientação <i>antisense</i> .	<b>101</b>

<b>Figura II.4.2.13.</b> Valores médios de expressão da proteína repórter CAT em extractos de células Huh7 transfectadas com os vectores pDM138-PRE(-), pDM138-PRE(+) e pDM138-A7AS na ausência e presença de 10 nM de LMB. 103	
<b>Figura II.4.2.14.</b> Análise por electroforese em gel de agarose a 1% da sonda de DNA marcada com dig-11-dUTP por PCR assimétrico. 105	<b>105</b>
<b>Figura II.4.2.15.</b> Detecção por <i>Northern blot</i> do mRNA repórter nas fracções de mRNA totais e citoplasmáticas de células Huh7 transfectadas com os vectores pDM138-PRE(+), pDM138-A7AS e pDM138-A9S. 105	<b>105</b>
<b>Figura II.4.2.16.</b> Sequências nucleotídicas dos cDNAs do HDV que codificam para oito versões mais pequenas do sinal de exportação, situado entre os nucleótidos 1263 a 1466 do antigenoma do vírus. 107	<b>107</b>
<b>Figura II.4.2.17.</b> Valores médios de expressão da proteína repórter em extractos de células Huh7 transfectadas com os vectores pDM138-PRE(+), pDM138-PRE(-), pDM138-1277-1466(AG), pDM138-1263-1436(AG) e pDM138-1277-1436(AG). 108	<b>108</b>
<b>Figura II.4.2.18.</b> Valores médios de expressão da proteína repórter CAT em extractos de células Huh7 transfectadas com os vectores pDM138, pDM138-PRE(+), pDM138-PRE(-), pDM138-A7AS, pDM138-1263-1366(AG), pDM138-1358-1466(AG), pDM138-1301-1411(AG), pDM138-1301-1466(AG) e pDM138-1263-1411(AG). 109	<b>109</b>
<b>Figura II.4.3.1.</b> Estruturas secundárias previstas para seis sequências compreendidas entre os nucleótidos 1263 e 1466, 1263 e 1411, 1301 e 1436, 1263 e 1436, 1277 e 1466, e 1277 e 1436 do RNA antigenómico do HDV. 111	<b>111</b>
<b>Figura II.4.3.2.</b> Estrutura secundária prevista para o sinal de exportação identificados (nucleótidos 1263 a 1466) na sequência completa do RNA antigenómico do HDV. 112	<b>112</b>
<b>Figura II.4.3.3.</b> Análise de extractos nucleares e citoplasmáticos de células Huh7, por <i>Western blot</i> com um anticorpo anti-GAPDH (Ambion). 113	<b>113</b>
<b>Figura II.4.3.4.</b> Determinação da eficiência de amplificação (E) nas reacções de qPCR. 114	<b>114</b>
<b>Figura II.4.3.5.</b> Exemplo das curvas de amplificação do cDNA do HDV (A) e do gene normalizador $\beta$ -2-MG (B) obtidas por PCR em tempo real. 115	<b>115</b>
<b>Figura II.4.3.6.</b> Distribuição núcleo-citoplasmática do RNA do HDV em células Huh7 transfectadas com os vectores pDL542, pDL481 $\Delta$ NEE, pDL481 $\Delta$ NEE $\delta$ e pDL481 $\Delta$ $\delta$ . 116	<b>116</b>
<b>Figura II.4.4.1.</b> Imunoprecipitação das RNPs do HDV seguido de RT-PCR. 118	<b>118</b>
<b>Figura III.4.1.1.</b> Distribuição intracelular das proteínas de fusão <i>c-myc</i> -PK e <i>c-myc</i> -PK-NLS hnRNP K. 177	<b>177</b>
<b>Figura III.4.1.2.</b> Distribuição intracelular da proteínas de fusão <i>c-myc</i> -PK-67-88HDAg. 177	<b>177</b>
<b>Figura III.4.1.3.</b> Distribuição intracelular das proteínas de fusão <i>c-myc</i> -PK-13-112HDAg e <i>c-myc</i> -PK-34-116HDAg. 179	<b>179</b>
<b>Figura III.4.1.4.</b> Distribuição intracelular da proteína de fusão <i>c-myc</i> -PK-58-116HDAg. 180	<b>180</b>

<b>Figura III.4.1.5.</b> Distribuição intracelular da proteína de fusão <i>c-myc</i> -PK-13-55HDAg.	<b>180</b>
<b>Figura III.4.1.6.</b> Distribuição intracelular das proteínas de fusão <i>c-myc</i> -PK-HDAg $\Delta$ 68-91 e <i>c-myc</i> -PK-88-116HDAg.	<b>182</b>
<b>Figura III.4.1.7.</b> Distribuição intracelular da proteína de fusão <i>c-myc</i> -PK-58-88HDAg.	<b>183</b>
<b>Figura III.4.1.8.</b> Distribuição intracelular das proteínas de fusão <i>c-myc</i> -PK-61-88HDAg, <i>c-myc</i> -PK-64-88HDAg, <i>c-myc</i> -PK-65-88HDAg, <i>c-myc</i> -PK-66-88HDAg e <i>c-myc</i> -PK-58-67HDAg.	<b>184</b>
<b>Figura III.4.1.9.</b> Distribuição intracelular das proteínas de fusão <i>c-myc</i> -PK-R <sup>86</sup> A <sup>87</sup> R <sup>88</sup> , <i>c-myc</i> -PK-A <sup>86</sup> A <sup>87</sup> A <sup>88</sup> e <i>c-myc</i> -PK-A <sup>86</sup> K <sup>87</sup> A <sup>88</sup> .	<b>186</b>
<b>Figura III.4.1.10.</b> Distribuição intracelular das proteínas de fusão <i>c-myc</i> -PK-66-75HDAg e <i>c-myc</i> -PK-76-88HDAg.	<b>187</b>
<b>Figura III.4.1.11.</b> Distribuição intracelular das proteínas de fusão <i>c-myc</i> -PK-66-74HDAg e <i>c-myc</i> -PK-E66A-75HDAg.	<b>188</b>
<b>Figura III.4.2.1.</b> Localização intracelular das proteínas de fusão EGFP-HDAg e EGFP-HDAg $\Delta$ NLS em células de hepatoma humano.	<b>190</b>
<b>Figura III.4.2.2.</b> Localização intracelular das proteínas de fusão EGFP-S-HDAg e EGFP-S-HDAg $\Delta$ NLS em fibroblastos de murganho NIH 3T3.	<b>190</b>
<b>Figura III.4.2.3.</b> Localização intracelular das proteínas HDAg, HDAg $\Delta$ NLS e HDAgE66A em células Huh7.	<b>192</b>
<b>Figura III.4.3.1.</b> Distribuição intracelular da proteína de fusão <i>c-myc</i> -PK-3X-HDAg-NLS.	<b>194</b>
<b>Figura III.4.3.2.</b> Análise por SDS-PAGE e <i>Western Blot</i> dos extractos proteicos totais obtidos a partir de culturas líquidas de bactérias <i>E. coli</i> BL21 transformadas com os vectores pGEX-6p-2, pGEX-6p-2-3X-HDAg-NLS e pGEX-6p-2-SHDAg.	<b>195</b>
<b>Figura III.4.3.3.</b> Perfil electroforético das proteínas de células de Huh7 isoladas por cromatografia de afinidade com as proteínas de fusão GST, GST-3X-HDAg-NLS e GST-S-HDAg.	<b>197</b>
<b>Figura III.4.3.4.</b> Perfil electroforético das proteínas de células Huh7 isoladas por cromatografia de afinidade com as proteínas de fusão GST, GST-3X-HDAg-NLS e GST-S-HDAg.	<b>199</b>
<b>Figura III.4.3.5.</b> Perfil electroforético das proteínas de células Huh7 isoladas por cromatografia de afinidade com as proteínas de fusão GST, GST-3X-HDAg-NLS e GST-S-HDAg.	<b>200</b>
<b>Figura III.4.3.6.</b> Perfil electroforético das proteínas de células Huh7 isoladas por cromatografia de afinidade com o péptido formado por três cópias, dispostas em tandem, do NLS do HDAg.	<b>204</b>
<b>Figura III.4.3.7.</b> Perfil electroforético das proteínas de células de Huh7 isoladas por cromatografia de afinidade com o péptido formado por três cópias, dispostas em tandem, do NLS do HDAg.	<b>205</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela II.3.1.</b> Sequência dos <i>primers</i> sintéticos utilizados nas reacções de PCR para a amplificação de 10 sequências do cDNA do HDV.	57
<b>Tabela II.3.2.</b> Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> sintéticos utilizados na amplificação das 8 formas truncadas da sequência A7AS, situada entre os nucleótidos 1263 a 1466 do cDNA antigenómico do HDV.	58
<b>Tabela II.3.3.</b> Sequência dos <i>primers</i> sintéticos utilizados na amplificação por PCR do cDNA antigenómico do HDV, compreendido entre os nucleótidos 2696 e 3208 do plasmídeo pDL481.	60
<b>Tabela II.3.4.</b> Sequências dos <i>primers</i> sintéticos utilizados na síntese de sondas de DNA de cadeia simples marcadas com DIG-11-dUTP.	67
<b>Tabela II.3.5.</b> Sequência dos <i>primers</i> sintéticos utilizados nas reacções de amplificação por qPCR.	71
<b>Tabela II.3.6.</b> Soluções utilizadas na preparação dos géis de separação e concentração de poliacrilamida-SDS.	73
<b>Tabela II.3.7.</b> Sequência dos <i>primers</i> sintéticos utilizados na amplificação do cDNA do HDV após ensaios de imunoprecipitação.	79
<b>Tabela II.4.1.</b> Percentagem de células Huh7 transfectadas com o plasmídeo pDL542 ou com os mutantes de deleção indicados, que exhibe um padrão de distribuição citoplasmático do RNA genómico do HDV, em relação às células Huh7 com um padrão de marcação exclusivamente nuclear.	87
<b>Tabela II.4.2.</b> Dimensões dos fragmentos de DNA, em bp, originados por hidrólise enzimática dos vectores pDM138-pDL542 e pDM138-T0 a T6 com a enzima de restrição <i>EcoRI</i> .	92
<b>Tabela II.4.3.</b> Dimensões dos fragmentos de DNA, em bp, originados por hidrólise enzimática dos vectores pDM138-T7 e pDM138-T8 a T12 com as enzimas de restrição <i>PstI</i> e <i>XbaI</i> , respectivamente.	92
<b>Tabela II.4.4.</b> Dimensões dos fragmentos de DNA, em bp, originados por hidrólise enzimática dos vectores pDM138-T13 a T16 com a enzima de restrição <i>PstI</i> .	92
<b>Tabela II.4.5.</b> Fragmentos de cDNA genómico do HDV clonados no vector pDM138. Os números indicados correspondem às sequências de RNA genómico do HDV codificadas por cada um dos fragmentos de cDNA amplificados por PCR.	98
<b>Tabela II.4.6.</b> Fragmentos de cDNA antigenómico do HDV clonados no vector pDM138. Os números indicados correspondem às sequências de RNA antigenómico do HDV codificadas por cada um dos fragmentos de cDNA amplificados por PCR.	98
<b>Tabela III.1.</b> Exemplos seleccionados de sinais de localização nuclear. Os dois motivos ricos em aminoácidos básicos dos NLS bipartidos encontram-se sublinhados.	142

<b>Tabela III.3.1.</b> Sequências dos <i>primers</i> sintéticos utilizados na amplificação por PCR de sequências específicas de cDNA do HDAG.	<b>158</b>
<b>Tabela III.3.2.</b> Sequências dos oligonucleótidos sintéticos utilizados para gerar sequências específicas de cDNA do HDAG.	<b>160</b>
<b>Tabela III.3.3.</b> Dimensões dos fragmentos de DNA, em bp, originados por hidrólise enzimática do vector pcDNA1-c-myc-PK e dos vectores que codificam a proteína c-myc-PK fundida com as aminoácidos 67 a 88, 13 a 112, 34 a 116, 58 a 116 do HDAG e com o HDAG $\Delta$ 68-91, com a enzima de restrição <i>Ban</i> II.	<b>161</b>
<b>Tabela III.3.4.</b> Dimensões dos fragmentos de DNA, em bp, originados por hidrólise enzimática do vector pcDNA1-c-myc-PK e dos vectores que codificam a proteína c-myc-PK fundida com os aminoácidos 13 a 55, 58 a 88, 88 a 116, 61 a 88, 64 a 88, 65 a 88, 66 a 88 e 58 a 67 do HDAG, com a enzima de restrição <i>Apo</i> I.	<b>162</b>
<b>Tabela III.3.5.</b> Dimensões dos fragmentos de DNA, em bp, originados por hidrólise enzimática do vector pcDNA1-c-myc-PK e dos vectores que codificam a proteína c-myc-PK fundida com os aminoácidos 66 a 74, 66 a 75, E66A-75, A <sup>86</sup> A <sup>87</sup> A <sup>88</sup> , A <sup>86</sup> A <sup>88</sup> , K <sup>87</sup> A, 76 a 88 e 3X-NLS do HDAG, com a enzima de restrição <i>Apo</i> I.	<b>162</b>
<b>Tabela III.3.6.</b> Sequência dos <i>primers</i> sintéticos utilizados na amplificação por PCR de sequências específicas de cDNA para construção dos vectores pEGFP-C1-S-HDAG $\Delta$ NLS, pCI-neo-S-HDAG, pCI-neo-S-HDAG $\Delta$ NLS e pCI-neo-S-HDAGE66A.	<b>163</b>
<b>Tabela III.3.7.</b> Sequência dos oligonucleótidos sintéticos utilizados na construção do vector pCI-neo-HDAGE66A.	<b>165</b>
<b>Tabela III.3.8.</b> Sequência dos oligonucleótidos sintéticos utilizados na construção do vector pGEX-6p-2-3xHDAGNLS.	<b>167</b>
<b>Tabela III.3.9.</b> Soluções utilizadas na preparação de géis de 18 x 16 cm de SDS-poliacrilamida a 7.5% ou de gradiente 5 a 20%.	<b>172</b>
<b>Tabela III.4.1.</b> Sequências aminoacídicas do HDAG modificadas por mutagénese dirigida.	<b>185</b>
<b>Tabela III.4.2.</b> Proteínas identificadas por espectrometria de massa MALDI-TOF-TOF das bandas removidas do gel de poliactilamida apresentado na figura III.4.3.5.	<b>202</b>
<b>Tabela III.4.3.</b> Proteínas identificadas por espectrometria de massa MALDI-TOF-TOF das bandas removidas dos géis de poliactilamida apresentados nas figuras III.4.3.6 e III.4.3.7.	<b>206</b>
<b>Tabela III.5.1.</b> Sequências nucleotídicas do cDNA do HDAG utilizadas neste trabalho e por Xia <i>et al.</i> (1992) na construção de vectores repórter que codificam para as seguintes proteínas de fusão: c-myc-PK fundida com os aminoácidos 66 a 75 do HDAG, c-myc-PK fundida com os aminoácidos 66 a 75 do HDAG em que o resíduo de ácido glutâmico da posição 66 foi substituído por um resíduo de alanina e proteína $\alpha$ -globina fundida com os aminoácidos 67 a 77 do HDAG.	<b>211</b>

## CAPÍTULO I.

### O VÍRUS DA HEPATITE DELTA

---



## I.1 INTRODUÇÃO GERAL

---

### I.1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

O vírus da hepatite delta (HDV), o agente etiológico da hepatite delta, foi descoberto casualmente em Itália, no ano de 1977 pelo gastroenterologista Mario Rizzetto, ao estudar biopsias de fígado de pacientes infectados pelo vírus da hepatite B (HBV; Rizzetto *et al.*, 1977). As biopsias de alguns dos pacientes com marcadores de infecção crónica pelo HBV apresentavam um antigénio nuclear, até à data desconhecido, ao qual foi atribuída a

designação de antigénio delta (HDAg). Mais tarde, por meio de infecções experimentais de chimpanzés com soro humano infectado, ficou demonstrado que o HDAg, em associação com uma molécula de RNA, forma a porção interna de um vírus diferente do HBV (Rizzetto *et al.*, 1980; Bonino *et al.*, 1984). Uma das particularidades do HDV, é que não codifica as proteínas do seu invólucro, e em vez disso utiliza as proteínas de superfície do HBV (HBsAgs), razão pela qual a infecção pelo HDV só ocorre na presença do HBV.

Os modos de transmissão do HDV são semelhantes aos do HBV, sendo a exposição percutânea com sangue contaminado a via de contágio mais produtiva (Hsieh *et al.*, 2006). Esta via de transmissão, era, antes do rastreio obrigatório para os HBsAgs, a principal razão para a elevada prevalência de HDV registada entre os hemofílicos e indivíduos sujeitos a transfusões. Actualmente, em áreas não-endémicas, a exposição percutânea é a via de transmissão mais frequente, especialmente entre usuários de drogas injectáveis (Huo *et al.*, 2003). É habitual nestas regiões, a infecção pelo HDV ser frequente entre as prostitutas e homossexuais masculinos, evidenciando que o contacto sexual com portadores de HDV constitui uma importante via de transmissão/propagação do vírus (Wu *et al.*, 1990; Huo *et al.*, 1997).

Em zonas endémicas do HDV, a co-habitação com indivíduos infectados é um factor que contribui para o aumento do risco de contágio, sendo a exposição por via parenteral inaparente a principal forma de propagação/transmissão do HDV (Niro *et al.*, 1999).

O HDV é um vírus hepatotrópico que pode causar hepatite aguda ou crónica. As alterações patológicas causadas pelo HDV limitam-se ao fígado e consistem em inflamação e necrose hepatocelular não existindo, do ponto de vista histológico diferenças entre a hepatite por HDV e as hepatites provocadas por outros agentes virais.

Dadas as características de vírus satélite do HBV a infecção por HDV pode ser transmitida de dois modos, em simultâneo com o HBV (co-infecção) ou a indivíduos previamente infectados pelo HBV (super-infecção; Hsieh *et al.*, 2006).

As manifestações clínicas associadas à co-infecção pelo HDV/HBV são semelhantes às demais hepatites causadas por agentes virais, ainda que geralmente com um quadro clínico mais grave. O período de incubação, até o aparecimento dos primeiros sintomas, é bastante variável e, segundo os estudos em modelo animal, inversamente proporcional ao título de HBV presente no inóculo (Gerin *et al.*, 2001). A hepatite aguda causada pela co-infecção pelos vírus HBV e HDV apresenta de um modo geral evolução benigna, caracterizando-se pela elevação bifásica dos níveis das aminotransferases e da bilirrubina, em 14 a 32% dos pacientes (Polish *et al.*, 1993). A co-infecção pelo HBV/HDV raramente evolui para hepatite crónica, fixando-se a taxa de cronicidade, em indivíduos adultos, em valores não superiores a 5%, a mesma que se

atribui à infecção isolada pelo HBV (Hsieh *et al.*, 2006). O facto do HDV inibir a replicação do HBV pode contribuir para a resolução espontânea da hepatite resultante da co-infecção pelos vírus HBV e HDV (Morante *et al.*, 1989; Polish *et al.*, 1993). Um estudo, utilizando células em cultura mostrou que o HDV inibe a replicação do genoma do HBV com a consequente redução da síntese do RNA pré-genómico do HBV e dos mRNAs que codificam os HBsAgs (Wu *et al.*, 1991). A diminuição acentuada da produção dos HBsAgs pode ocasionar a sua eliminação espontânea com concomitante seroconversão (presença de anticorpos anti-HBsAgs) o que habitualmente culmina com a resolução da infecção aguda por HBV e HDV.

A super-infecção pelo HDV pode ocorrer em portadores crónicos de HBsAgs assintomáticos ou em pacientes com hepatite B crónica. O estado de portador crónico, com replicação activa do HBV permite que logo depois de um curto período de incubação, a replicação do HDV possa ocorrer na prática indefinidamente (Gerin *et al.*, 2001), razão pela qual, a super-infecção após um episódio de hepatite aguda progride, em 70 a 90% dos casos, para doença crónica (Hsieh *et al.*, 2006). Destes, cerca de 60 a 80% dos indivíduos desenvolvem cirrose, sendo esta taxa 3 vezes superior à registada para o HBV e HCV (Gerin *et al.*, 2001). Segundo Fattovich *et al.* (2000), a super-infecção pelo HDV aumenta 3 vezes o risco de carcinoma hepatocelular (HCC) e 2 vezes a mortalidade em pacientes com cirrose compensada.

As infecções agudas podem, em casos extremos, causar falência hepática, também designada de hepatite fulminante. Esta forma rara da doença, embora 10 vezes mais frequente do que em outras hepatites virais, manifesta-se por alterações de personalidade, distúrbios do sono, dificuldade de concentração e em situações extremas pode levar ao coma. A taxa de mortalidade associada a casos de hepatite fulminante é de 80%, sendo o transplante hepático a única forma de tratamento (Gerin *et al.*, 2001). Muito frequentemente, após o transplante ocorre re-infecção pelo HDV com um padrão sorológico distinto da co-infecção e super-infecção, isto é, presença de RNA do HDV e HDAg no soro, sem marcas aparentes de infecção pelo HBV (Ottobrelli *et al.*, 1991). Este tipo de infecção, designada de infecção latente, é suportada por um número muito reduzido de hepatócitos co-infectados pelo HDV/HBV e resulta em hepatites subclínicas, que se tornam sintomáticas apenas após a reactivação da replicação do HBV (Smedile *et al.*, 1998).

Estimativas da Organização Mundial de Saúde indicam que 5% dos portadores crónicos do HBV encontram-se igualmente infectados pelo HDV, isto é, 15 a 20 milhões de pessoas apresentam dupla infecção pelo HBV e HDV, existindo cerca de 380 milhões (portadores crónicos de HBsAgs) que reúnem todas as condições para infecção pelo HDV (WHO, 2001).

Os estudos epidemiológicos realizados após a descoberta do HDV mostraram que a infecção apresenta uma distribuição generalizada, por todo o mundo, mas não uniforme. As regiões que apresentam maior prevalência são a bacia do Mediterrâneo, incluindo o Sul da Europa, a África Ocidental e Central, o Médio Oriente, a Ásia central, algumas ilhas do Pacífico e a bacia do Amazonas (Hsieh *et al.*, 2006).

Sendo o HDV um vírus satélite, dependente do HBV, seria de esperar que a epidemiologia e distribuição geográfica da infecção pelo HDV reflectisse a do vírus auxiliar. Se em regiões de grande prevalência de infecção pelo HBV, como a Amazónia brasileira, a hepatite delta representa um problema de saúde pública, chegando mesmo a atingir valores de prevalência acima de 85% em pacientes com hepatite crónica (Torres *et al.*, 1996), existem zonas hiperendémicas para o HBV, onde a prevalência da infecção pelo HDV é infrequente, na maioria dos grupos populacionais. É o caso de Taiwan, onde apesar da hepatite B ser endémica, a disseminação da infecção pelo HDV limita-se a grupos com comportamentos de risco acrescidos (Huo *et al.*, 1997; Kao *et al.*, 2002).

De acordo com estudos epidemiológicos conduzidos nas últimas duas décadas, a prevalência da infecção pelo HDV tem vindo a diminuir em determinadas regiões do mundo, nomeadamente no Sul da Europa.

Em regiões como o Sul de Itália, considerada área endémica para a hepatite delta, entre 1987 e 1997, registou-se uma redução na prevalência de HDV em portadores de HBsAgs, de mais de 50% (Gaeta *et al.*, 2000). Para esta área, verificou-se igualmente uma redução acentuada na frequência de cirroses associadas ao HDV, sendo em 1997, 4 vezes menor do que a observada nos anos 80 (Gaeta *et al.*, 2000). Tendência semelhante de redução foi registada em Taiwan, nos grupos de elevado risco. Nomeadamente, entre 1988 e 2002, verificou-se uma redução muito significativa na prevalência do HDV entre prostitutas (59% para 5%) e toxicodependentes (79% para 14%; Huo *et al.*, 2003). Este declínio na prevalência de HDV nos grupos de risco advirá de alterações nos padrões de comportamento e a adopção de medidas preventivas, tais como o uso do preservativo e de agulhas descartáveis (Huo *et al.*, 1997; 2003). Apesar da generalizada redução das taxas de infecção por HDV, encontrou-se elevada prevalência de anticorpos anti-HDV em prostitutas masculinos (16%), podendo estes constituir novos reservatórios para difusão da infecção (Huo *et al.*, 2003).

A vacina contra a hepatite B, obrigatória nas crianças desde 1991, em Itália e muitos outros países Europeus, é possivelmente um dos factores que mais tem contribuído para o controlo da infecção pelo HDV, através da redução do número de portadores crónicos de HBsAgs (Stroffolini *et al.*, 2004; Mele *et al.*, 2007). A melhoria das condições sócio-económicas, as

campanhas educativas e a adopção de medidas preventivas contra a infecção pelo HIV-1, cujos modos de transmissão são semelhantes aos do HBV e HDV, encontram-se entre os factores apontados para a redução progressiva da prevalência da infecção pelo HDV (Gaeta *et al.*, 2000; Huo *et al.*, 2003; Mele *et al.*, 2007).

Embora a redução seja a tendência observada, em países da Europa Central e do Norte, nos últimos anos assiste-se a um ligeiro aumento das prevalências de hepatite delta fruto da imigração de população proveniente de áreas endémicas. Na Alemanha, mais de 50% dos indivíduos positivos para HDV são provenientes da Turquia e de países que outrora pertenciam à União Soviética (Wedemeyer *et al.*, 2007). Igualmente ilustrativo é o aumento da prevalência de HDV em portadores crónicos do HBV em Londres, registando-se valores de 8.5% em 2006 quando em 1987 era apenas de 2.6% (Cross *et al.*, 2008).

Existem países que apresentam, actualmente, prevalências de infecção pelo HDV similares às registadas em Itália no início dos anos 80, caso da Roménia com taxas de 37.9% entre pacientes com hepatite B crónica e de 51% entre pacientes com cirrose (Grigorescu *et al.*, 2003)

Em Portugal, não existem dados recentes acerca da prevalência da infecção pelo HDV, registando-se em 1987, uma taxa de 17% em portadores crónicos de HBsAgs (Ramalho *et al.*, 1987).

## **I.1.2 TRATAMENTO**

Não existe actualmente um tratamento específico para a hepatite delta.

A única opção terapêutica disponível e aprovada para o tratamento da hepatite delta é o interferão- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ). Os ensaios clínicos piloto com INF- $\alpha$ , conduzidos na década 90, mostraram efeitos benéficos em alguns grupos de doentes com hepatite delta crónica. Contudo, constatou-se que a resposta ao tratamento com INF- $\alpha$  é muito variável e os efeitos benéficos são na maioria dos casos reversíveis após a interrupção do tratamento (Hoofnagle and Bisceglie, 1997; Niro *et al.*, 2005). A eficácia do INF- $\alpha$  depende da dose utilizada e da duração do tratamento. A resposta ao tratamento é avaliada tanto pela normalização dos níveis de alanina-transaminases (ALT; resposta bioquímica) como pela eliminação do RNA do HDV no soro sanguíneo (resposta virológica). Um ensaio clínico controlado mostrou que cerca de 50% dos doentes tratados com doses elevadas de INF- $\alpha$  (9 MIU) durante 12 meses apresentam normalização dos valores de ALT e eliminação do RNA do HDV no final do tratamento (Farci

*et al.*, 1994). Todavia, 6 meses após o fim do tratamento, apenas 21% dos pacientes apresentam simultaneamente resposta virológica e bioquímica sustentada (Farci *et al.*, 1994). Não obstante, os doentes respondedores tratados com doses elevada de INF- $\alpha$  apresentam resultados clínicos positivos a longo termo, caracterizados por níveis de ALT normalizados, normalização histológica e da função hepática (Farci *et al.*, 2004).

Recentemente foi desenvolvida uma nova fórmula de interferão conjugado com polietileno glicol (PEG; INF-PEG) que apresenta resultados terapêuticos mais animadores do que o interferão convencional no tratamento da hepatites B e C crónicas (Farci, 2006). No caso da hepatite delta crónica, apenas um estudo clínico mostrou eficácia superior do INF-PEG em relação ao INF- $\alpha$  convencional, tendo-se registado uma resposta virológica sustentada em 43% dos pacientes, 6 meses após a interrupção do tratamento (Castelnaud *et al.*, 2006).

Para além do interferão, outras drogas antivirais, como a ribavirina e a lamivudina foram testadas embora sem sucesso no tratamento da hepatite delta crónica (Lau *et al.*, 1999; Niro *et al.*, 2005). De um modo geral, verificou-se que os fármacos que inibem especificamente o HBV exercem pouco ou nenhum efeito sobre o HDV. Uma explicação provável para a ineficácia dos tratamentos pode ser devida ao facto dos fármacos utilizados não suprimirem a expressão dos HBsAgs (Farci *et al.*, 2006).

Os inibidores da prenilação poderão, no futuro, ser utilizados como uma nova opção terapêutica no tratamento da hepatite delta crónica. Uma terapia anti-viral baseada na inibição da prenilação difere das abordagens terapêuticas mais clássicas na medida em que o alvo da droga consiste numa enzima celular e não num componente do vírus (Einav and Glenn, 2003). A prenilação do resíduo de cisteína presente na extremidade carboxílica da forma grande do antígeno delta (L-HDAg) é condição necessária para a montagem de partículas virais. Esta modificação pós-traducional, que consiste na adição de um tipo específico de lípidos, um grupo farnesil no caso do L-HDAg, é catalizada pelas farnesiltransferases e geraniltransferases celulares (Einav and Glen, 2003). Demonstrou-se que a produção de partículas virais infecciosas de HDV é drasticamente inibida em células em cultura e num modelo animal na presença de inibidores específicos da prenilação do L-HDAg como o (*benzodiazepine peptidomimetic*) BZA-5B e o FTI-277 (Bordier *et al.*, 2002; 2003). É de referir que a eficácia do efeito inibidor na supressão da virémia do HDV é tanto maior quanto maior a duração do tratamento. Existem actualmente vários inibidores da prenilação em fase de teste com aplicação na supressão de tumores (Sebti and Hamilton, 2000). A importância desta classe de fármacos no tratamento da hepatite delta humana, apesar do seu potencial, não foi ainda averiguada.

### II.1.3 PREVENÇÃO CONTRA A INFECÇÃO PELO HDV

A par das tentativas de encontrar uma terapia eficaz para hepatite delta, têm sido feitos esforços no sentido de desenvolver uma vacina que proteja os indivíduos infectados cronicamente pelo HBV de contraírem infecção pelo HDV.

O modelo animal geralmente utilizado nos testes de vacinação contra o HDV é a marmota cronicamente infectada pelo vírus da hepatite de marmota (WHV), pertencente à família *Hepadnaviridae*. O curso da superinfecção pelo HDV nestes animais é semelhante ao observado no homem e 80 a 100% dos animais desenvolve hepatite delta crónica (Fiedler and Roggendorf, 2001).

Os testes de imunização mostraram que de um modo geral o HDAg é capaz de gerar uma forte resposta humoral, independentemente do sistema utilizado na produção do antigénio (Fiedler and Roggendorf, 2006). No entanto, a resposta imunitária humoral induzida pela vacinação com o HDAg não confere uma protecção eficaz contra infecção pelo HDV. Enquanto que alguns estudos mostram que não há diferença no curso da infecção entre os animais vacinados e os do grupo controlo, outros indicam que a vacinação causa um atraso no aparecimento e uma redução dos níveis de RNA do HDV. Contudo, a maioria dos animais apresenta marcadores de infecção crónica, isto é, presença de HDAg nas biópsias hepáticas (Fiedler and Roggendorf, 2006).

No decurso da superinfecção pelo HDV em humanos são geralmente detectados altos títulos de anticorpos específicos contra os HDAGs, da classe IgM e IgG, que persistem indefinidamente. A resposta humoral gerada tal como nas marmotas, parece contudo não ter actividade neutralizante e ser incapaz de modular o curso da infecção, uma vez que aproximadamente 80% dos indivíduos progride para doença crónica (Gerin *et al.*, 2001).

Além da utilização directa do HDAg como vacina foram ainda testadas estratégias que visam a indução de uma resposta imunitária celular. Não se conhece bem o papel das células T na infecção pelo HDV. Nisini *et al.* (1997) identificou a presença de células CD4<sup>+</sup> específicas para o HDAg somente em indivíduos sem marcas de infecção activa (negativos para o RNA do HDV), sugerindo a participação das células T na eliminação do vírus.

Por último, a imunização com vacinas de DNA que codificam para o HDAg, à semelhança das vacinas convencionais, não foi capaz de induzir imunidade protectora contra infecção pelo HDV (Fiedler and Roggendorf, 2006).

## I.1.4 O GENOMA DO HDV E OS ANTIGÉNIOS DELTA

O HDV é um vírus de RNA com características estruturais e uma estratégia de replicação que o tornam ímpar entre os vírus animais. Apresenta semelhanças com os viróides, grupo de agentes patogénicos infecciosos das plantas, que consistem em pequenas moléculas RNA de cadeia simples, circulares sem cápside que se replicam de modo autónomo de vírus auxiliares (Taylor *et al.*, 1996). Dadas as suas características peculiares, não foi possível classificar o HDV em nenhuma das famílias de vírus existentes, tendo sido criado um género novo, *Deltavirus*, do qual o HDV é o seu único representante (Gerin *et al.*, 2001).

O virião do HDV apresenta uma estrutura esférica, com um diâmetro médio de 36 nm (Sureau, 2006). O seu invólucro é constituído por lípidos celulares e pelas proteínas de superfície do HBV (HBsAgs). As três formas de HBsAgs, pequena (S), média (M) e grande (L) são traduzidas a partir de uma única grelha aberta de leitura (ORF), com início em três codões de iniciação diferentes. A proteína mais pequena (SHBsAg) é formada por 226 aminoácidos, designados de domínio S, comum às três proteínas. A forma média (MHBsAg) é acrescida de um domínio com 55 aminoácidos (domínio preS2) na extremidade N-terminal, enquanto que a maior (LHBsAg) difere da anterior pela existência do domínio preS1, com 108 a 119 aminoácidos, localizado a montante do domínio preS2 (Sureau, 2006).

A parte interna do virião corresponde ao genoma do HDV associado num complexo ribonucleoproteico (RNP), com múltiplas cópias do antigénio delta (Ryu *et al.*, 1993). O genoma do vírus consiste numa molécula de RNA de cadeia simples circular, com aproximadamente 1700 nucleótidos de comprimento. Este RNA possui cerca de 70% de sequências intramoleculares complementares, o que contribui para a ocorrência de emparelhamentos internos formando uma estrutura do tipo bastonete, semelhante à dos viróides (Taylor, 2006).

Durante a replicação do HDV, além do RNA genómico designação atribuída ao RNA do HDV detectado nos viriões, são produzidas múltiplas cópias de um RNA exactamente complementar, denominado de antigenoma ou RNA antigenómico (Taylor, 2006). Tanto o genoma como o antigenoma do HDV possuem um domínio com actividade de ribozima que cataliza reacções de auto-clivagem do RNA do HDV em locais específicos. Qualquer mutação que interfira com a autoclivagem dos RNAs do HDV *in vitro* está igualmente associada com a perda da capacidade replicativa do vírus *in vivo* (Macnaughton *et al.*, 1993). O facto do genoma do HDV ser circular e a replicação do vírus depender da actividade ribozímica de

ambos os RNAs, sugere que a replicação segue um mecanismo de círculo rolante simétrico, à semelhança dos viróides. Segundo este modelo, o RNA circular do virião serve de molde para a síntese de moléculas multiméricas de RNA antigenómico que são auto-clivadas em intervalos precisos, libertando monómeros de RNA de polaridade oposta à do virião. Estes monómeros de RNA são convertidos em antigenomas circulares, por acção de enzimas celulares, que podem por sua vez ser utilizados na produção de novos transcritos de RNA genómico por um mecanismo idêntico (Reid and Lazinski, 2000). O modelo de círculo rolante para a replicação do HDV é apoiado pela presença de espécies de RNA do HDV com tamanhos superiores, múltiplos de 1.7 Kb em biopsias hepáticas e células em cultura, que provavelmente correspondem a formas intermediárias da replicação do HDV (Chen *et al.*, 1986). De facto, foi demonstrado por marcação *in vivo* com ortofosfato ( $^{32}\text{P}$ ) radioactivo, que os monómeros de RNA do HDV resultam do processamento de moléculas precursoras multiméricas (Macnaughton *et al.*, 2002a).

O genoma do HDV possui uma única ORF da qual derivam duas formas de uma única proteína, o antigénio delta (HDAg). Na fase inicial da replicação do HDV são transcritos a partir do RNA genómico, mRNAs com cerca de 800 nt que codificam para uma das formas do HDAg, a forma pequena (S-HDAg). O S-HDAg é uma proteína com 195 aminoácidos e cerca de 24 kDa (Taylor, 2006).

Numa fase mais tardia do ciclo de replicação do HDV, algumas moléculas de RNA antigenómico sofrem uma modificação pós-transcricional, designada de *editing*, que consiste na deaminação da adenosina do codão stop/amber (UAG), da grelha aberta de leitura do S-HDAg, em inosina (UIG). Estes RNAs modificados servem de molde à síntese de novos genomas que ao serem transcritos, dão origem a mRNAs que no lugar de um codão stop/amber (UAG) exibem um codão triptofano (UGG). Da tradução destes mRNAs é produzida uma variante do HDAg, com 214 aminoácidos e cerca de 27 kDa, o antigénio delta grande (L-HDAg), que contém mais 19 aminoácidos, do que o S-HDAg na extremidade C-terminal (Casey, 2006). O *editing* do RNA antigenómico é levado a cabo por deaminases de adenosina celulares que actuam em RNAs de cadeia dupla (ADAR). Os estudos de inibição da expressão das ADAR celulares utilizando RNAs de interferência (RNAi) mostraram que a isoforma nuclear da ADAR1 é responsável por 80% do *editing* no antigenoma do HDV (Jayan and Casey, 2002; Wong and Lazinski, 2002).

Os antigénios delta possuem domínios funcionais específicos, comuns às duas formas, nomeadamente sinais de localização nuclear (NLS), domínios de ligação a RNA (RBD), um domínio *coiled-coil* e motivos semelhantes a fechos de leucina (Lai, 2006). O L-HDAg possui

ainda, nos 19 aminoácidos adicionais da extremidade carboxílica, um sinal de isoprenilação e um eventual sinal de exportação nuclear (NES; Lee *et al.*, 2001).

A localização predominantemente nuclear do HDAg pressupõe a existência de, pelo menos, um NLS na sua sequência (Cunha *et al.*, 1998). Estudos prévios mostraram que a sequência de aminoácidos 67 a 88 do HDAg funciona como um NLS, capaz de induzir a importação nuclear de uma proteína repórter citoplasmática (Xia *et al.*, 1992). Foi referida a existência de um segundo NLS entre os aminoácidos 34 a 44 do HDAg (Chang *et al.*, 1992). Os aminoácidos 34 a 44 do HDAg sobrepõem-se parcialmente com o domínio *coiled-coil* (aa 12 a 60), mais especificamente, com uma sequência semelhante a fechos de leucina que se localiza entre os aminoácidos 30 a 51 do HDAg (Xia and Lai, 1992). Mutações dirigidas aos resíduos de leucina da sequência de aminoácidos 30 a 51 do HDAg não interferem com a importação nuclear, mas impedem a formação de dímeros de HDAg (Chang *et al.*, 1992). Os dímeros de HDAg (homodímeros ou heterodímeros) podem ainda associar-se em estruturas octaméricas, as quais desempenham múltiplas funções no ciclo de replicação do HDV (Lazinski and Taylor, 1993, Cornillez-Ty and Lazinski, 2003).

Um dos domínios de ligação ao RNA do HDAg consiste em dois segmentos ricos em resíduos de arginina (ARM; aa 97 a 107 e aa 136 a 146), separados por um motivo de dimerização (helix-loop-helix; nt 108 a 135). Demonstrou-se que os dois domínios ARM mais o motivo de dimerização são necessários para a ligação *in vitro* do HDAg ao RNA do vírus (Lee *et al.*, 1993). Os HDAGs, tanto o pequeno como o grande, ligam-se com igual afinidade ao RNA genómico e antígenómico do HDV (Lin *et al.*, 1990; Chao *et al.*, 1991). Foi descrito ainda, um segundo domínio de ligação ao RNA, localizado na extremidade N-terminal entre os aminoácidos 2 a 27 do HDAg (Poisson *et al.*, 1993).

Os 19 aminoácidos terminais da extremidade C-terminal (aa 196 a 214) do L-HDAg são necessários e suficientes para interacção e co-secreção com os HBsAgs (Lee *et al.*, 1995). Os últimos quatro aminoácidos do L-HDAg formam um sinal de isoprenilação (CXXQ), no qual o resíduo de cisteína 211 é modificado pela adição covalente de um lípido prenil. Demonstrou-se que a prenilação da cisteína 211 do L-HDAg é condição necessária, mas não suficiente, para a interacção com os HBsAgs e co-secreção (Hwang and Lai, 1993).

Mais recentemente, foi sugerida a presença de um NES entre os aminoácidos 198 a 210 do L-HDAg (Lee *et al.*, 2001). O L-HDAg localiza-se, tal como a forma pequena do antígeno delta, quase exclusivamente no núcleo das células. Mostrou-se que o padrão de distribuição do L-HDAg-GFP (L-HDAg-green fluorescent protein) sofre uma significativa alteração na presença de HBsAg, com acumulação do L-HDAg-GFP no citoplasma (Tan *et al.*, 2004; Huang *et al.*,

2006). Não é ainda conhecido o mecanismo através do qual os HBsAgs promovem a exportação nuclear dos L-HDAgs. Sabe-se no entanto, que os HBsAgs induzem stress no retículo endoplasmático que é acompanhado pela activação do factor de transcrição NF- $\kappa$ B e que estes dois eventos estão correlacionados com o aumento de L-HDAg no citoplasma (Huang *et al.*, 2006).

Apesar de todas as semelhanças, quer de sequência quer de estrutura, os dois antigénios delta desempenham funções biológicas distintas no ciclo de replicação do HDV. Desde cedo foi comprovado que o S-HDAg é essencial para a replicação do RNA do HDV. Mutações que interrompam a ORF do S-HDAg causam uma inibição quase total da replicação (Kuo *et al.*, 1989). Por outro lado, o L-HDAg além de não suportar a replicação é um supressor dominante da actividade do S-HDAg (Chao *et al.*, 1990). O L-HDAg é no entanto, indispensável para o empacotamento e montagem de partículas virais (Chang *et al.*, 1991).

Vários estudos foram realizados com o objectivo de elucidar os mecanismos moleculares subjacentes à função dos HDAgs. A primeira função biológica atribuída ao HDAg é a importação nuclear do RNA do vírus. Este processo depende da ligação do HDAg ao RNA através de um dos RBDs, mas também do NLS bipartido para que a RNP do HDV seja reconhecida pelos factores de importação celulares (Chou *et al.*, 1998). Por meio de um mecanismo que envolve ligação dos HDAgs ao RNA do vírus, os dois RBDs contribuem para os efeitos contrários dos HDAgs na replicação do HDV. O RBD da região média do S-HDAg, formado por dois motivos ARM (aa 97 a 107 e aa 136 a 146), é necessário para a activação da replicação, enquanto que o RBD da extremidade N-terminal (aa 2 a 27) é responsável, em parte pela actividade supressora do L-HDAg (Lee *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1995).

Para além de estar envolvida na interacção com os HBsAgs e na montagem de viriões, a prenilação do L-HDAg estimula a sua actividade de inibidor da replicação do HDV. A prenilação do resíduo de cisteína 211 do L-HDAg torna um epítopo comum aos HDAg inacessível, indicando que o L-HDAg inibe a replicação do HDV devido a alterações na conformação da proteína (Hwang and Lai, 1994). Mais recentemente, demonstrou-se que a prenilação aumenta a afinidade do L-HDAg para membranas e que esta associação determina a sua função como supressor da replicação. De facto, verificou-se que o S-HDAg fundido com um sinal de miristoilação é capaz de substituir as funções do L-HDAg na replicação do HDV (O' Malley and Lazinski, 2005).

A actividade dos HDAgs está totalmente condicionada pela capacidade destes formarem homo e heterodímeros bem como octámeros. O domínio *coiled-coil* dos HDAgs, desempenha um

papel central na activação e repressão da replicação do RNA do HDV, bem como, na montagem de viriões (Lazinski and Taylor, 1993). Só os S-HDAgs, capazes de estabelecer interacção com os L-HDAg através do domínio *coiled-coil*, são empacotados em partículas virais (Lazinski and Taylor, 1993).

## **I.1.5 CICLO DE REPLICAÇÃO DO HDV**

### **I.1.5.1 ENTRADA DO HDV NA CÉLULA HEPÁTICA**

Não existe actualmente um modelo experimental que permita reproduzir todos os estádios do ciclo de replicação do HDV. A replicação do HDV é, na maioria dos casos, estudada em linhas celulares que se apresentam permissivas apenas às etapas intracelulares da replicação do HDV. Deste modo, muitos aspectos iniciais, tais como, a ligação do vírus a receptores específicos da célula hospedeira, a fusão ou desnudamento dos viriões permanecem pouco clarificados. Os únicos modelos celulares susceptíveis à infecção por HDV são as culturas primárias de hepatócitos de primatas e as células HepaRG (Glebe and Urban, 2007).

O invólucro do HDV, em termos de composição proteica, é idêntico ao do vírus auxiliar, o que pressupõe que o HDV e o HBV utilizam os mesmos receptores para entrar na célula hospedeira. Os estudos iniciais de Sureau *et al.* (1993), mostraram que a capacidade do HDV infectar culturas primárias de hepatócitos está condicionada pela presença de LHBsAg no envelope, indicando que a sequência necessária para a ligação do HDV aos receptores específicos da membrana dos hepatócitos encontra-se no domínio preS1. Tal como para o HBV, verificou-se que os primeiros 75 aminoácidos do domínio preS1 do LHBsAg incluindo a N-miristoilação do resíduo de glicina 2 são essenciais para a infectividade do HDV (Blanchet and Sureau, 2007; Abou-Jaoudé *et al.*, 2007a; Urban, 2008). Em conformidade com a hipótese do domínio preS1 possuir um domínio de ligação essencial para a interacção do HDV e HBV com um receptor específico da membrana do hepatócito, verificou-se que a infecção por HDV ou HBV é totalmente inibida na presença de péptidos miristoilados correspondentes à sequência de aminoácidos 2 a 48 do domínio preS1 do LHBsAgs (Engelke *et al.*, 2006). Existem evidências que apontam para a existência de um segundo local crítico para a infectividade do HDV, na ansa antigénica do domínio S dos HBsAgs (Abou-Jaoudé and Sureau, 2005; Abou-Jaoudé *et al.*, 2007b). Os receptores celulares que medeiam a entrada do HDV nos hepatócitos não foram ainda identificados.

### **I.1.5.2 REPLICAÇÃO E TRANSCRIÇÃO DO GENOMA DO HDV**

A replicação do genoma HDV é totalmente independente de quaisquer sequências e/ou funções fornecidas pelo HBV. Após entrada na célula hospedeira, a RNP do HDV é importada para o núcleo e o RNA serve de molde para a síntese de antigenomas e transcrição de mRNAs que codificam para o S-HDAg. O facto do RNA, os HDAGs e as RNPs do HDV apresentarem uma distribuição intracelular, quase exclusivamente, nuclear sugere que a replicação tem lugar no núcleo das células (Cunha *et al.*, 1998).

De acordo com o modelo geralmente aceite, a replicação do HDV ocorre, à semelhança dos viróides, por um mecanismo de círculo rolante (Taylor, 2006). Todavia a estratégia de replicação utilizada pelo HDV antevê-se mais complexa. O genoma do HDV codifica para uma proteína e, conseqüentemente, qualquer modelo proposto para a replicação tem que considerar também a transcrição de mRNAs.

No núcleo das células, o genoma do HDV é utilizado como molde para a transcrição de mRNAs, bem como para a síntese de RNAs antigenómicos multiméricos. Os dois processos, segundo o modelo proposto por Hsieh e Taylor (1991), para a replicação do HDV, encontram-se separados temporalmente, constituindo a síntese de mRNA poliadenilado o primeiro evento do ciclo de replicação do vírus. Posteriormente, por um mecanismo que envolve o S-HDAg e a capacidade dos novos transcritos assumirem a conformação do tipo bastonete, o sinal de poliadenilação dos RNAs nascentes é silenciado. Permite-se assim, a continuação da transcrição para além do local de adição da cauda poli(A) e a produção de transcritos antigenómicos multiméricos que são depois processados por auto-clivagem (Hsieh and Taylor, 1991; Hsieh *et al.*, 1994). Este modelo apresenta sérias limitações, na medida em que, a síntese de mRNA que codifica para os HDAGs, ocorrendo apenas na fase inicial da replicação não seria favorável à produção de L-HDAg. Os RNAs que servem de molde à transcrição de mRNAs que codificam o L-HDAg surgem apenas em fases mais tardias do ciclo de replicação do HDV como resultado do editing do RNA antigenómico. A presença de L-HDAg é essencial para a interacção das RNPs do HDV com os HBsAgs, a montagem de partículas virais e a secreção. Como consequência da inibição precoce do sinal de poliadenilação, o L-HDAg não seria produzido, logo o ciclo de replicação do HDV não se finalizaria e a propagação da infecção seria interrompida.

Refutando a ideia da transcrição de mRNA poli(A) ocorrer apenas no início da replicação do HDV, Modahl e Lai (1998) mostraram que o mRNA é produzido em paralelo com o RNA

antigenómico e que a acumulação de mRNA não é inibida com o aumento dos níveis de expressão de HDVg. Estes resultados mostram-se compatíveis com um ciclo de replicação viral produtivo.

Um dos aspectos mais interessantes do ciclo de replicação do HDV reside no facto deste não codificar nenhuma RNA polimerase dependente de RNA e depender totalmente da maquinaria enzimática da célula hospedeira para a replicação/transcrição do seu genoma. As células mamíferas não codificam para RNA polimerases dependentes de RNA, o que pressupõe que o HDV redireccione uma RNA polimerase celular dos moldes normais de DNA.

De um modo geral, admite-se que a transcrição do mRNA do HDV e a síntese de RNA genómico (a partir de moléculas de RNA antigenómico) depende da RNA polimerase II celular (RNA pol II).

Vários estudos mostram que a síntese do RNA genómico e a transcrição de mRNAs do HDV são especificamente inibidas na presença de doses de alfa-amanitina, conhecidas por bloquearem a transcrição mediada pela RNA pol II (Fu and Taylor, 1993; Modahl *et al.*, 2000; Macnaughton *et al.*, 2002a; Filipovska and Konarska, 2000; Chang *et al.*, 2008). Esta inibição é, no entanto, apenas parcialmente revertida em células que codificam uma forma mutante, resistente à alfa-amanitina da RNA polimerase II (Modahl *et al.*, 2000). Além disso, os mRNAs originados por transcrição do genoma do HDV são modificados na extremidade 5' pela adição da estrutura *cap* e possuem uma cauda poli(A) na extremidade oposta, características comuns dos transcritos produzidos pela RNA pol II (Hsieh *et al.*, 1990). Adicionalmente, verificou-se que o antigenoma do HDV, à semelhança da maioria dos pré-mRNAs celulares, apresenta uma sequência consenso para poliadenilação (AAUAAA), situada 13 nt a montante do local de clivagem e do local de adição da cauda poli(A) seguida de uma pequena sequência rica em G e U (Hsieh *et al.*, 1990).

Se por um lado parece claro o envolvimento da RNA pol II na síntese de genomas e mRNAs do HDV, há controvérsia quanto à identidade da RNA polimerase responsável pela produção do RNA antigenómico.

A síntese de RNA antigenómico é resistente a concentrações elevadas de alfa-amanitina, sugerindo que a produção deste intermediário replicativo é mediada por uma RNA polimerase celular diferente da RNA pol II (Modahl *et al.*, 2000; Macnaughton *et al.*, 2002a). Curiosamente, o RNA antigenómico e o mRNA do HDV são transcritos a partir do mesmo molde de RNA (RNA genómico). No entanto, estes processos parecem ser independentes e têm lugar em compartimentos nucleares distintos.

Segundo Li *et al.* (2006), a síntese de novas moléculas de RNA genómico tem lugar no nucleoplasma em associação com os corpos nucleares PML. Por sua vez, o RNA antigenómico do HDV é produzido nos nucléolos presumivelmente pela acção da RNA polimerase I. Em conformidade com a ideia de que a replicação do RNA do HDV é realizada por duas RNA polimerases diferentes, mostrou-se que a síntese do RNA genómico é drasticamente reduzida na presença de anticorpos dirigidos contra a RNA pol II, enquanto a replicação do RNA antigenómico não sofre qualquer inibição. Porém, na presença de um anticorpo contra um factor de iniciação específico da transcrição mediada pela RNA polimerase I, SL1, observou-se uma redução de 80% da síntese de RNA antigenómico do HDV (Li *et al.*, 2006). Mais recentemente, Huang *et al.* (2008a) mostrou que uma forma mutante do S-HDAg com distribuição exclusivamente nucleolar (S-HDAg-NoLS) é capaz de activar *in trans* a síntese de antigenomas. Por outro lado, demonstrou-se que o S-HDAg mutante com localização nucleolar é incapaz de assegurar a replicação do RNA genómico do HDV que tem lugar no nucleoplasma. A realocação do S-HDAg-NoLS do nucléolo para o nucleoplasma por acção da actinomicina-D reverte o efeito inibitório desta forma mutante, na replicação do RNA genómico do HDV (Huang *et al.*, 2008a). Em suma, estes resultados sugerem que a replicação do RNA genómico e antigenómico do HDV ocorre em compartimentos nucleares separados, nucleoplasma e nucléolo, respectivamente com a participação de pelo menos duas RNA polimerases.

Os últimos resultados obtidos pelo grupo de J. Taylor (Fox Chase Cancer center, USA) contestam as evidências de que o antigenoma do HDV é replicado por uma RNA polimerase diferente da RNA pol II. Os ensaios de *run-on* conduzidos na presença de alfa-amanitina mostraram que a acumulação de antigenomas do HDV é fortemente inibida, cerca de 80%, na presença de alfa-amanitina, indicativo do envolvimento da RNA pol II na síntese deste RNA (Chang *et al.*, 2008). Diferenças a nível do processamento pós-transcricional e da estabilidade dos RNAs parecem contribuir para os efeitos observados na acumulação dos RNAs do HDV em resposta à inibição da RNA pol II (Chang *et al.*, 2006).

De acordo com a hipótese da RNA pol II ser a enzima responsável pela replicação do RNA do HDV, demonstrou-se através de técnicas de imunoprecipitação, que a RNA polimerase II interage com sequências de RNA, localizadas em ambas as extremidades da estrutura de bastonete do RNA genómico e antigenómico do HDV (Greco-Stewart *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2008). A sequência de RNA genómico do HDV (nt 1541 a 60) que interage com a RNA pol II possui uma estrutura do tipo *hairpin* e inclui o local previamente identificado como sendo o sítio de iniciação da transcrição do mRNA do HDAg (Gudima *et al.*, 2000). Mutações que

alteram esta conformação impedem a interacção com a RNA pol II *in vitro*, bem como, inibem a replicação do HDV *in vivo* (Beard *et al.*, 1996; Greco-Stewart *et al.*, 2007). Abraham e Pelchat (2008) provaram a existência de uma sequência promotora de RNA entre os nucleótidos 1541 e 60, reconhecida directamente pela holoenzima RNA pol II, no genoma do HDV, capaz de induzir a transcrição de um RNA de polaridade contrária, em extractos nucleares de células HeLa.

A transcrição mediada pela RNA polimerase II inicia-se com formação de um complexo de iniciação da transcrição activo (PIC) que envolve a um primeiro nível a ligação do factor de transcrição (de ligação à TATA-box), TFIID, a um promotor de DNA. Através de ensaios do tipo EMSA e de cromatografia de afinidade demonstrou-se que há formação de um PIC na região promotora do RNA do HDV, mediado pela interacção directa da proteína de ligação à TATA-box ao promotor. Verificou-se ainda que esta interacção é mediada pela subunidade TBP da proteína. Estes resultados suportam um modelo em que os promotores de RNA são reconhecidos pela RNA polimerase II de um modo análogo ao dos promotores de DNA (Abraham and Pelchat, 2008).

Foi ainda reportado que a proteína PSF, factor associado à transcrição mediada pela RNA pol II e ao splicing, liga-se especificamente às mesmas sequências de RNA do HDV reconhecidas pela RNA pol II (Greco-Stewart *et al.*, 2006). A proteína PSF foi identificada como uma das proteínas que interage simultaneamente com moléculas de mRNA e com o domínio CTD da RNA pol II (Emili *et al.*, 2002).

É de salientar que a transcrição do RNA do HDV foi realizado na ausência de S-HDAg, indicando que pelo menos em extractos nucleares de células HeLa, a iniciação da transcrição a partir do promotor de RNA identificado no genoma do HDV não exige a presença de S-HDAg. No entanto, do decurso da infecção natural pelo HDV ou mesmo em células em cultura, sabe-se que a presença da forma pequena do antigénio delta (S-HDAg) é essencial para a transcrição/replicação do HDV (Taylor, 2006). O modo através do qual o S-HDAg promove a replicação do RNA do HDV não se encontra clarificado. Uma explicação possível reside no facto do S-HDAg poder funcionar como um factor de transcrição e conseqüentemente regular a transcrição mediada pela RNA pol II.

Estudos prévios haviam demonstrado que o S-HDAg interage directamente com a RNA polimerase II, através de um domínio localizado na sua extremidade carboxílica (aminoácidos 130 a 195; Yamaguchi *et al.*, 2001). Esta região do S-HDAg apresenta similaridade de sequência, embora reduzida, com a região N-terminal da subunidade A do factor de alongamento da transcrição NELF. O NELF juntamente com outro factor que inibe o

alongamento da transcrição, o DSIF, liga-se à RNA polimerase II, sendo o seu efeito negativo no alongamento da transcrição revertido pela cinase P-TEFb que, ao fosforilar o domínio C-terminal da subunidade maior da RNA polimerase II, induz a dissociação do NELF. Verificou-se que o S-HDAg é capaz de reverter a inibição mediada pelo complexo NELF/DSIF e estimular o alongamento da transcrição de genes heterólogos, mas também de uma sequência de RNA do HDV *in vitro*. O S-HDAg compete com o NELF pela ligação à RNA pol II, o que induz a sua dissociação e compensa o seu efeito inibitório no alongamento da transcrição. A importância da interacção do S-HDAg com a RNA pol II no mecanismo de replicação do RNA do HDV foi investigada *in vivo*. Os resultados obtidos sugerem que a associação física entre o S-HDAg e a RNA polimerase celular constitui uma etapa do mecanismo pelo qual o S-HDAg é capaz de activar a replicação/transcrição do genoma do HDV. A RNA pol II é especificamente co-precipitada com o S-HDAg em células que suportam a replicação do genoma do HDV (Chang *et al.*, 2008). Mutações que impeçam a ligação do S-HDAg à RNA polimerase II tornam a proteína incapaz de suportar a replicação do RNA do HDV (Yamaguchi *et al.*, 2001). Obtiveram-se resultados semelhantes após a redistribuição do S-HDAg do nucleoplasma para os nucléolos das células. A incapacidade de activar a replicação do genoma do HDV deve-se ao facto do S-HDAg com localização nucleolar não estabelecer interacção com a RNA pol II (Huang *et al.*, 2008).

Encontra-se documentado que, além da RNA polimerase II, o S-HDAg interage directamente com outros factores celulares, nomeadamente com a proteína DIPA, a histona H1e, a proteína nucleolar B23, a nucleolina, a cinase PKR e com o factor de transcrição YY1 (Brazas and Ganem, 1996; Lee and Sheu, 2008; Lee *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2001a; Huang *et al.*, 2008b). Embora desempenhem funções diversas na célula hospedeira, verificou-se que, de um modo geral todos os factores celulares identificados modulam a replicação do HDV. A proteína nucleolar B23 e o factor de transcrição YY1 quando sobre-expressos estimulam a replicação do HDV (Huang *et al.*, 2001a; Huang *et al.*, 2008b). A proteína B23 pode formar um complexo estável com o factor de transcrição YY1 e ambos estão envolvidos na activação da transcrição de genes celulares como é o caso do gene PCNA que codifica para o antigénio nuclear de proliferação nuclear (Weng and Yung, 2005). O S-HDAg é encontrado em associação com o factor de transcrição YY1 num grande complexo proteico do qual faz parte a proteína B23 e dois co-activadores do factor de transcrição YY1, a acetiltransferase CBP e a proteína p300. Além disso, mostrou-se que a proteína nucleolar B23 encontra-se sobre-expressa em células onde decorre a replicação do HDV (Huang *et al.*, 2001a). Estudos prévios mostraram que antigénio do core do vírus da hepatite C (HCV) activa a transcrição do gene que

codifica a proteína B23 por um mecanismo que envolve a própria B23, o factor de transcrição YY1 e a acetiltransferase p300 (Mai *et al.*, 2006).

A sobre-expressão das acetiltransferases p300 e CBP ou o emprego de inibidores da acção das deacetilases resulta num aumento significativo da expressão do S-HDAg e da replicação do RNA do HDV (Huang *et al.*, 2008b; Tseng *et al.*, 2008). Sabe-se que a actividade transcricional do factor de transcrição YY1 é regulada por acetilação (Yao *et al.*, 2001). Alternativamente à acetilação do YY1, o efeito positivo da sobre-expressão das acetiltransferases p300 e CBP na replicação do HDV pode resultar da acção directa destas enzimas sobre o S-HDAg. Estudos anteriores mostraram que o S-HDAg é acetilado no resíduo de lisina 72 e que esta modificação pós-traducional regula a distribuição intracelular da proteína e a replicação do RNA do HDV (Mu *et al.*, 2004). A substituição do resíduo de lisina 72 por um resíduo de arginina (ambos são aminoácidos básicos mas a arginina não pode ser modificada por acetilação) causa acumulação do S-HDAg no citoplasma. Além disso, constatou-se que o mutante S-HDAg-K72R é menos eficiente do que a proteína do tipo selvagem na activação *in trans* da replicação do antígenoma do HDV. Verificou-se contudo que a acetilação do resíduo de lisina 72 do S-HDAg não interfere com a síntese de RNA antígenómico do HDV, sugerindo que a replicação do RNA genómico e antígenómico do vírus tem requisitos distintos em relação a modificações pós-traducionais do S-HDAg.

Para além de ser acetilado, o S-HDAg é ainda modificado por metilação. O HDAg apresenta dois motivos RGG que são locais potenciais de metilação, catalizados pela família das metiltransferases de arginina do tipo 1 (PRTM1). A metilação desempenha um papel semelhante à da acetilação na replicação do RNA do HDV e na distribuição intracelular do S-HDAg. A acumulação de RNA genómico é drasticamente reduzida na presença de S-HDAg com uma mutação no sitio preferencial para metilação (arginina 13), enquanto que a síntese de RNA antígenómico não sofre inibição significativa. Contrastando com a localização predominantemente nuclear da proteína do tipo selvagem, o S-HDAg não metilado no resíduo de arginina 13 acumula-se no citoplasma das células sendo incapaz de promover a importação nuclear de RNPs do HDV formadas por RNA antígenómico (Li *et al.*, 2004).

Estes resultados indicam que a ocorrência de modificações pós-traducionais desempenha um papel essencial na replicação do genoma do HDV. Estudos anteriores referem a existência de uma forte relação entre a fosforilação do S-HDAg e a replicação do RNA do HDV (Chen *et al.*, 2002; Mu *et al.*, 2001; Yeh *et al.*, 1996). Apesar da falta de evidências directas suspeita-se do envolvimento cinase da caseína II (CKII) na fosforilação do S-HDAg. A inibição da sua actividade diminui em cerca de 50% a fosforilação do S-HDAg e causa uma redução

acentuada na acumulação de RNA do HDV (Yeh *et al.*, 1996). A mutação de um dos locais consenso da cinase CKII, resíduo de serina 2 do S-HDAg, tem um impacto semelhante à utilização de inibidores da fosforilação na replicação do genoma do HDV, consolidando a hipótese desta cinase participar no ciclo de replicação do HDV.

O S-HDAg possui um resíduo de serina altamente conservado na posição 177 que se encontra fosforilado *in vivo* e é substrato da cinase PKR *in vitro* (Chen *et al.*, 2002). Estudos de mutagénesis dirigida mostraram que a fosforilação do resíduo de serina 177 do S-HDAg é crucial para a síntese de RNA genómico do HDV (Mu *et al.*, 2001). Mais recentemente, foram identificadas duas novas cinases, a ERK1 e ERK2 capazes de catalizar a fosforilação *in vitro*, bem como *in vivo*, do resíduo de serina 177 do S-HDAg. Tal como acontece com a PKR, a inibição da actividade das enzimas ERK1/2 é acompanhada de uma redução significativa do estado de fosforilação do S-HDAg. Contudo, a actividade destas cinases tem um efeito oposto ao da PKR na replicação do genoma do HDV. Enquanto que a inibição das cinases ERK1/2 inibe a replicação do vírus, a supressão da actividade da PKR está associada a um aumento da replicação do HDV (Chen *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2008). Por outro lado, a activação das cinases ERK1/2 causa um aumento na acumulação de RNA genómico e uma redução (dose-dependente) na quantidade de RNA antigenómico (Chen *et al.*, 2008).

Estes resultados reforçam a ideia que a replicação do HDV é altamente regulada por modificações pós-traducionais que ocorrem a nível do S-HDAg e que a síntese de RNA genómico é a etapa do ciclo de replicação do vírus mais sensível à fosforilação, acetilação e metilação do S-HDAg. Além disso, demonstrou-se que estas modificações pós-traducionais interferem igualmente com a transcrição de mRNA a partir do RNA genómico do HDV. De todas as modificações pós-traducionais, a metilação do resíduo de arginina 13 do S-HDAg é a que mais afecta a transcrição do mRNA do HDV. A substituição do resíduo de arginina 13 do S-HDAg por um resíduo de alanina resulta na inibição quase completa da transcrição do mRNA do vírus (Tseng *et al.*, 2008).

Embora os mecanismos moleculares pelos quais as modificações pós-traducionais do S-HDAg participam na regulação da replicação do HDV, estejam pouco elucidados, dados recentes, sugerem que a fosforilação do resíduo serina 177 do S-HDAg modula a interacção entre o S-HDAg e a RNA pol II. Este aminoácido do S-HDAg faz parte da sequência de aminoácidos envolvida na interacção com a RNA polimerase II. Demonstrou-se, por mutagénesis dirigida, que a substituição do resíduo de serina 177 do S-HDAg por uma alanina, diminui a quantidade de RNA pol II co-imunoprecipitada com o S-HDAg, e inibe a replicação viral. Estes resultados

sugerem que a fosforilação do resíduo serina 177 do S-HDAg potencia a replicação do HDV por um mecanismo que envolve a interação do S-HDAg com a RNA pol II (Chen *et al.*, 2008).

### **I.1.5.3 FORMAÇÃO DE PARTÍCULAS VIRAIS DO HDV**

Outros aspectos interessantes do ciclo de replicação do HDV são os mecanismos moleculares subjacentes à formação de partículas virais. Tal como foi mencionado, o L-HDAg é indispensável para a interação das RNPs do HDV com os HBsAgs. Contudo, as RNPs do HDV e os HBsAgs encontram-se confinados em compartimentos celulares distintos. Os HBsAgs localizam-se somente no citoplasma das células, uma vez que são glicoproteínas associadas ao retículo endoplasmático. Contrariamente, as RNPs do HDV encontram-se quase exclusivamente no núcleo das células, apresentando uma distribuição que pode ser nucleoplasmática difusa e/ou em inclusões granulares esféricas que recebem o nome de focos delta (Cunha *et al.*, 1998).

Utilizando ensaios de heterocariontes, Tavanez *et al.* (2002) demonstraram que as RNPs do HDV fazem um vai-vém contínuo entre o núcleo e o citoplasma das células, sendo este transporte independente da presença de HBsAgs no citoplasma. Ainda que as RNPs do HDV possam ser exportadas para o citoplasma na ausência do HBV, a montagem de partículas virais só é possível na presença dos HBsAgs. No caso de não se estabelecer interação entre os componentes do HDV e os HBsAgs, as RNPs do HDV são importadas para o compartimento de origem, o núcleo, sendo este processo mediado pelo NLS presente nos HDAGs. O facto de ambos os HDAGs possuírem um NLS colocou a hipótese de pelo menos o L-HDAg ou mesmo os dois HDAGs conterem um NES na sua sequência responsável pela exportação nuclear das RNPs do HDV. De facto, Lee *et al.* (2001) referiu a existência de um NES no L-HDAg, entre os aminoácidos 198 e 210, capaz de induzir a exportação nuclear de uma proteína repórter. Não foi possível contudo, reproduzir estes resultados utilizando os ensaios de heterocariontes. Na ausência de RNA do HDV nenhum dos HDAG é exportado para o citoplasma, concluindo-se que nenhum dos antígenos delta possui um NES. Contrariamente, o RNA do HDV é capaz de ser exportado na ausência dos HDAGs, permitindo prever que os sinais para exportação das RNPs do HDV encontram-se no RNA do vírus (Tavanez *et al.*, 2002).

## CAPÍTULO II.

### EXPORTAÇÃO NUCLEAR DO RNA DO HDV

---



## II.1 INTRODUÇÃO

---

### II.1.1 O TRANSPORTE NÚCLEO-CITOPLASMÁTICO

Nas células eucariotas, o núcleo está fisicamente separado do compartimento citoplasmático por uma dupla membrana, designada de invólucro nuclear (NE). O NE é atravessado em múltiplos pontos por estruturas supramoleculares, designadas de complexos do poro nuclear (NPCs), especializados no transporte bidireccional de moléculas, entre o núcleo e o citoplasma das células eucariotas interfásicas.

O número de NPCs por célula difere muito de espécie para espécie, sendo dependente do tamanho da célula e da sua actividade. As leveduras apresentam cerca de 200 NPCs, enquanto uma célula humana e um oócito de *Xenopus* maduro poderão ter cerca de 5000 a  $5 \times 10^7$  NPCs por núcleo (Lim *et al.*, 2008).

Estudos de microscopia electrónica mostraram que, na generalidade dos casos, a estrutura tridimensional do NPC encontra-se conservada, mesmo em espécies evolutivamente afastadas (Adam, 2001). Os NPCs apresentam uma estrutura cilíndrica tripartida. No local de fusão entre a membrana externa e interna do NE encontra-se ancorada a estrutura central do NPC. Esta estrutura é constituída por oito subunidades que na face nuclear e citoplasmática do NPC formam os anéis nuclear e citoplasmático, respectivamente (Suntharalingam and Wentz, 2003). Do anel citoplasmático emanam oito filamentos de 50 nm de comprimento em direcção ao citoplasma e do anel nuclear provêm oito filamentos mais compridos, com cerca de 75 nm, que convergem numa estrutura anelar designada de cesto nuclear. Incluso, na estrutura central do NPC encontra-se o canal central, através do qual efectua-se o transporte núcleo-citoplasmático (Suntharalingam and Wentz, 2003). O canal central do NPC, com um diâmetro funcional de 30 nm, permite a passagem por difusão passiva a iões e pequenas moléculas, incluindo proteínas com massas moleculares inferiores a 40 kDa. No entanto, o tráfego de proteínas maiores e das ribonucleoproteínas através do NPC é efectuado por mecanismos de transporte activo com a participação de proteínas especializadas no transporte nuclear (Fahrenkrog and Aebi, 2003).

A análise da composição proteica dos NPCs de vertebrados e leveduras por abordagens proteómicas revelou que os NPCs são constituídos apenas por 30 proteínas diferentes, designadas de nucleoporinas (Rout *et al.*, 2000; Cronshaw *et al.*, 2002). Cerca de um terço destas proteínas possuem um motivo estrutural característico, constituído por múltiplas

repetições de motivos ricos em resíduos de fenilalanina e glicina (motivos FG; Cronshaw *et al.*, 2002). As nucleoporinas FG apresentam características bioquímicas semelhantes às proteínas intrinsecamente desestruturadas, sugerindo que assumem uma conformação flexível (Denning *et al.*, 2003).

A maioria das nucleoporinas apresenta uma distribuição simétrica em relação ao plano médio do invólucro nuclear com duas a quatro cópias por subunidade da estrutura central do NPC (Rout *et al.*, 2000). Com base na abundância relativa e massa molecular de cada nucleoporina estimou-se que a massa molecular dos NPC das leveduras e dos vertebrados ronda aproximadamente os 44 e 60 MDa, respectivamente (Rout *et al.*, 2000; Cronshaw *et al.*, 2002). Estes valores distinguem-se das estimativas iniciais, obtidas por microscopia electrónica de varrimento-transmissão, que atribuíram uma massa molecular de 125 MDa aos NPCs de vertebrados e de 60 MDa aos NPCs de levedura (Reichelt *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1998).

## II.1.2 RECEPTORES DE TRANSPORTE

O transporte núcleo-citoplasmático através dos NPCs, para a maioria das macromoléculas, é um processo mediado por receptores de transporte solúveis, geralmente pertencentes a uma família de proteínas denominada de carioferinas- $\beta$  (Mosammaparast and Pemberton, 2004). As carioferinas- $\beta$  são responsáveis pela importação e exportação de todas as proteínas que apresentam dimensões acima do limite de exclusão para a difusão simples através dos NPCs, bem como dos RNAs celulares não codificantes. No caso das proteínas, a formação de complexos de importação ou exportação nuclear depende da interacção das carioferinas- $\beta$  com pequenos motivos proteicos designados de sinais de localização nuclear (NLS) ou de exportação nuclear (NES) presentes nas cargas proteicas (Sekimoto *et al.*, 2005). Os mecanismos moleculares responsáveis pelo transporte do RNA através do NPC são, de um modo geral, mais complexos, dado que, a ligação do receptor de transporte ao RNA é feita por intermédio de proteínas adaptadoras (Kohler and Hurt, 2007).

As proteínas desta família, com 14 membros identificados nas leveduras e 20 nos eucariotas superiores, recebem a designação de importinas ou exportinas, consoante a direcção em que transportam o substrato através do NPC (Mosammaparast and Pemberton, 2004). As carioferinas- $\beta$  são proteínas acídicas, com massa molecular entre 90 a 145 kDa, que se caracterizam pela capacidade de interacção directa com a GTPase Ran e com os domínios FG das nucleoporinas (Chook and Blobel, 2001).

A GTPase Ran é uma proteína monomérica de 24 kDa, abundante nas células, que pertence à superfamília das Ras. Tal como as outras GTPases, esta proteína pode existir sob duas formas distintas, consoante se encontra ligada, a GTP ou a GDP. As duas formas da GTPase Ran distribuem-se assimetricamente entre o núcleo e o citoplasma, localizando-se a Ran ligada a GTP (RanGTP), predominantemente, no núcleo e a Ran ligada a GDP (RanGDP) no citoplasma das células (Kalab and Heald, 2008). Esta distribuição assimétrica das duas formas da GTPase Ran é mantida pela compartimentação celular das proteínas reguladoras específicas da proteína Ran (Kalab and Heald, 2008). Tal como, nos outros membros da família das Ras, a hidrólise de GTP em GDP através da actividade de GTPase intrínseca da Ran ocorre a um ritmo muito lento. Porém, esta actividade é promovida pelas proteínas citoplasmáticas RanGAP e RanBP1. A reacção inversa, isto é a conversão de RanGDP em RanGTP é estimulada pela proteína nuclear RCC1 que, ao ligar-se à RanGDP, promove a dissociação do GDP e a ligação de GTP no centro activo da Ran. A acção combinada das proteínas reguladoras da proteína Ran resulta na criação e perpetuação de um gradiente de RanGTP através do invólucro nuclear (Kalab and Heald, 2008). Este gradiente é um elemento chave no estabelecimento da direcionalidade do transporte núcleo-citoplasmático, dado que a interacção das carioferinas- $\beta$  com os seus substratos é regulada pelo gradiente de RanGTP (Gorlich and Kutaj, 1999; Madrid and Weis, 2006).

A associação estável das importinas com os respectivos substratos ocorre unicamente na ausência de RanGTP, conseqüentemente, a formação dos complexos de importação nuclear tem lugar apenas no citoplasma das células (Gorlich *et al.*, 1996a). A ligação da proteína RanGTP às importinas, na face nuclear do NPC, é crucial para a dissociação da carga do receptor de transporte e para o seu retorno ao citoplasma. Após a chegada das importinas livres da carga ao citoplasma é necessária a hidrólise do GTP para que a proteína Ran se liberte das importinas, ficando estas livres para um novo ciclo de importação nuclear.

Contrariamente às importinas, as exportinas formam complexos estáveis com os substratos a exportar exclusivamente na presença de RanGTP, razão pela qual, os complexos de exportação formam-se no núcleo. Após o transporte para o citoplasma, a ligação cooperativa da proteína RanGTP e do substrato a uma exportina é quebrada por hidrólise do GTP, sendo as exportinas, reimportadas para o núcleo (Madrid and Weis, 2006).

Como resultado dos ciclos de importação e exportação nuclear, a proteína RanGTP é continuamente exportada do núcleo para o citoplasma em associação com as importinas e exportinas e, posteriormente, libertada sob a forma RanGDP no citoplasma. Cada ciclo de transporte mediado por receptores da família das carioferinas- $\beta$  resulta na exportação de uma

molécula de Ran. No caso da proteína RanGDP não ser re-importada para o núcleo verificar-se-ia uma depleção de RanGTP no núcleo e uma acumulação de RanGDP no citoplasma, o que resultaria na interrupção do gradiente de RanGTP e no bloqueio do transporte unidireccional através do NPC (Gorlich and Kutay, 1999).

Para além das proteínas reguladoras da proteína Ran, o gradiente de RanGTP é conservado pela constante importação nuclear da proteína RanGDP. O transporte nuclear da proteína RanGDP é assegurado pelo factor de importação NTF2 (Ribbeck *et al.*, 1998; Quimby *et al.*, 2000). A NTF2 é uma proteína conservada com cerca de 15 kDa que liga-se especificamente à proteína Ran na forma RanGDP (Ribbeck *et al.*, 1998). A importação da proteína RanGDP é um processo que não implica gastos energéticos e o complexo sofre dissociação após a conversão de RanGDP em RanGTP pela proteína nuclear RCC1 (Ribbeck *et al.*, 1998).

Para além das carioferinas- $\beta$ , existe uma outra família de receptores de transporte nuclear, denominada de NXF, na qual estão agrupadas as proteínas envolvidas na exportação da maioria das moléculas de mRNA celular e codificadas por vírus. Estas proteínas diferem das carioferinas- $\beta$ , na medida em que, não são directamente reguladas pela GTPase Ran (Izaurralde, 2002). Porém, partilham com as carioferinas- $\beta$  a capacidade de interacção directa com as unidades estruturais e funcionais dos NPCs, nomeadamente as nucleoporinas FG (Izaurralde, 2002).

### II.1.3 MODELOS EXPLICATIVOS PARA O TRANSPORTE NUCLEAR

Apesar dos avanços no conhecimento da arquitectura e composição molecular do NPC, o mecanismo preciso através do qual o NPC actua, como uma barreira com permeabilidade selectiva, permanece elusivo. Contudo, mostrou-se que a interacção dos receptores de transporte com os motivos FG das nucleoporinas é essencial para a translocação através do NPC (Bednenko *et al.*, 2003a; Weis *et al.*, 2003). De acordo com esta visão, foi demonstrado que a remoção dos domínios de ligação às nucleoporinas FG da importina- $\beta$  resulta na total abolição das vias de importação nuclear mediadas pela proteína fundadora da família das carioferinas- $\beta$  (Bednenko *et al.*, 2003b; Bayliss *et al.*, 2000).

De acordo com o modelo proposto por Rout *et al.* (2000) a presença de numerosas nucleoporinas filamentosas à entrada de ambas as faces do canal central do NPC oferece resistência à difusão passiva da maioria das macromoléculas. No entanto, as macromoléculas que se encontram ligadas aos respectivos receptores de transporte, por interacção com os

motivos FG, aumentam o tempo de residência nas imediações do canal central do NPC e desta forma, a probabilidade de o atravessar. É de referir que o transporte vectorial através do NPC, acessível às macromoléculas associadas aos receptores de transporte, é estabelecido pela distribuição assimétrica da proteína RanGTP e de algumas nucleoporinas. Em suma, este modelo suporta a existência de uma barreira virtual originada pela disposição desordenada das nucleoporinas filamentosas à volta do canal central do NPC, que impedem a passagem de proteínas e RNAs que não se encontram ligados às proteínas transportadoras (Rout *et al.*, 2003). O modelo de fase selectiva, proposto por Ribbeck e Gorlich (2001, 2002), prevê que o canal central do NPC está preenchido por nucleoporinas ricas em motivos FG que interagem umas com as outras formando uma rede hidrofóbica. Para moléculas hidrofílicas, esta rede actua como um crivo, permitindo a passagem apenas a moléculas com tamanhos inferiores ao diâmetro do crivo. A moléculas maiores só lhes é permitida a passagem em associação com receptores de transporte que apresentam domínios de ligação aos motivos FG. Estes complexos ao ligarem-se aos motivos FG causam a dissociação local da rede de interações formada pelas nucleoporinas. Como suporte a este modelo, Frey *et al.* (2006), mostraram que os motivos FG da nucleoporina Nsp1p de levedura formam um hidrogel *in vitro*, bastante elástico e mecanicamente estável, estando a formação do hidrogel totalmente dependente dos motivos FG. A substituição dos resíduos de fenilalanina por serinas impede a formação do hidrogel *in vitro*, tendo-se verificado que estas mutações são letais para a levedura (Frey *et al.*, 2006).

A observação de que a afinidade de ligação entre a importina- $\beta$  e as nucleoporinas FG é progressivamente maior para as nucleoporinas situadas na face nuclear do NPC e que a importina- $\beta$  possui mais do que um domínio de interação com as nucleoporinas FG, levou Ben-Efraim e Gerace (2001) a propor um terceiro modelo para o transporte nuclear. Segundo estes investigadores, a deslocação dos complexo de importação é favorecida no sentido citoplasma-núcleo devido à crescente afinidade da importina- $\beta$  pelas nucleoporinas localizadas mais distalmente no NPC. Ainda que o mecanismo pelo qual os complexos de importação são libertados do primeiro local de ligação e estabelecem ligação com as nucleoporinas seguintes seja desconhecido, suspeita-se que a interação simultânea dos complexos de importação com duas nucleoporinas promova a dissociação do complexo de importação da nucleoporina, com a qual, apresenta menor afinidade e a subsequente associação com nucleoporina seguinte.

O modelo de gradiente de afinidade prevê que os complexos de exportação se desloquem através do NPC de um modo semelhante ao descrito para as vias de importação mediadas pela importina- $\beta$ . Este modelo baseia-se na distribuição assimétrica de alguns constituintes do NPC

e sugere que o próprio NPC impõe uma direcionalidade no transporte nuclear. Porém, a maioria das nucleoporinas FG apresenta uma distribuição simétrica, tendo-se verificado que as nucleoporinas distribuídas assimetricamente são dispensáveis para a maioria das vias de transporte nuclear (Zeitler and Weis, 2004). Por outro lado, as interacções muito estáveis entre um receptor de transporte e as nucleoporinas FG levaria a que a translocação se efectuasse a uma velocidade muito lenta. Para além disso, a demonstração de que a direcionalidade do transporte nuclear pode ser invertida na presença de elevadas concentrações de RanGTP no citoplasma indica que o NPC não impõe directamente uma direcção no fluxo núcleo-citoplasmático (Nachury and Weis, 1999).

## **II.1.4 EXPORTAÇÃO NUCLEAR DE RNAs NÃO CODIFICANTES**

A exportação nuclear do RNA de transferência (tRNA), microRNA (miRNA), pequenos RNAs nucleares (snRNA) e do RNA ribossomal (rRNA) segue o modelo atrás mencionado que envolve a utilização de exportinas pertencentes à família das carioferinas- $\beta$  e a GTPase Ran.

### **II.1.4.1 A EXPORTAÇÃO NUCLEAR DO RNA DE TRANSFERÊNCIA (tRNA)**

A via de exportação nuclear utilizada pelo tRNA foi o primeiro mecanismo de transporte núcleo-citoplasmático a ser descrito como mediado por um factor celular saturável e dependente da temperatura (Zasloff *et al.*, 1983). No entanto, a identidade do factor celular responsável pela exportação nuclear do tRNA, só foi identificada quase duas décadas depois (Arts *et al.*, 1998a; Kutay *et al.*, 1998). Os tRNAs são exportados para o citoplasma por um mecanismo que envolve a interacção directa com um membro da família das carioferinas- $\beta$ , designado de exportina-t (Arts *et al.*, 1998a; Kutay *et al.*, 1998). A ligação da proteína Ran-GTP à exportina-t é necessária para a formação de um complexo de exportação estável com o tRNA (Arts *et al.*, 1998a; Kutay *et al.*, 1998).

A exportina-t reconhece elementos estruturais conservados dos tRNAs, tendo-se comprovado que a ansa T $\psi$ C e o braço receptor são essenciais para a ligação da exportina-t com os tRNAs. Para além disso, verificou-se que mutações que causam perturbações na estrutura terciária da molécula de tRNA, impossibilitam a formação do complexo tRNA/exportina-t/RanGTP *in vitro* e a exportação nuclear *in vivo* (Arts *et al.*, 1998b; Lipowsky *et al.*, 1999).

Antes de serem exportados, os tRNAs sintetizados pela RNA polimerase III sofrem uma série complexa de modificações pós-transcricionais que têm lugar exclusivamente no núcleo. O processamento do tRNA inclui a remoção dos nucleótidos extra dos extremos 5' e 3', a adição do terminal CCA ao extremo 3', a modificação de algumas bases e a remoção de pequenos intrões. Outras modificações pós-transcricionais, importantes no funcionamento do tRNA, são a reacção de aminoacilação, em que o tRNA é conjugado com o seu aminoácido específico e a interacção com o factor de alongamento da tradução eEF1A. Ainda que, inicialmente, se tenha pensado que a aminoacilação e a interacção com o factor eEF1A têm lugar exclusivamente no citoplasma, dados mais recentes indicam que estas duas reacções podem ocorrer no núcleo (Mucha, 2002).

Os ensaios de microinjecção em *Xenopus* mostraram que apenas as moléculas de tRNA maduras são eficientemente exportadas para o citoplasma, indicando que a exportina-t é capaz de discriminar os tRNAs maduros daqueles tRNAs que, ainda, não completaram o processamento.

Ensaio de ligação *in vitro* mostraram que a exportina-t tem uma afinidade 10 vezes superior para moléculas de tRNA com os extremos 5' e 3' correctamente processados (Lipowsky *et al.*, 1999). De modo semelhante, a exportina-t tem cerca de cinco vezes mais afinidade de ligação por tRNAs com as bases modificadas do que para tRNAs sintetizados *in vitro*, que não sofrem este tipo de modificações (Kutay *et al.*, 1998; Lipowsky *et al.*, 1999). Pelo contrário, o *splicing* do tRNA não altera a afinidade da ligação da exportina-t com os tRNAs *in vitro*, indicando que *in vivo*, a exportina-t não é capaz de discriminar os tRNAs maduros daqueles que possuem intrões (Arts *et al.*, 1998b; Lipowsky *et al.*, 1999). As experiências de microinjecção em *Xenopus* evidenciaram que apenas as moléculas de tRNA com os extremos correctamente processados são substrato para a exportina-t, verificando-se que as formas imaturas ficam retidas no núcleo, mesmo na presença de excesso de exportina-t. De igual modo, em condições fisiológicas, os tRNAs contendo intrões ficam retidos no núcleo até conclusão da reacção de *splicing*. Porém, na presença de exportina-t em excesso, ambos os tRNAs são exportados para o citoplasma, a uma taxa semelhante.

Tal como o *splicing*, a reacção de aminoacilação não interfere com a ligação da exportina-t com os tRNAs *in vitro* (Arts *et al.*, 1998b). No entanto, vários estudos apresentaram evidências experimentais de que a ligação covalente do tRNA com o seu aminoácido específico, catalizada pelas aminoacil tRNA sintetases (aaRS), aumenta a eficiência da exportação nuclear dos tRNAs. No que diz respeito à distribuição intracelular, a maioria das aminoacil-tRNA-sintetases localiza-se no citoplasma das células, em complexos multienzimáticos de elevada

massa molecular. Porém, a sua presença no núcleo foi comprovada em leveduras e em células de mamíferos (Mucha, 2002).

Lund e Dahlberg (1998) demonstraram que a maioria, senão todos os tRNAs podem ser aminoacilados no núcleo dos oócitos de *Xenopus*. A influência da aminoacilação no transporte núcleo-citoplasmático foi comprovada em *Xenopus* e em *S. cerevisiae*. A inibição da reacção de aminoacilação, apesar de não bloquear a saída dos tRNAs, resulta numa redução significativa da taxa de exportação nuclear desta classe de RNA em *Xenopus* (Lund and Dahlberg, 1998).

Em *S. cerevisiae*, mutações condicionais nos genes que codificam para aminoacil-tRNA-sintetases inibem a exportação nuclear dos respectivos tRNAs, observando-se que a diminuição na taxa de exportação nuclear, por vezes, estende-se a tRNAs não cognatos (Sarkar *et al.*, 1999; Azad *et al.*, 2001).

Em oócitos de *Xenopus*, a inibição da exportina-t, por microinjecção de um anticorpo específico no núcleo das células, resulta numa redução de cerca de 80% na exportação nuclear do tRNA (Arts *et al.*, 1998b; Kutay *et al.*, 1998).

Destes resultados depreende-se que a exportação nuclear da maioria dos tRNAs está a cargo da exportina-t e, caso existam vias de exportação alternativas, a sua contribuição nesse processo parece ser pouco significativa. Não obstante, dois grupos de investigadores mostraram que os vertebrados possuem uma via alternativa, independente da exportina-t para a exportação nuclear do tRNA (Bohnsack *et al.*, 2002; Calado *et al.*, 2002).

Em paralelo com a via mediada pela exportina-t, os tRNAs podem ser exportados em conjunto com a exportina-5 e a proteína Ran-GTP (Bohnsack *et al.*, 2002; Calado *et al.*, 2002). Tal como foi demonstrado para a exportina-t, a microinjecção de exportina-5 recombinante nos núcleos dos oócitos de *Xenopus* é suficiente para reverter o efeito inibitório na exportação nuclear do tRNA, causado por saturação do transporte mediado pela exportina-t.

Para além de ter como substrato o tRNA, a exportina-5 é o factor de transporte responsável pela exportação do factor de alongamento da tradução eEF1A (Bohnsack *et al.*, 2002; Calado *et al.*, 2002). Porém, a interacção entre a exportina-5 e a proteína eEF1A não é directa, ocorrendo por intermédio do tRNA.

A proteína eEF1A liga-se, preferencialmente, a moléculas de tRNA aminoaciladas (tRNA-aa), tendo-se demonstrado que a aminoacilação do tRNA é condição necessária para a associação da exportina-5 com a proteína eEF1A. Por outro lado, a interacção da exportina-5 com os tRNAs é independente do tRNA estar, ou não, aminoacilado (Bohnsack *et al.*, 2002; Calado *et al.*, 2002).

Nas leveduras a exportação nuclear dos tRNAs é mediada por uma proteína homóloga da exportina-t, a exportina Los1p. Mutações no gene LOS1 causam acumulação dos tRNAs no núcleo das células e, tal como acontece nos eucariotas superiores, a ligação entre a Los1p e o tRNA é regulada pela GTPase Ran (Hooper and Phizicky, 2003). No entanto, a função da exportina Los1p é dispensável para a viabilidade das leveduras, o que sugere a existência de vias redundantes que compensam os defeitos na exportação nuclear causados pela inativação do gene LOS1. É de salientar que as mutações condicionais no gene LOS1 afectam igualmente o *splicing* dos tRNAs, verificando-se a acumulação de tRNAs com intrões no núcleo das células. Porém, foi demonstrado que a endonuclease responsável pelo *splicing* dos tRNAs, em leveduras, é uma enzima com localização citoplasmática associada à membrana externa das mitocôndrias (Dahlberg and Lund, 2005). Esta descoberta alterou o paradigma anteriormente aceite de que o *splicing* precede a exportação nuclear. Esta descoberta não explica contudo a acumulação de tRNAs maduros, observada nos núcleos de leveduras defectivas na exportação nuclear desta classe de RNAs.

Ensaio realizados em heterocariontes demonstraram, claramente, que após a transcrição o pré-tRNA é exportado para o citoplasma, onde ocorre o *splicing*, sendo o tRNA maduro de seguida importado para ambos os núcleos dos heterocariontes (Takano *et al.*, 2005). A acumulação de tRNAs maduros no núcleo das células só é observada em leveduras defectivas na exportação nuclear de tRNAs. Em estirpes selvagens, os tRNAs maduros são rapidamente exportados para o citoplasma impossibilitando a sua observação.

A importação nuclear de tRNAs maduros pode constituir uma etapa de um mecanismo celular complexo de monitorização da integridade e consequente funcionalidade dos tRNAs clivados no citoplasma. A suportar esta hipótese identificou-se recentemente um complexo nuclear em leveduras, o Trf4p, que em conjunto com o exossoma, medeia a degradação dos tRNAs mutantes (Kadaba *et al.*, 2006).

É de salientar que as estirpes de levedura utilizadas nestes trabalhos apresentam supressão dos genes que codificam para a exportina Los1p e Msn5. Demonstrou-se que a co-supressão destes dois genes potencia a inibição da exportação nuclear dos tRNAs maduros (Takano *et al.*, 2005). O efeito sinérgico da supressão de Msn5p em leveduras mutantes Los1p, na inibição da exportação nuclear de tRNAs, sugere que a Msn5p desempenha funções semelhantes à exportina-5 (homóloga da Msn5p em eucariotas superiores) no transporte núcleo-citoplasmático dos tRNAs (Takano *et al.*, 2005). Em conclusão, sustenta-se, quer em eucariotas superiores quer em leveduras, um modelo para a exportação nuclear dos tRNAs com duas e, provavelmente, mais do que duas vias.

### II.1.4.2 EXPORTAÇÃO NUCLEAR DE MICRORNAS (miRNAs)

Os microRNAs constituem uma família numerosa de RNAs não codificantes, de aproximadamente 22 nucleótidos, que apresentam um papel fundamental na regulação da expressão génica a nível pós-transcricional (Du and Zamore, 2005).

Os microRNAs são transcritos pela RNA polimerase II e, tal como, os mRNAs são poliadenilados e adquirem uma estrutura *cap* na extremidade 5'. O modelo actual para a biogénese dos miRNAs em animais propõe que a maturação dos miRNAs ocorre em duas etapas, que têm lugar em compartimentos celulares distintos (Kim, 2004).

A primeira etapa, nuclear, inicia-se com clivagem do miRNA primário pela RNase III Drosha que dá origem a RNAs com cerca de 70 nucleótidos, em forma de grampo, com dois nucleótidos protuberantes na extremidade 3'. Estas formas intermediárias são reconhecidas por um receptor de transporte e exportadas para o citoplasma.

No citoplasma a RNase III Dicer cliva os miRNA precursores, aproximadamente 22 nucleótidos da extremidade gerada pela enzima Drosha, originando pequenos RNAs de cadeia dupla. Apenas uma das cadeias do miRNA é incorporada nos complexos de silenciamento induzidos por RNA (complexo RISC) enquanto a outra cadeia é degradada (Du and Zamore, 2005). Uma vez incorporado nos complexos RISC, o miRNA vai direccionar a clivagem específica de mRNAs que possuam sequências complementares ao miRNA, ou reprimir a sua tradução.

Devido à compartimentação espacial das duas etapas de maturação da biogénese dos miRNAs, a exportação nuclear das formas precursoras dos microRNAs maduros representa um passo crucial na formação de miRNAs activos.

As experiências de microinjecção em *Xenopus* mostraram que a exportação nuclear dos pré-miRNAs é saturável e dependente de RanGTP, indicando que este mecanismo é mediado por uma exportina pertencente à família das carioferinas- $\beta$  (Bohnsack *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004).

Os pré-miRNAs são transportados activamente do núcleo para o citoplasma, pelo complexo proteico formado pela exportina-5 associada à proteína Ran-GTP (Yi *et al.*, 2003; Bohnsack *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004). De acordo com os ensaios de microinjecção em *Xenopus*, os miRNAs dependem totalmente da exportina-5 para saírem do núcleo, o que indica que para esta classe de RNA, as células não possuem vias de exportação nuclear alternativas (Bohnsack *et al.*, 2004). O papel da exportina-5 na exportação nuclear dos miRNAs foi ainda confirmado, recorrendo a técnicas de RNA de interferência (RNAi; Yi *et al.*, 2003; Lund *et al.*, 2004). Yi *et al.* (2003) demonstraram que inibição da expressão da exportina-5 é capaz de reverter o

silenciamento pós-transcricional induzido por um miRNA humano num gene repórter. O aumento da expressão do gene repórter resulta da inibição da exportação nuclear das formas intermediárias dos miRNAs, que desta forma, não completam as etapas de maturação citoplasmáticas (Yi *et al.*, 2003). Contrariamente, a sobre-expressão da exportina-5 causa um aumento da expressão de miRNA maduro no citoplasma das células, correlacionado com uma maior inibição da expressão do gene repórter (Yi *et al.*, 2005).

O complexo exportina-5/Ran-GTP, para além de estar envolvido no transporte activo dos pré-microRNAs e dos tRNAs do núcleo para o citoplasma, é ainda, responsável pela exportação nuclear de uma espécie de RNA não codificante (RNA VA1), abundante nas células infectadas pelos adenovírus (Gwizdek *et al.*, 2001; 2003). Estes RNAs codificados pelo genoma dos adenovírus são sintetizados pela RNA polimerase III e acumulam-se maioritariamente no citoplasma das células. Os RNAs VA1 ligam-se especificamente à proteína cinase dependente de RNA de cadeia dupla PKR, impedindo a sua activação e conseqüente fosforilação do factor de tradução eIF2 $\alpha$ , que resultaria na inibição da síntese proteica e morte celular. Estes RNAs virais possuem aproximadamente 160 nucleótidos e tal como as formas intermediárias dos miRNAs maduros, apresentam uma estrutura secundária em forma de *hairpin*, com cerca de três a oito nucleótidos protuberantes na extremidade 3'.

Tal como a exportina-t, a exportina-5 interage directamente com as moléculas de RNA sem recurso a qualquer proteína adaptadora. Verificou-se ainda, que a interacção da exportina-5 com os pré-microRNAs e os RNAs VA1 requer a presença de uma mini-hélice terminal com pelo menos 18 bp, em que o nucleótido da extremidade 5' se encontra emparelhado e a extremidade 3' possui alguns nucleótidos protuberantes (Gwizdek *et al.*, 2001; 2003; Zeng and Cullen, 2004).

#### **II.1.4.3 EXPORTAÇÃO NUCLEAR DOS PEQUENOS RNAs RICOS EM URIDINA (U snRNAs)**

As vias de exportação nuclear descritas para o tRNA e o miRNA baseiam-se na interacção directa entre receptores de transporte específicos e elementos estruturais presentes nas moléculas de RNA. No entanto, a exportação nuclear da maioria dos RNAs apresenta-se mais complexa, com a intervenção de proteínas adaptadoras que fazem a ligação entre as moléculas de RNA e os receptores de transporte. É o caso da exportação nuclear dos pequenos RNAs nucleares ricos em uridina (U snRNAs).

Os UsnRNAs, com exceção do U6 snRNA, são sintetizados pela RNA polimerase II, na forma de moléculas de RNA precursoras, que se distinguem das formas maduras por possuírem a modificação 7-metilguanósina (m7G; estrutura *cap*) na extremidade 5' e nucleótidos adicionais na extremidade 3' (Kiss, 2004). Estes RNAs são activamente exportados para o citoplasma, onde ocorre a associação das proteínas Sm, a hipermetilação da estrutura *cap* e a remoção dos nucleótidos adicionais da extremidade 3'. Por último, as ribonucleoproteínas UsnRNPs são reimportadas para o núcleo das células, onde sofrem os últimos processos de maturação nos corpos de Cajal.

A estrutura *cap* monometilada (m7GpppN), presente em todos os RNAs transcritos pela RNA polimerase II, desempenha um papel fundamental na exportação nuclear dos UsnRNAs. Apenas os UsnRNAs com uma estrutura *cap* monometilada na extremidade 5' são eficientemente exportados para o citoplasma dos oócitos de *Xenopus*, ficando os UsnRNAs sem esta estrutura retidos no núcleo (Hamm and Mattaj, 1990).

Para além disso, constatou-se que a exportação nuclear dos UsnRNAs pode ser inibida após microinjecção de um análogo da estrutura *cap*, o dinucleótido m7GpppG, sugerindo que a estrutura *cap* constitui o elemento *cis* responsável pela exportação nuclear dos UsnRNAs (Izaurralde *et al.*, 1992; Jarmolowski *et al.*, 1994).

A pesquisa de complexos proteicos de ligação à estrutura *cap* com função na exportação nuclear dos UsnRNAs levou à identificação de um complexo, designado de CBC, formado pelas proteínas CBP80 e CBP20. A função do complexo CBC na exportação nuclear dos UsnRNAs, foi demonstrada com a utilização de um anticorpo específico dirigido contra a proteína CBP20, que impede a interacção do complexo CBC com a estrutura *cap* dos UsnRNAs. Nestas condições, a exportação nuclear dos UsnRNAs em oócitos de *Xenopus* é inibida, comprovando-se que a ligação do complexo CBC à estrutura *cap*, presente na extremidade 5' dos UsnRNAs, é essencial para a exportação dos mesmos (Izaurralde *et al.*, 1995).

Paralelamente, foram surgindo fortes evidências que a via de exportação dos UsnRNAs é mediada pela exportina CRM1. Como suporte desta hipótese, verificou-se que a exportação nuclear dos UsnRNAs é fortemente inibida na presença de leptomicina B (LMB), um antibiótico que causa inactivação da exportina CRM1 por modificação covalente de um resíduo de cisteína da região central da proteína (Fornerod *et al.*, 1997). Foram obtidos resultados semelhantes após saturação das vias de exportação mediadas pela exportina CRM1 com excesso de proteína BSA conjugada com o NES da proteína Rev (Fischer *et al.*, 1995).

Apesar do complexo CBC e da exportina CRM1 serem essenciais para a exportação nuclear dos UsnRNAs, verificou-se que estes elementos não são suficientes para a formação de um complexo de exportação *in vitro* (Ohno *et al.*, 2000). Estes resultados sugerem que a exportação nuclear dos UsnRNAs requer a presença de um factor celular adicional que faz a ligação entre o complexo CBC e a exportina CRM1. Com efeito, a ligação do complexo CRM1/RanGTP ao UsnRNA depende da associação cooperativa da proteína PHAX ao complexo CBC e ao UsnRNA. Para além do domínio de ligação ao RNA e ao complexo CBC, a proteína PHAX possui vários sinais de localização nuclear e um sinal de exportação nuclear (NES) rico em resíduos de leucina, característico das proteínas que utilizam a exportina CRM1 para saírem do núcleo (Segref *et al.*, 2001).

Curiosamente, verificou-se que a ligação do complexo CRM1/RanGTP ao NES da proteína PHAX depende do estado de fosforilação da proteína (Ohno *et al.*, 2000; Segref *et al.*, 2001). Apenas a forma fosforilada da proteína PHAX é capaz de mediar a interacção da exportina CRM1 com os UsnRNAs. Por outro lado, a desfosforilação da proteína PHAX, juntamente com a hidrólise de GTP resulta na dissociação dos complexos de exportação. Após a dissociação dos complexos de exportação, a proteína PHAX livre é reimportada para o núcleo das células utilizando a via de importação mediada pela  $\text{imp-}\alpha/\text{imp-}\beta$ , comum a todas as proteínas contendo NLS clássicos (Segref *et al.*, 2001).

Assim, a direcionalidade da exportação dos UsnRNAs é garantida não só pelo ciclo Ran, como também, por um ciclo de fosforilação/desfosforilação da proteína PHAX.

De um modo análogo à distribuição dos reguladores da GTPase Ran, as proteínas reguladoras do estado de fosforilação da proteína PHAX encontram-se assimetricamente distribuídas entre o núcleo e o citoplasma das células. A proteína responsável pela fosforilação da proteína PHAX, a cinase CDK2, localiza-se predominantemente no núcleo das células, enquanto a fosfatase PP2A, responsável pela desfosforilação da proteína PHAX, distribui-se maioritariamente no citoplasma (Kitao *et al.*, 2008).

#### **II.1.4.4 EXPORTAÇÃO NUCLEAR DO RNA RIBOSSÓMICO (rRNA)**

A biogénese dos ribossomas inicia-se com a transcrição de uma molécula de rRNA precursora, por acção da RNA polimerase I nos nucléolos (Venema and Tollervey, 1999; Fromont-Racine *et al.*, 2003). Concomitantemente com a transcrição, os rRNAs precursores sofrem modificações que consistem, maioritariamente, em reacções de metilação e pseudouridilação catalizadas pelas ribonucleoproteínas nucleolares snoRNPs. Posteriormente, os rRNAs

precursores são clivados dando origem a três dos quatro rRNAs que se encontram nos ribossomas maduros; o rRNA de 20S que irá fazer parte das subunidades ribossômicas de 40S, e os rRNAs de 5.8 e de 25S/28S que juntamente com um rRNA adicional de 5S, sintetizado pela RNA polimerase III, constituem a componente de RNA das subunidades ribossômicas de 60S.

Após a separação do complexo de 90S nas subunidades pré-ribossômicas de 40S e 60S, as duas seguem processos de processamento e maturação quase independentes. No caso das subunidades de 60S, o processamento do rRNA é completado no núcleo e apenas as partículas pré-ribossômicas de 60S contendo rRNA totalmente processado são exportadas para o citoplasma (Nissan *et al.*, 2002). Em oposição, o processamento do rRNA da subunidade de 40S termina no citoplasma das células (Zemp and Kutay, 2007).

As evidências baseadas em resultados de abordagens genéticas e bioquímicas sugerem que as duas subunidades ribossômicas são exportadas do núcleo para o citoplasma como unidades separadas e independentes (Johnson *et al.*, 2002).

Os primeiros trabalhos realizados, com o objectivo de analisar a exportação nuclear das subunidades ribossômicas em oócitos de *Xenopus*, mostraram tratar-se de um mecanismo unidireccional, dependente de energia e saturável, sugerindo o envolvimento de receptores de transporte (Bataillé *et al.*, 1990).

O conhecimento sobre o transporte núcleo-citoplasmático das subunidades pré-ribossômicas sofreu um avanço considerável com o desenvolvimento de sistemas repórteres que codificam proteínas ribossômicas funcionais, fundidas com a proteína GFP. Estas proteínas de fusão, após síntese no citoplasma, são incorporadas nas subunidades ribossômicas em formação, o que permite acompanhar o tráfego intracelular das subunidades ribossômicas por microscopia de fluorescência. Utilizando este tipo de abordagem experimental foi demonstrado que as subunidades ribossômicas são exportadas para o citoplasma através do receptor de transporte CRM1 (Moy and Silver, 2002; Ho *et al.*, 2000; Gadal *et al.*, 2001). Esta dependência foi comprovada, tanto em *S. cerevisiae*, como nos eucariotas superiores. A inactivação da exportina CRM1, por incubação das células com LMB, ou a saturação do receptor, por microinjecção de albumina bovina conjugada com o NES da proteína PKI, causam acumulação das subunidades ribossômicas nos nucléolos e nucleoplasma das células (Trotta *et al.*, 2003; Thomas and Kutay, 2003). Para além disso, verificou-se que a GTPase Ran está envolvida na exportação nuclear das subunidades ribossômicas, dado que alterações no gradiente de RanGTP, causam acumulação das subunidades ribossômicas no núcleo das células (Hurt *et al.*, 1999).

Apesar da falta de evidências directas em eucariotas superiores, a associação da exportina CRM1 com as subunidades pré-ribossómicas de 60S, parece depender da proteína não ribossomal NMD3 (Ho *et al.*, 2000; Gadal *et al.*, 2001; Trotta *et al.*, 2003; Thomas and Kutay, 2003). A proteína NMD3 possui dois NES na sua extremidade carboxílica que são essenciais para a exportação nuclear das subunidades pré-ribossómicas grandes. A expressão de uma forma mutante da proteína NMD3 humana, sem as sequências de aminoácidos reconhecidas pela exportina CRM1, causa inibição da exportação nuclear do RNA ribossomal de 28S, componente das subunidades de 60S (Trotta *et al.*, 2003).

De acordo com o esperado, a distribuição intracelular do rRNA de 18S não é afectada na presença da proteína NMD3 sem os NES, confirmando a hipótese de que a ligação da exportina CRM1 à subunidade ribossomal pequena, não está a cargo da proteína NMD3 (Trotta *et al.*, 2003). A natureza do factor celular responsável pela associação da exportina CRM1 com as subunidades ribossómicas de 40S permanece desconhecida.

Abordagens genéticas realizados em levedura mostraram que a exportina CRM1 não é o único receptor de transporte envolvido no mecanismo de exportação nuclear da subunidade pré-ribossomal grande. As subunidades pré-ribossomais de 60S parecem recrutar vários receptores de transporte diferentes de modo a tornarem a sua exportação mais eficiente (Yao *et al.*, 2007; Hung *et al.*, 2008).

Surpreendentemente, foi demonstrado em levedura, que o heterodímero Mex67/Mtr2, responsável pela exportação nuclear dos mRNAs, parece estar igualmente implicado no transporte nuclear das subunidades pré-ribossómicas de 60S (Yao *et al.*, 2007). A sobre-expressão do complexo Mex67/Mtr2 é capaz de suprimir parcialmente os defeitos na exportação nuclear da subunidade ribossómica grande, em estirpes que produzem uma forma mutante sem NES da proteína NDM3 (Yao *et al.*, 2007).

A exportação nuclear das subunidades de 60S parece, ainda, depender da proteína Arx1 (Hung *et al.*, 2008). Na ausência da proteína Arx1, as subunidades pré-ribossómicas de 60S associadas com os complexos proteicos NMD3/CRM1 e Mex67/Mtr2 acumulam-se no núcleo das células, indicando que esta proteína é necessária para a exportação nuclear dos complexos de 60S.

Contrariando as previsões de que as duas subunidades ribossómicas são exportadas para o citoplasma por vias independentes, foi identificada uma proteína comum às duas subunidades com papel no transporte nuclear. A proteína Rrp12p associa-se a ambas as subunidades pré-ribossómicas no núcleo, acompanhando-as até ao citoplasma (Oeffinger *et al.*, 2004). A depleção desta proteína resulta na inibição da exportação nuclear das subunidades pré-

ribossômicas. Tal como as carioferinas- $\beta$ , a proteína Rrp12p apresenta um elevado conteúdo em  $\alpha$ -hélices anti-paralelas designadas de repetições HEAT, capaz de estabelecer *in vitro* uma ligação estável com a GTPase Ran e com os domínios FG das nucleoporinas (Oeffinger *et al.*, 2004). Em suma, foi identificada uma proteína que tem características comuns com os receptores de transporte pertencentes à família das carioferinas- $\beta$  e que está envolvida no mecanismo de exportação nuclear das duas subunidades ribossômicas.

## II.1.5 EXPORTAÇÃO NUCLEAR DE RNAs CODIFICANTES

### II.1.5.1 EXPORTAÇÃO NUCLEAR DO RNA MENSAGEIRO (mRNA)

A exportação nuclear do mRNA constitui a mais complexa e menos compreendida via de transporte através do invólucro nuclear.

Enquanto a maioria dos receptores de transporte são membros de uma família conservada de proteínas vulgarmente designadas de carioferinas- $\beta$ , a exportação nuclear do RNA mensageiro é levada a cabo por membros da família NXF, de que a proteína TAP faz parte (Izaurralde, 2002).

A proteína TAP foi, inicialmente, identificada como o factor celular responsável pela exportação nuclear dos mRNAs do retrovírus símio tipo D, que não sofrem *splicing* (Gruter *et al.*, 1998). Estes RNAs virais possuem na região 3' não codificante (3' UTR) uma sequência, com cerca de 173 nucleótidos, que forma uma estrutura de grampo, designada de elemento de transporte constitutivo (CTE), essencial para o seu transporte para o citoplasma.

A exportação nuclear destes RNAs depende da ligação da proteína TAP ao CTE através de um novo domínio de ligação ao RNA e quatro motivos ricos em resíduos de leucina (LRR), localizados na extremidade N-terminal da proteína (Braun *et al.*, 1999). Em oócitos de *Xenopus*, o domínio de ligação ao RNA e o domínio LRR da proteína TAP são necessários e suficientes para promover a exportação nuclear de um intrão fundido com o CTE (Braun *et al.*, 1999).

Contrastando com estes resultados, verificou-se que o domínio de ligação ao RNA da proteína TAP não é suficiente para promover a exportação nuclear de um RNA sintético, que consiste na sequência do RNA U6 fundido com o CTE (Bachi *et al.*, 2000). Neste caso, mostrou-se que, também, a extremidade carboxílica da proteína TAP, que estabelece ligação com os domínios FG das nucleoporinas, é necessária para promover a exportação nuclear destes RNAs.

A proteína TAP, para além do domínio de ligação directa com as nucleoporinas (domínio UBA), possui um domínio, na extremidade C-terminal, implicado na formação de heterodímeros entre a proteína TAP e a proteína p15. Este domínio, designado de NTF2, associado à proteína p15, constitui o segundo local de ligação da proteína TAP às nucleoporinas (Fribourg *et al.*, 2001).

A interacção da proteína p15 com a TAP parece exercer um papel importante na exportação nuclear dos mRNAs. Apesar da sobre-expressão da proteína TAP promover a exportação nuclear de mRNAs, que normalmente ficam retidos no núcleo das células, a quantidade de mRNA exportada é pouco significativa, quando comparada com o aumento induzido pela co-expressão das proteínas TAP e p15 (Braun *et al.*, 2001; Guzik *et al.*, 2001). Adicionalmente, demonstrou-se que a formação de heterodímeros entre a proteína TAP e a proteína p15 é condição necessária para a exportação de mRNAs com intrões. Apenas as formas mutantes da proteína TAP que retêm a capacidade de interagir com a proteína p15 são capazes de promover a exportação nuclear de mRNAs contendo intrões.

O papel da proteína p15 na exportação nuclear de mRNAs foi ainda evidenciado em *C. elegans* e em *Drosophila melanogaster*. A inibição da expressão da proteína p15, nestes animais, resulta na acumulação dos mRNAs celulares no núcleo das células (Wiegand *et al.*, 2002).

Para além disso, foi demonstrado que o heterodímero TAP/p15 é capaz de substituir funcionalmente o complexo Mex67/Mtr2 em *S. cerevisiae*. Apesar da proteína Mtr2 não apresentar homologia com a proteína p15, as evidências sugerem que as duas proteínas desempenham funções análogas na exportação nuclear dos mRNAs. Abordagens genéticas e bioquímicas mostraram que a interacção entre a proteína Mex67p, proteína homóloga da TAP em levedura, e os componentes do NPC requer a presença da proteína Mtr2p. Mutações que impeçam a interacção da proteína Mex67p à Mtr2p inibem a exportação nuclear do mRNA (Santos-Rosa *et al.*, 1998).

Os mecanismos através dos quais a proteína TAP promove a exportação nuclear dos mRNAs celulares não estão, ainda, completamente esclarecidos. Contudo, os dados existentes indicam que os mecanismos envolvidos na exportação nuclear dos mRNAs celulares são diferentes dos utilizados pelos RNAs virais, que possuem elementos de transporte como a sequência CTE. Para além dos mRNAs celulares não possuírem, geralmente, sequências semelhantes ao CTE, verificou-se que *in vitro*, a proteína TAP tem cerca de três vezes mais afinidade de ligação pela sequência de RNA que forma o CTE do que para a sequência do mRNA que codifica para a proteína DHFR (Braun *et al.*, 1999). Em oócitos de *Xenopus*, o elemento constitutivo de

transporte (CTE) dos retrovírus símio MPMV e SRV-1 é capaz de competir com a exportação nuclear dos mRNAs celulares (Pasquinelli *et al.*, 1997; Saavedra *et al.*, 1997; Gruter *et al.*, 1998). Contrastando com estes resultados, constatou-se que os mRNAs celulares não funcionam como competidores na exportação nuclear de RNAs contendo o CTE, o que sugere que o mecanismo de interacção da proteína TAP com os mRNAs celulares é distinto do utilizado para a exportação de RNAs virais (Pasquinelli *et al.*, 1997).

Nos eucariotas superiores, a maioria dos transcritos primários de mRNA contém intrões que são removidos pelo spliceossoma antes dos mRNAs serem exportados para o citoplasma. Ensaios de microinjecção em oócitos de *Xenopus* mostraram que os mRNAs sujeitos a *splicing* são exportados para o citoplasma de forma mais eficiente do que os mRNAs sintetizados a partir de cDNAs desprovidos de intrões (Luo and Reed, 1999). Os mRNAs resultantes da reacção de *splicing* encontram-se associadas a complexos proteicos, cuja composição é distinta e mais complexa do que as partículas ribonucleoproteicas formadas com mRNAs sem intrões (Luo and Reed, 1999). Estes resultados sugerem que o mecanismo de *splicing* estimula a exportação nuclear do mRNA, através do recrutamento de factores de exportação, que se ligam aos mRNAs por interacção com os componentes do spliceossoma. De acordo com esta hipótese, foi demonstrado que uma RNA helicase da família DEAD box, a proteína UAP56, implicada no processo de remoção de intrões, exerce igualmente um papel essencial na exportação nuclear do mRNA (Luo *et al.*, 2001). Esta proteína é responsável pelo recrutamento da proteína REF/Aly, previamente identificada em levedura como um factor proteico que interage directamente com a proteína TAP (Stutz *et al.*, 2000; Straber and Hurt, 2000).

Nas leveduras, as proteínas homólogas da UAP56 e da REF/Aly, a Sub2 e a Yra1, respectivamente, encontram-se associadas a um complexo tetramérico envolvido no alongamento da transcrição (Straber *et al.*, 2002). As quatro subunidades do complexo THO (Tho2, Hpr1, Mft1 e Th2p) interagem genética e fisicamente com as proteínas Yra1 e Sub2, e apesar de não serem essenciais para a viabilidade celular, mutações condicionais nos genes do complexo THO causam acumulação do mRNA no núcleo das células a temperaturas restritivas (Straber *et al.*, 2002). Devido ao papel duplo destas proteínas, na transcrição e na exportação nuclear do mRNA, atribuiu-se a designação de TREX (transcrição e exportação) ao complexo formado pelo complexo proteico THO, associado a factores de exportação nuclear. O facto das proteínas Yra1 e Sub2 fazerem parte de um complexo proteico envolvido no alongamento da transcrição do mRNA sugere que a associação dos factores de exportação ocorre co-transcricionalmente (Straber *et al.*, 2002). Com efeito, os ensaios de imunoprecipitação de cromatina mostraram que as proteínas Yra1 e Sub2, tal como as subunidades proteicas do

complexo THO, associam-se com os genes durante a fase de alongamento da transcrição, sendo o componente Hpr1 do complexo THO necessário para o recrutamento das proteínas Yra1 e Sub2 (Zenklusen *et al.*, 2002; Abruzzi *et al.*, 2004). A associação co-transcricional das proteínas Sub2 e Yra1 com o mRNA permite explicar como é que, mRNAs codificados por genes sem intrões são reconhecidos pelo heterodímero TAP/p15.

A caracterização detalhada do complexo TREX humano mostrou que este é igualmente constituído pelas proteínas REF/Aly, UAP56 e pelo complexo THO (Masuda *et al.*, 2005). O complexo TREX humano apresenta um padrão de distribuição semelhante ao exibido pelos factores de *splicing*. A co-localização do complexo TREX humano com componentes do spliceossoma sugere, que o complexo TREX humano não é recrutado co-transcionalmente, sendo depositado nas cadeias de mRNA de um modo dependente do *splicing* (Masuda *et al.*, 2005). Consistente com esta visão, verificou-se que o complexo TREX associa-se somente com o mRNA após a excisão dos intrões. A exclusão do complexo TREX das moléculas de pré-mRNA com intrões é consistente com as observações anteriores de Zhou *et al.* (2000) de que a proteína REF/Aly, é um componente abundante das mRNPs originadas por *splicing* mas que está ausente das mRNPs com transcritos de mRNA sem intrões (Masuda *et al.*, 2005).

Para além de se encontrarem associadas com o complexo THO, as proteínas UAP56 e REF/Aly foram, igualmente, identificadas como componentes de um complexo proteico que é depositado cerca de 19 a 33 nucleótidos a montante do local de junção entre dois exões, o *exon junction complex* ou EJC, salientando, mais uma vez, o papel do *splicing* no recrutamento dos factores de exportação (Le Hir *et al.*, 2001). Porém, dados mais recentes mostraram que os complexos TREX e EJC ligam-se a regiões diferentes das moléculas de mRNA (Cheng *et al.*, 2006; Nojima *et al.*, 2007). O complexo TREX associa-se entre a extremidade 5' do mRNA e o local de ligação do complexo EJC, sugerindo que o complexo TREX não é componente do complexo EJC e que a estrutura *cap*, presente na extremidade 5' de todos os mRNAs, encontra-se envolvida no recrutamento do complexo TREX. Ensaio de imunoprecipitação e de interacção *in vitro*, mostraram que o complexo TREX interage com o complexo proteico de ligação à estrutura *cap* (CBC) formado pelas proteínas CBP20 e CBP80, ocorrendo esta associação via interacção directa entre a proteína CBP80 do complexo CBC e a proteína REF/Aly do complexo TREX (Cheng *et al.*, 2006). O papel da estrutura *cap* na associação do complexo TREX, foi ainda, evidenciado por comparação do perfil proteico associado com transcritos de mRNA, com ou sem estrutura *cap*. Apenas, os mRNAs com uma estrutura *cap* são eficientemente imunoprecipitados com anticorpos contra as proteínas CBC80, REF/Aly e componentes do complexo THO. Porém, verificou-se que a ligação do complexo TREX à

estrutura cap é dependente da reacção de *splicing*, dado que os componentes do complexo TREX ligam-se aos mRNAs somente após a remoção dos intrões (Cheng *et al.*, 2006).

Apesar, do *splicing* e a exportação nuclear do mRNA se encontrarem intimamente ligados, sabe-se que o *splicing* não é um pré-requisito para o recrutamento de factores de exportação nuclear. A existência de genes sem intrões, tais como os genes das histonas, pressupõe a presença de vias alternativas para o recrutamento de factores de exportação nuclear de um modo independente do *splicing*.

No caso específico dos mRNAs das histonas sintetizadas durante a fase S do ciclo celular, foi identificada uma sequência com cerca de 100 nucleótidos, na região codificante do mRNA, suficiente para activar a exportação nuclear de mRNAs que são ineficientemente exportados para o citoplasma (Huang and Carmichael, 1997). Este elemento de transporte é reconhecido pelas proteínas SR, a 9G8 e a SRp20, que são necessárias para a exportação nuclear destes mRNAs (Huang and Steitz, 2001). A proteína 9G8, à semelhança da REF/Aly, liga-se directamente à região N-terminal da proteína TAP, e a injeção de uma forma mutante da proteína 9G8, defectiva na interacção com a proteína TAP, resulta na inibição da exportação nuclear dos mRNAs das histonas, em oócitos de *Xenopus* (Huang *et al.*, 2003). De modo semelhante, a microinjeção de anticorpos específicos contra a proteína 9G8 inibe severamente a exportação nuclear destes mRNAs (Masuyama *et al.*, 2004a), enquanto que, a adição exógena da proteína TAP estimula a saída dos mRNAs das histonas do núcleo (Huang *et al.*, 2003). Estes resultados sugerem que, a proteína 9G8 recruta activamente a proteína TAP, funcionando como um adaptador alternativo na exportação dos mRNAs.

Erkman *et al.* (2005) demonstraram, por RNAi, que a TAP é o receptor de transporte envolvido na exportação nuclear dos mRNAs das histonas. No entanto, em contraste com os resultados anteriores, este grupo de investigadores, mostrou que a exportação nuclear dos mRNAs das histonas é independente do elemento de transporte e da ligação da proteína 9G8. Curiosamente, verificou-se que o comprimento das moléculas de mRNA é um factor determinante na exportação nuclear dos mRNAs das histonas, sendo os mRNAs de tamanhos inferiores piores substratos para a exportação nuclear (Erkman *et al.*, 2005). Masuyama *et al.* (2004b) mostraram que a redução da dimensão de um mRNA sem intrões abaixo dos 200 nucleótidos, inibe a sua associação com os factores de exportação nuclear específicos dos mRNAs. Surpreendentemente, estes mRNAs de tamanhos reduzidos encontram-se associados com a proteína PHAX, adaptador proteico que medeia a ligação da exportina CRM1 aos snRNAs. Em contrapartida, a introdução de um RNA com cerca de 300 nucleótidos na sequência de um snRNA resulta na associação destes RNAs híbridos com a proteína REF/Aly e

na sua exportação pela TAP (Ohno *et al.*, 2002; Masuyama *et al.*, 2004b). Estas observações sugerem que, a presença de uma sequência inespecífica de RNA com mais de 250 nucleótidos é suficiente para definir a identidade de um mRNA e destiná-lo à exportação pela proteína TAP. Adicionalmente, estes resultados prevêm a existência de um mecanismo de recrutamento da proteína REF/Aly independente do *splicing*, contestando as previsões iniciais de Zhou *et al.* (2000) que não observaram interacção da proteína REF/Aly com mRNAs desprovidos de intrões.

Dados recentes mostraram que, a interacção da proteína REF/Aly com os mRNAs sem intrões é estimulada na presença da proteína UAP56 ligada a ATP (Taniguchi and Ohno, 2007). Apesar da hidrólise de ATP não ser necessária para o recrutamento da proteína REF/Aly, a ligação simultânea da proteína UAP56 aos mRNAs e à proteína REF/Aly activa a sua actividade intrínseca de ATPase. Como a proteína UAP56 ligada a ADP não apresenta afinidade de ligação pelos mRNAs, pensa-se que a hidrólise de ATP contribua para a dissociação da proteína UAP56, permitindo a ligação do complexo TAP/p15 aos mRNAs (Taniguchi and Ohno, 2007).

Em suma, as proteínas REF/Aly, UAP56 e o complexo heterodimérico formado pelas proteínas TAP e p15 parecem desempenhar um papel essencial, tanto na exportação nuclear dos mRNAs celulares processados pelo spliceossoma, como na exportação dos mRNAs transcritos a partir de moldes de DNA sem intrões. O facto, das proteínas UAP56 e TAP serem essenciais para a exportação e para a viabilidade celular em *S. cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *C. elegans*, reforça, ainda mais, a função destas proteínas na exportação nuclear do mRNA (Gatfield *et al.*, 2001, 2003; Tan *et al.*, 2000; Herold *et al.*, 2001). Nos humanos, a inibição da expressão da proteína UAP56 não apresenta efeitos na proliferação celular, bem como na distribuição do RNA poliadenilado (Kapadia *et al.*, 2006). No entanto, a inibição simultânea da proteína UAP56 e da RNA helicase URH49, proteína com 90% de homologia com a UAP56, resulta na redução da viabilidade celular e na acumulação do mRNA no núcleo das células. Ao contrário da proteína UAP56, a proteína REF/Aly e os restantes componentes do complexo EJC são dispensáveis para a exportação da maioria dos mRNAs celulares em *Drosophila*, o que indica a existência de adaptadores proteicos adicionais, além da REF/Aly, que intervêm na ligação da TAP aos mRNAs (Gatfield and Izaurralde, 2002).

Apesar da proteína TAP ser o principal factor celular responsável pela exportação dos mRNAs, existem evidências que apontam para a participação do receptor de transporte CRM1 na exportação nuclear de alguns mRNAs. Os mRNAs dos retrovírus complexos contendo intrões são exemplo de uma população de mRNAs virais que utiliza a via de exportação mediada pela

exportina CRM1 para chegar ao citoplasma (Cullen, 2003). A associação da exportina CRM1 com os mRNAs contendo intrões do HIV-1 é mediada pela proteína viral Rev que reconhece uma sequência designada por RRE (Rev-response element) presente em todos os mRNAs com intrões codificados pelo vírus (Fornerod *et al.*, 1997). O sinal de exportação nuclear (NES) da proteína Rev foi o primeiro sinal de exportação a ser identificado, sendo constituído por uma sequência de dez aminoácidos rica em resíduos de leucina (Pollard and Malim, 1998). Tal como a maioria dos sinais de localização nuclear, o NES da proteína Rev é capaz de promover a exportação nuclear de proteínas repórter (Fischer *et al.*, 1995). Para além disso, verificou-se que o NES da proteína Rev é capaz de inibir a exportação nuclear dos RNAs celulares que são selectivamente exportados pela exportina CRM1, tais como os snRNAs (Fischer *et al.*, 1995).

Em *C. elegans*, o mRNA que codifica para a proteína transmembranar TRA2 (mRNA TRA2) é selectivamente exportado para o citoplasma, por um mecanismo que envolve o factor de transcrição TRA1 e a exportina CRM1 (Kuersten *et al.*, 2004). A exportação destes mRNAs requer a ligação do factor de transcrição TRA1 a um elemento de RNA situado na região 3' UTR do mRNA TRA2, chamado de TRE, que na ausência da proteína TRA1 funciona como um sinal de retenção nuclear.

O modelo proposto para explicar a exclusão destes mRNAs da via de exportação mediada pela proteína TAP inclui a interacção de duas proteínas homólogas da proteína REF/Aly humana e a ligação da proteína NXF2 ao elemento TRE. As proteínas NXF-2 e TAP pertencem à mesma família de proteínas, porém a proteína NXF2 não possui o domínio UBA essencial para a interacção com as nucleoporinas FG do NPC. A redução da expressão destas proteínas por RNAi tem um efeito semelhante à remoção do elemento TRE na exportação nuclear do mRNA TRA2. Nestas condições, a exportação nuclear do mRNA TRA2 deixa de ser dependente da exportina CRM1, passando a ser mediada pela proteína TAP. Estes resultados, mostram que proteínas normalmente envolvidas na exportação nuclear do mRNA podem estar, também, implicadas em mecanismos de retenção nuclear do RNA (McKee and Silver, 2004).

## II.2 OBJECTIVOS

---

O trabalho descrito neste capítulo teve os seguintes objectivos:

- (1) Investigar e identificar os elementos *cis* responsáveis pela exportação nuclear dos RNAs genómico e antigenómico do HDV.
- (2) Investigar possíveis vias de exportação nuclear do RNA do HDV.



## II.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### II.3.1 CONSTRUÇÃO DE MUTANTES DE DELEÇÃO DO cDNA DO HDV

Para construção de uma série de mutantes com dimensões progressivamente menores do cDNA do HDV utilizou-se um kit comercial, *Erase-a-Base System* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Este sistema, que se baseia na estratégia desenvolvida por Henikoff (1984), utiliza a exonuclease III (Exo III) para digerir unidireccionalmente sequências de DNA de cadeia dupla. A Exo III cataliza a remoção sequencial de nucleótidos a partir das extremidades 3'-OH recessivas ou cegas das moléculas de DNA de cadeia dupla. Por outro lado, as extremidades 3'-OH com 4 nucleótidos protuberantes são resistentes à digestão pela Exo III. Dadas as propriedades catalíticas da Exo III, o sentido da digestão é, facilmente, controlado por dupla hidrólise enzimática do DNA de interesse com endonucleases de restrição, em que uma das enzimas gera uma extremidade 3'-OH recessiva ou cega, susceptível à digestão pela Exo III, e a outra origina uma extremidade 3'-OH protuberante, resistente à acção da Exo III.

Para além de ser possível controlar o sentido da digestão, a actividade de exonuclease 3'→5' da Exo III é constante e dependente da temperatura, sendo a taxa de remoção de nucleótidos tanto maior, quanto maior for a temperatura da reacção.

A digestão unidireccional do cDNA do HDV foi efectuada a 25°C, prevendo-se para esta temperatura uma taxa de digestão de 90 a 100 nucleótidos por minuto.

O DNA molde utilizado na construção dos mutantes de deleção do cDNA do HDV foi o do plasmídeo pDL542. Este plasmídeo contém uma cópia completa do cDNA do HDV acrescida de uma repetição de 161 bp, clonada no vector de expressão eucariota pSVL (Figura II.3.1; Lazinski and Taylor, 1994). Na sequência do cDNA do HDV foi efectuada uma deleção de 2 bp que interrompe a grelha aberta de leitura do S-HDAg. Como resultado, após transfecção de células eucariotas com o plasmídeo pDL542, são produzidas moléculas de RNA genómico do HDV, sob controlo do promotor tardio do vírus SV40, incapazes de se replicar (Lazinski and Taylor, 1994).

Para a construção dos mutantes de deleção do cDNA do HDV, começou-se por digerir 10 µg de DNA plasmídico, com as enzimas de restrição *BoxI* e *SacI* (Fermentas). A endonuclease *SacI*

reconhece, somente, um local de restrição no plasmídeo pDL542 (5'-GAGCT↓C-3'), na posição 1938, a dois bp a montante do local de início da sequência do cDNA do HDV. Esta enzima de restrição gera extremidades 3'-OH com 4 nucleótidos protuberantes resistentes à acção da Exo III. A enzima de restrição *BoxI* cliva o plasmídeo pDL542 na posição 2159, a 219 bp a jusante do local, onde se inicia a sequência do cDNA do HDV. Ao contrário da endonuclease *SacI*, a *BoxI*, cuja sequência de reconhecimento é 5'-GACNN↓NNGTC-3' (N representa qualquer um dos 4 nucleótidos), origina extremidades cegas que são susceptíveis à digestão unidireccional pela Exo III.

Da digestão dupla do plasmídeo pDL542 com as enzimas *SacI* e *BoxI* foram obtidos dois fragmentos, um com 6029 e outro com 221 bp. Os fragmentos de restrição foram separados por electroforese em gel de agarose *low melting point* 2% e a banda de maior dimensão foi removida do gel. A extracção do DNA foi efectuada pelo método fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, seguida da precipitação do DNA com etanol (Sambrook *et al.*, 1989).

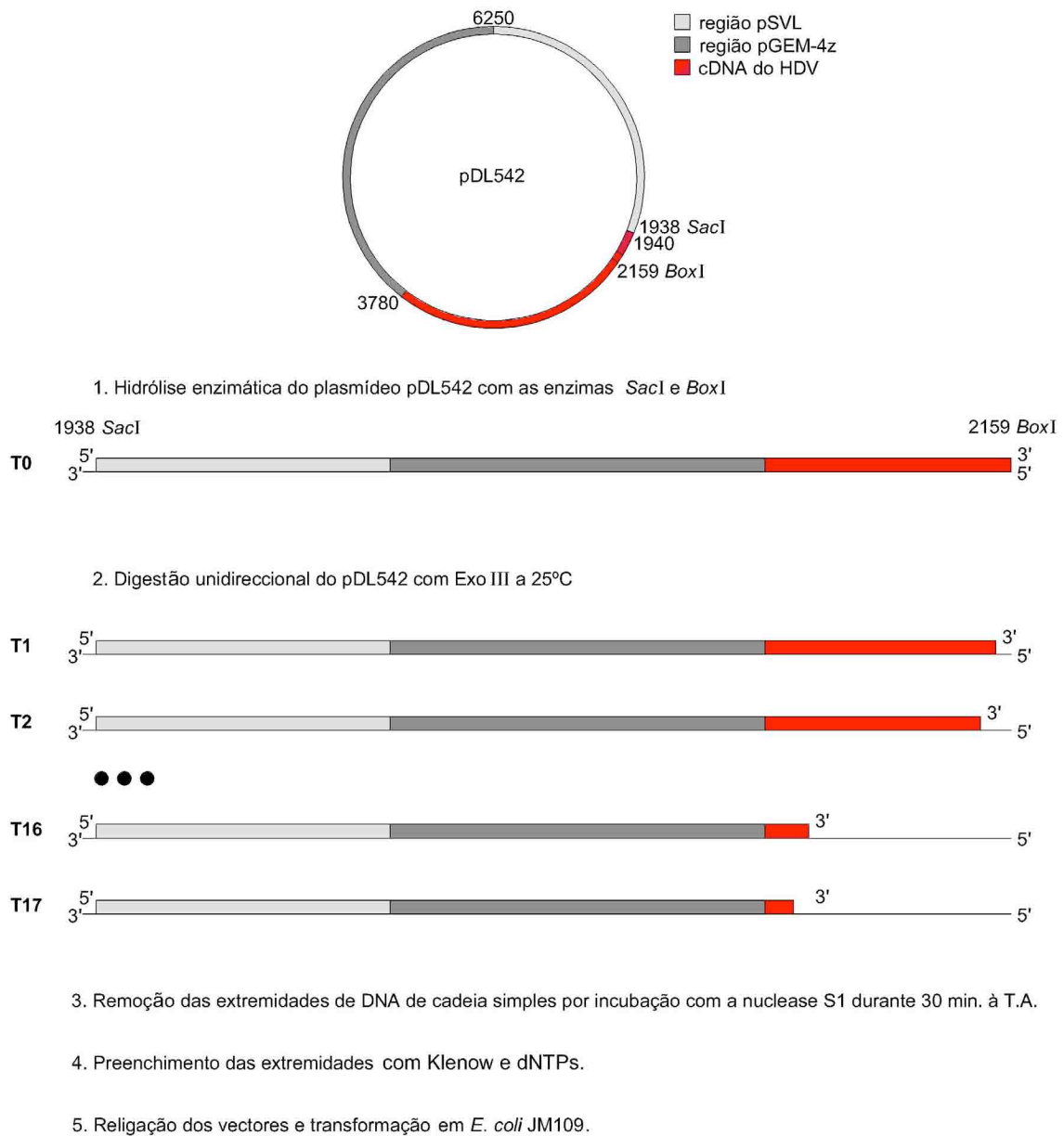
Após precipitação, o sedimento de DNA foi ressuspensão em 10 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA). Ao DNA dissolvido foi adicionado tampão da Exo III (66 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.66 mM MgCl<sub>2</sub>), até um volume final de 60 µl e 400 U de Exo III. Esta mistura foi, então, incubada a 25°C, tendo-se procedido à recolha, minuto a minuto, de 2.5 µl da reacção (cerca de 200 ng de DNA) para 17 tubos contendo 7.5 µl de uma mistura com nuclease S1. Finalizadas as digestões unidireccionais com a Exo III, os 17 tubos com fragmentos do plasmídeo pDL542, com tamanhos progressivamente menores, foram transferidos do gelo para a temperatura ambiente, para permitir a digestão das caudas de DNA de cadeia simples resultantes da digestão com Exo III, por acção da nuclease S1. Após 30 minutos de incubação, procedeu-se à inactivação da nuclease S1, por aquecimento a 70°C durante 10 min.

Posteriormente, os DNAs foram precipitados com 0.3 volumes de acetato de amónia 7.5M e dois volumes de etanol absoluto. Depois de secos, os sedimentos de DNA foram ressuspensos em 9 µl de tampão TE e incubados com 0.1U de fragmento Klenow da DNA polimerase I e 0.05 mM de dNTPs. Finalmente, após o preenchimento das extremidades das moléculas de DNA, adicionou-se 40 µl de uma mistura contendo 0.2 U de T4 DNA ligase. Uma hora depois, as misturas de ligação, contendo os mutantes de deleção do cDNA do HDV recircularizados, foram utilizadas para transformar bactérias competentes *E. coli* JM109.

A selecção de plasmídeos, com o tamanho esperado para cada tempo de digestão com a Exo III, foi efectuada por restrição enzimática com a endonuclease *HindIII* (Fermentas), seguida da análise por electroforese em gel de agarose. Os vectores em que o cDNA do HDV apresenta

dimensões próximas das previsões teóricas foram sequenciados recorrendo, para isso, aos serviços de sequenciação da empresa STAB VIDA.

Resolvidas as sequências, estas foram alinhadas, utilizando-se ferramentas informáticas apropriadas como o MultAlin (multiple sequence alignment; Corpet, 1988). Do alinhamento das sequências foi possível determinar a extensão da deleção do cDNA do HDV como resultado da digestão com a Exo III. Na figura II.3.1.1 apresenta-se o esquema geral utilizado na construção dos mutantes de deleção do cDNA do HDV, acima descrito.



**Figura II.3.1.1.** Representação esquemática do plasmídeo pDL542 e da estratégia baseada na utilização da Exo III para construção de mutantes de deleção do cDNA do HDV.

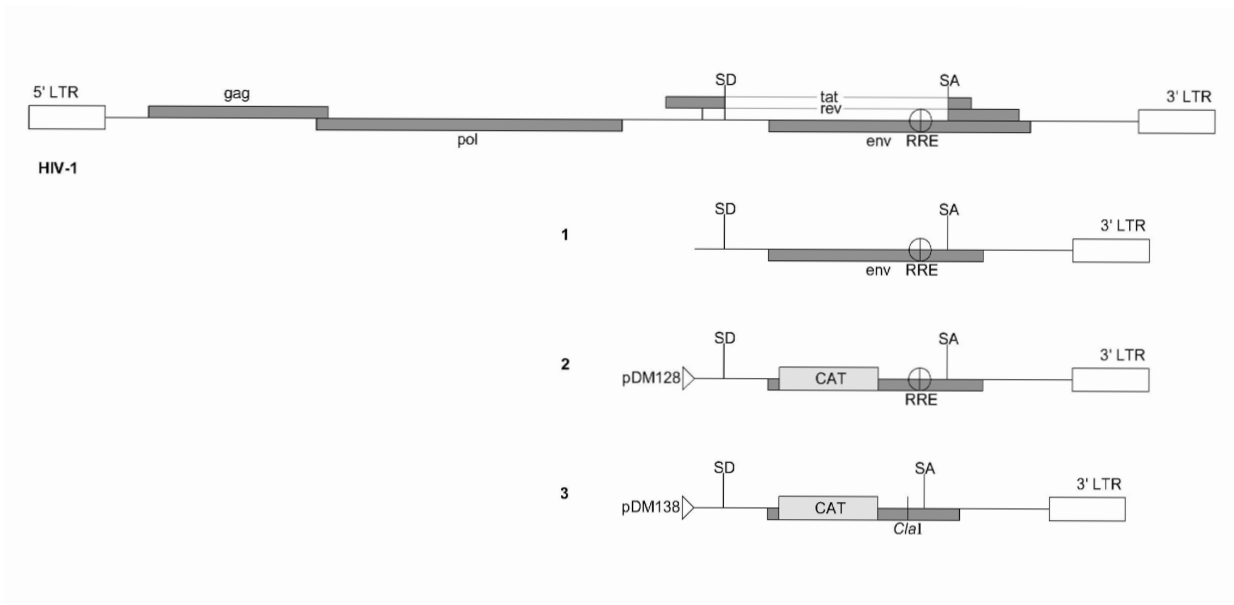
## **II.3.2 VECTORES**

### **II.3.2.1 CLONAGEM DE FRAGMENTOS DE cDNA DO HDV NO VECTOR REPÓRTER pDM138**

#### **II.3.2.1.1 VECTOR REPÓRTER pDM138**

De modo a identificar possíveis elementos *cis*, de exportação nuclear presentes no RNA do HDV recorreu-se ao vector repórter pDM138, gentilmente cedido por Tristram G. Parslow (Emory University School of Medicine, Atlanta, USA). Este vector repórter, tal como, o vector que lhe deu origem, o pDM128, contém a sequência que codifica para a segunda metade do genoma do vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1), sob controlo do promotor do vírus símio 40 (SV40; Hope *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1991). Na construção dos vectores pDM128 e pDM138 foram efectuadas várias modificações na sequência original do cDNA do HIV-1. Nomeadamente, foram removidos os fragmentos compreendidas entre os nucleótidos 640 e 5863 e 8400 e 8915 do genoma do HIV-1. Os codões de iniciação das ORFs das proteínas Rev e Env foram substituídos por locais de corte únicos das enzimas de restrição *BclI* e *NotI*. A sequência compreendida entre os locais *NotI* e *DraIII* foi substituída por uma sequência com

780 bp que codifica para uma proteína de origem bacteriana, a acetiltransferase do cloranfenicol (CAT). No caso específico do vector pDM138, a sequência com cerca de 1.2 kb que contém o RRE do HIV-1, situada entre os locais de corte das enzimas de restrição *StuI* e *BsmI* foi substituída por um *linker* que contém a sequência de reconhecimento da enzima *ClaI*. Após transfecção com o vector pDM138 são produzidos mRNAs com a ORF da proteína CAT, inserida na região intrónica da sequência do HIV-1 que codifica para as proteínas do envelope viral. Na figura II.3.1.2 apresenta-se um esquema geral do vector repórter pDM138 e da sua construção.

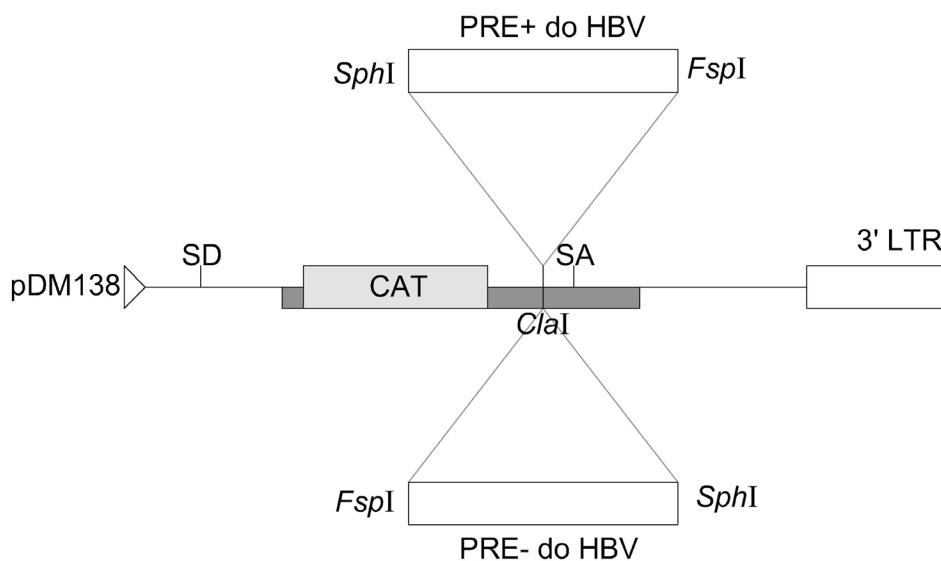


**Figura II.3.1.2.** Representação esquemática dos vetores repórter pDM128 e pDM138 (Hope *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1991). 1- A segunda metade do genoma do vírus HIV-1, com as alterações referidas no texto, foi introduzida no plasmídeo comercial pUC18. 2- Parte da ORF da proteína env, situada numa região intrónica, foi removida e substituída pela sequência que codifica para a proteína CAT, originando o vector repórter pDM128. 3- A sequência que contém o RRE do HIV-1 foi removida e substituída por um adaptador que apresenta a sequência de reconhecimento e clivagem da enzima de restrição *ClaI*, dando origem ao vector pDM138, utilizado neste trabalho. A posição do intrão do HIV-1 com a ORF da proteína repórter encontra-se assinalado pelas siglas *SD* e *SA*, que correspondem aos locais de splicing 5' e 3', respectivamente.

### II.3.2.1.2 VECTORES REPÓRTER pDM138-PRE(+) E pDM138-PRE(-)

Como controlo positivo e negativo do sistema repórter pDM138 utilizaram-se os vetores pDM138-PRE(+) e pDM138-PRE(-), gentilmente cedidos por Benedict Yen (University of California, San Francisco, USA), que contém um fragmento de DNA de aproximadamente 570

bp que codifica para o elemento regulador pós-transcricional do vírus da hepatite B (PRE, *post-transcriptional regulatory element*; HBV; Huang and Yen, 1995). A sequência de DNA que codifica o PRE do HBV foi isolada por digestão dupla com as enzimas de restrição *SphI* e *FspI* de um plasmídeo que contém o cDNA que codifica para os HBsAg (Zhou and Yen, 1991). O cDNA do PRE do HBV foi, tal como representado na figura II.3.1.3, inserido na orientação *sense* e *antisense* no único local de restrição *ClaI* presente no pDM138, originando os vectores pDM138-PRE(+) e pDM138-PRE(-), respectivamente (Huang and Yen, 1995).



**Figura II.3.1.3.** Representação esquemática dos vetores pDM138-PRE(+) e pDM138-PRE(-) (Huang and Yen, 1995). O vector pDM138 foi digerido com a enzima de restrição *ClaI* e ligado com um fragmento de DNA de 570 bp, que codifica para o PRE do HBV. O vector pDM138-PRE(+) contém o PRE do HBV na mesma orientação da ORF da proteína CAT, enquanto que o vector pDM138-PRE(-) possui o PRE do HBV na orientação inversa.

### II.3.2.1.3 CLONAGEM DO CDNA DO HDV NO VECTOR REPÓRTER pDM138

Para a clonagem dos vários fragmentos de cDNA do HDV, começou-se por digerir o vector pDM138 com a enzima de restrição *Bsu15I* (*ClaI*; Fermentas).

Dado que, a actividade da enzima de restrição *ClaI* é susceptível de ser bloqueada, no caso da adenina no interior da sua sequência de reconhecimento (5'-AT↓CGAT-3') se encontrar metilada pela metilase de adenina de DNA (Dam), o vector foi amplificado numa estirpe de *E. coli* deficiente nas enzimas Dam e metilase de citosina de DNA (Dcm; *E. coli* INV110; Invitrogen).

A extracção e purificação do DNA plasmídico foi efectuada a partir de 5 ml de cultura saturada, resultante do crescimento de uma colónia isolada de *E. coli* transformada em meio LB com 50 µg/ml ampicilina, com o kit comercial QIAprep Spin Miniprep (Qiagen).

Após 16 horas de incubação, a 37°C com a enzima *Clal*, procedeu-se à desfosforilação das extremidades do vector com 2U de fosfatase alcalina de camarão (Shrimp Alkaline Phosphatase; Fermentas). A remoção dos grupos fostato das extremidades do vector, originados pela hidrólise enzimática, teve como objectivo evitar a re-circularização do pDM138 sem os fragmentos de cDNA do HDV. As reacções de desfosforilação decorreram a 37°C durante uma 1 hora no mesmo tampão de reacção utilizado para digestão do vector pDM138 com a enzima *Clal*. Após inactivação das duas enzimas, por aquecimento a 65°C durante 10 min., o vector foi purificado utilizando o kit GFX PCR DNA (GE Healthcare).

Os fragmentos de cDNA do HDV inseridos no vector pDM138 foram amplificados por PCR e clonados no único local *Clal* do pDM138. Inicialmente, foram amplificadas 18 sequências de cDNA do HDV, em que a maior corresponde à cópia completa do cDNA do vírus e as restantes correspondem a 17 fragmentos com dimensões progressivamente menores do cDNA do HDV. Como molde para as reacções de PCR utilizaram-se o plasmídeo pDL542 e os 17 mutantes de deleção do cDNA do HDV, construídos por digestão unidireccional do plasmídeo pDL542 com a Exo III, tal como descrito no ponto II.3.1 dos materiais e métodos deste capítulo.

As reacções de PCR foram realizadas num volume de 100 µl, contendo 10 a 50 ng de DNA molde, tampão de PCR (75 mM Tris-HCl, pH 8.8 a 25°C, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% Tween 20), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP, 0.5 µmol/µl de cada primer e 2.5 U polimerase de DNA *Taq* (Fermentas). As amostras, após a desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos foram sujeitas a 25 ciclos de amplificação no termociclador Mastercycler personal (Eppendorf). Cada um destes ciclos é constituído por três etapas: etapa de desnaturação a 94°C, durante 30 segundos, etapa de emparelhamento dos *primers* com a sequência alvo a 55°C, durante 45 segundos, e etapa de extensão a 72°C, durante 2 minutos. Por fim, procedeu-se à extensão final que decorreu a 72°C, durante 10 minutos.

Os *primers* sintéticos utilizados nas reacções de PCR foram desenhados com o auxílio do programa Primer Express<sup>TM</sup>1.5 (Applied Biosystems). De modo a criar extremidades compatíveis nos produtos de PCR com as do vector pDM138, adicionou-se um local de corte da enzima de restrição *Clal* nas extremidades 5' de cada um dos *primers*. Os *primers* utilizados foram os seguintes: *primer forward* 5'-TTATCGAIGTCCTAATGTGCAGTCAGGTGA-3' e *primer reverse* 5'-TTATCGAIGCGACTCACTATAGGGAGACAAGCT-3', com excepção dos mutantes de deleção T5 e T7, que

foram amplificados com o seguinte par de *primers*: *primer forward* 5'-TTATCGATCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTC-3' e *primer reverse* 5'-TTATCGATCGACTCACTATAGGGAGACAAGCT-3'. A sequência de reconhecimento da enzima de restrição *Clal* inserida nas extremidades 5' dos *primers* apresenta-se sublinhada.

Após as reacções de PCR, os fragmentos amplificados foram analisados por electroforese em gel de agarose. De seguida, procedeu-se à purificação dos produtos de PCR com o kit GFX PCR DNA (GE Healthcare) e à digestão com a enzima de restrição *Cla I* (Fermentas) durante 16 horas a 37°C. Após uma nova purificação, os produtos de PCR foram inseridos no vector pDM138 linearizado e tratado com fosfatase alcalina. Para isso, o vector e os fragmentos de cDNA do HDV foram diluídos na razão molar 1:5 em 10 µl de tampão de diluição de DNA e as reacções de ligação foram efectuadas na presença de 5U ligase de DNA do fago T4 (*Rapid DNA ligation kit*; Roche), 1x tampão de ligase, num volume final de 20 µl. As misturas de ligação foram incubadas à temperatura ambiente, durante 5 minutos, e metade do volume foi usado para transformar bactérias competentes *E. coli* JM109, de acordo com o método de cloreto de cálcio (Sambrook *et al.*, 1989).

A inserção dos produtos de PCR nas duas orientações no vector pDM138, foi confirmada por digestão dos plasmídeos recombinantes com as seguintes enzimas de restrição: *EcoRI*, *PstI*, *XbaI* e *Xho I* (Fermentas). As hidrólises enzimáticas foram realizadas num volume de reacção de 20 µl contendo 1 µg de DNA plasmídico, tampão de reacção da enzima respectiva e 10 U de enzima de restrição. Após 3 a 16 horas de incubação, os fragmentos de DNA resultantes da digestão foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1%.

Para além dos 36 vectores repórter construídos através da clonagem de um conjunto de sequências obtidas a partir da digestão sequencial do cDNA do HDV do tipo selvagem com a Exo III, foram introduzidas 10 sequências menores, que perfazem a totalidade do cDNA do HDV no único local *Clal* do vector pDM138. A inserção dos fragmentos no vector pDM138 foi efectuada nas duas orientações possíveis de modo a obter-se 10 construções que codificam para subregiões do RNA genómico do HDV e outras 10 que codificam para o RNA complementar, o antigenoma.

Os fragmentos de cDNA do HDV, com tamanhos compreendidos entre os 191 e os 337 bp foram amplificados por PCR, de modo idêntico ao descrito anteriormente, utilizando-se os pares de *primers* sintéticos apresentados na tabela II.3.1. Incluiu-se um local de restrição *Clal* nas extremidades 5' dos *primers* para posterior inserção dos fragmentos no local *Clal* do vector pDM138.

Fragmentos de cDNA do HDV	<i>Forward primer 5' → 3'</i>	<i>Reverse primer 5' → 3'</i>	Dimensões dos fragmentos (bp)
A 1	CGCATCGATACTCCCTGCAGATTGGGGA	CGCATCGATATTCACCGACAAGGAGAGGC	243
A 2	CGCATCGATGCCTCTCCTTGTCGGTGAAT	CGCATCGATGAGACCTCCGGAAGACAAAGA	202
A 3	CGCATCGATTTCCGGAGGTCTCTCTCGAGT	CGCATCGATCTCCTCGCTCGGAACCTG	214
A 4	CGCATCGATTTCCCTCGGTCAACCTCCTGA	CGCATCGATATAAGGATGGAGAGGGGGCT	224
A 5	CGCATCGATCCCCTCTCCATCCTTATCCT	CGCATCGATAGGGAGAGAAGAGATCCTCGA	167
A 6	CGCATCGATCGAATGGGACCCACAAATCT	CGCATCGATTCCCAATCTGCAGGGAGT	337
A 7	CGCATCGATCCCAATCCAGATCTGGAGA	CGCATCGATTTTGCTTTCCTCCTCGCTTC	203
A 8	CGCATCGATAAAGAAAGCAACGGGGCTAG	CGCATCGATGGGAGTCGGAATCGAGCAT	199
A 9	CGCATCGATATGCTCGATTCCGACTCCC	CGCATCGATCCTAGAGAGATTTGTGGGTCCC	191
A 10	CGCATCGATCAAGTTCCGAGCGAGGAGAC	CGCATCGATCTCCAGATCTGGGATTTGGG	226

**Tabela II.3.1.** Sequência dos *primers* sintéticos utilizados nas reacções de PCR para a amplificação de 10 sequências do cDNA do HDV. Apresentam-se as dimensões, em bp, dos fragmentos originados por PCR. A sequência sublinhada corresponde à sequência de reconhecimento e de corte da enzima de restrição *Clal*.

Após a amplificação, procedeu-se à hidrólise enzimática dos produtos de PCR com a enzima *Clal*, seguida da clonagem em ambas as orientações no vector pDM138 linearizado. As reacções de ligação foram efectuadas com o kit Rapid DNA ligation (Roche), tal como descrito anteriormente. A selecção dos vectores recombinantes foi feita por comparação do padrão de restrição dos vectores isolados com o padrão de restrição do pDM138 do tipo selvagem, após digestão com as enzimas de restrição *BanII*, *EcoRI*, *BanII* e *NheI*, *PstI*, *XhoI* (Fermentas) e *BglII* e *BamHI* (Gibco).

#### II.3.2.1.4 CLONAGEM DE 8 FORMAS TRUNCADAS DA SEQUÊNCIA DE 1263 A 1466 DO CDNA ANTIGENÓMICO DO HDV NO VECTOR pDM138

Foram também amplificadas por PCR oito sequências truncadas de uma região restrita do cDNA antigenómico do HDV, situada entre as posições 1263 e 1466, de um modo idêntico ao descrito atrás em II.3.2.1.3. As sequências dos *primers* sintéticos utilizados nas reacções de PCR encontram-se na tabela II.3.2.

cDNA antigenómico do HDV	<i>Forward primer 5' → 3'</i>	<i>Reverse primer 5' → 3'</i>	Dimensões dos fragmentos (bp)
1263-1411	CGCATCGATGGGAGGAATCCACTCGGAGA	CGCATCGATTTTGCTTTCCTCCTCGCTTC	149
1301-1466	CGCATCGATCCCAATCCCAGATCTGGAGA	CGCATCGATGCATCTCCTCCTATCGCTATGG	166
1277-1466	CGCATCGATCCCAATCCCAGATCTGGAGA	CGCATCGATGCTTCGGTCTCCCCTACTC	189
1263-1436	CGCATCGATCCCGAAGGGTTGAGTAGCAC	CGCATCGATTTTGCTTTCCTCCTCGCTTC	174
1277-1436	CGCATCGATCCCGAAGGGTTGAGTAGCAC	CGCATCGATGCTTCGGTCTCCCCTACTC	159
1263-1366	CGCATCGATACCCCTTCAGCGAACAAGAG	CGCATCGATTTTGCTTTCCTCCTCGCTTC	104
1358-1466	CGCATCGATCCCAATCCCAGATCTGGAGA	CGCATCGATTGAAGGGTCTCCTCGGAGGT	109
1301-1411	CGCATCGATGGGAGGAATCCACTCGGAGA	CGCATCGATGCATCTCCTCCTATCGCTATGG	111

**Tabela II.3.2.** Sequência nucleotídica dos *primers* sintéticos utilizados na amplificação das 8 formas truncadas da sequência A7AS, situada entre os nucleótidos 1263 a 1466 do cDNA antigenómico do HDV. Apresentam-se as dimensões, em bp, dos fragmentos originados por PCR. A sequência sublinhada corresponde à sequência de reconhecimento e de corte da enzima de restrição *Clal*.

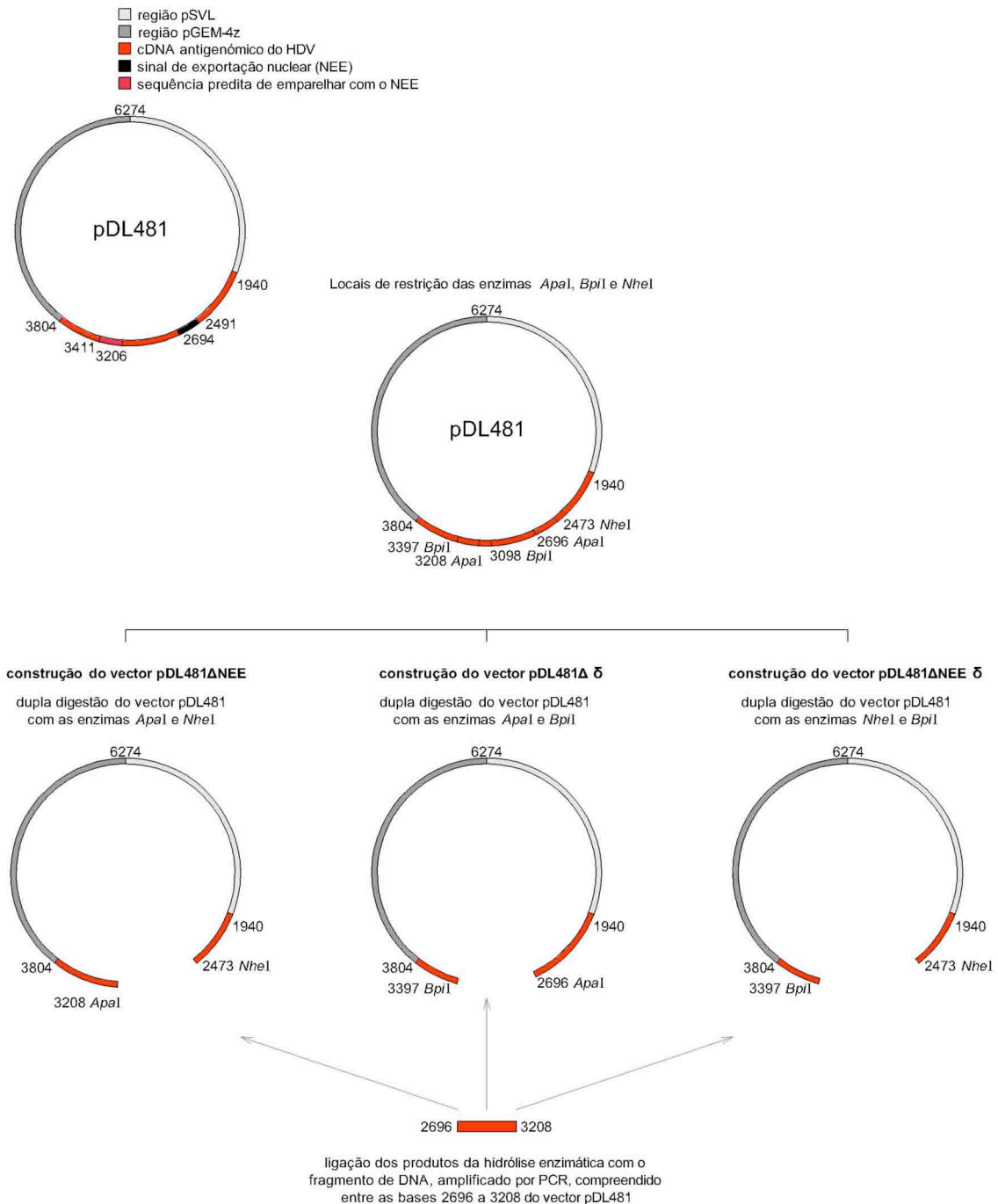
Após o PCR e hidrólise enzimática com a enzima *Clal*, os produtos de PCR foram clonados na orientação *antisense* no vector pDM138, tal como descrito em II.3.2.1.3. A selecção dos vectores recombinantes foi feita por comparação do padrão de restrição dos vectores isolados com o padrão de restrição do pDM138 do tipo selvagem, após digestão dupla com as enzimas de restrição *HaeIII* e *BamHI* (Fermentas) e *BglII* e *BamHI* (Gibco).

### II.3.2.2 CLONAGEM DE FRAGMENTOS DO cDNA ANTIGENÓMICO DO HDV NO VECTOR pDL481

Para análise da distribuição núcleo-citoplasmática do RNA antigenómico do HDV utilizou-se o plasmídeo pDL481 que codifica exclusivamente para o RNA antigenómico do HDV (Lazinski and Taylor, 1994). O plasmídeo pDL481 contém uma cópia completa do cDNA antigenómico do HDV acrescida de uma repetição de 181 bp, inserida no vector de expressão eucariota pSVL (Pharmacia Biotech). A sequência do cDNA do HDV tem início na posição 713 do RNA antigenómico do HDV, estendendo-se até ao final da sequência (1679/1), e termina na posição 894 (Fig. II.3.2.1).

A síntese do RNA antigenómico do HDV, após transfecção está sob controlo do promotor tardio do vírus símio 40 (SV40), parte integrante da região pSVL incluída no vector pDL481.

Para averiguar a contribuição do elemento *cis* identificado na exportação nuclear do RNA antigenómico do HDV construíram-se três mutantes de deleção do plasmídeo pDL481: pDL481 $\Delta$ NEE, pDL481 $\Delta$  $\delta$  e pDL481 $\Delta$ NEE $\delta$  (figura III.3.2.1).



**Figura II.3.2.1.** Representação esquemática do plasmídeo pDL481 e da estratégia utilizada na construção dos vectores pDL481 $\Delta$ NEE, pDL481 $\Delta$  $\delta$  e pDL481 $\Delta$ NEE $\delta$ . A descrição detalhada da construção dos vectores derivados do plasmídeo pDL481 encontram-se nos pontos II.3.2.2.1 e II.3.2.2.2 dos materiais e métodos deste capítulo.

### II.3.2.2.1 CONSTRUÇÃO DO VECTOR pDL481 $\Delta$ NEE

Para a construção do vector pDL481 $\Delta$ NEE, que codifica para o RNA antigenómico do HDV sem o elemento de exportação putativo (NEE), procedeu-se inicialmente à hidrólise enzimática do pDL481 com a enzima de restrição *Apal* (Gibco), durante 16 horas, a 30°C. A enzima de restrição *Apal* reconhece dois locais de restrição no plasmídeo pDL481, nas posições 2696 e 3208, respectivamente, e gera, após clivagem, dois fragmentos, um com 5762 bp e outro com 512 bp. De seguida, procedeu-se à separação dos produtos da hidrólise enzimática por electroforese em gel de agarose *low-melting point* 2%, sendo o fragmento com 5762 bp extraído do gel e purificado com o kit GFX PCR DNA (GE Healthcare). O fragmento com 5762 bp foi subsequentemente digerido com a enzima de restrição *NheI* (GE Healthcare) a 37°C durante 16 horas. Esta enzima de restrição reconhece um local de digestão na posição 2473 no vector pDL481 e após clivagem origina dois fragmentos, um com 5539 bp e outro com 223 bp. Os produtos da restrição enzimática foram separados por electroforese, em gel de agarose *low-melting point* 2% e o fragmento com 5539 bp foi removido do gel e purificado.

Em seguida, procedeu-se à ligação deste fragmento de DNA com extremidades coesivas *NheI* e *Apal* com a sequência nucleotídica de 2696 e 3208 do vector pDL481. O segmento de DNA compreendido entre as bases 2696 a 3208 do plasmídeo pDL481 foi amplificado por PCR. Os *primers* sintéticos utilizados foram desenhados com o programa Primer Express<sup>TM</sup>1.5 (Applied Biosystems). Nas extremidades 5' de cada oligonucleótido foram incluídos dois locais de restrição das enzimas *Apal* e *NheI* no *forward primer* e das enzimas *Apal* e *AgeI* no *reverse primer*, respectivamente (Tabela II.3.3).

Fragmento amplificado	<i>Forward primer</i> 5' → 3'	<i>Reverse primer</i> 5' → 3'
2696 a 3208 do pDL481	GGGCCC <u>GCTAGC</u> GCCCCCTTTTCTTCCACCTT	GGGCCC <u>ACCGGT</u> GCCCCCTTCCATCCTTAT

**Tabela II.3.3.** Sequência dos *primers* sintéticos utilizados na amplificação por PCR do cDNA antigenómico do HDV, compreendido entre os nucleótidos 2696 e 3208 do plasmídeo pDL481. As sequências GGGCCC, GCTAGC e ACCGGT correspondem às sequências de reconhecimento das enzimas de restrição *Apal*, *NheI*, e *AgeI*, respectivamente.

A reacção de PCR realizou-se num volume de 100  $\mu$ l, com 10 a 50  $\eta$ g de DNA molde (pDL481), tampão de PCR (75 mM Tris-HCl, pH 8.8 a 25°C, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% Tween 20), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP, 0.5  $\mu$ mol/ $\mu$ l de cada *primer* e 2.5 U de polimerase

de DNA *Taq* (Fermentas). Após a desnaturação inicial a 95°C, durante 3 minutos, as reacções de PCR foram sujeitas a 25-30 ciclos de amplificação, cada um subdividido em 3 etapas sucessivas: a desnaturação a 94°C durante 30 segundos, o emparelhamento a 56°C durante 45 segundos e a extensão a 72°C durante 60 segundos. Por fim, a extensão final decorreu a 72°C durante 10 minutos.

Após o PCR, o fragmento de DNA amplificado foi analisado por electroforese em gel de agarose a 1.5%, sendo de seguida purificado com o kit GFX PCR DNA. Seguiu-se a hidrólise enzimática do produto de PCR com as enzimas de restrição *NheI* e *Apal* para posterior ligação com o fragmento de DNA com 5539 bp resultante da digestão do pDL481 com as mesmas enzimas. A ligação entre o fragmento de DNA do pDL481, com 5539 bp e o produto de PCR, com 512 bp, na razão molar de 1:5, foi efectuada na presença de 5U ligase de DNA do fago T4 (*Rapid DNA ligation kit*; Roche), 1x tampão de ligase, num volume final de 20 µl. Incubou-se a mistura à temperatura ambiente durante 5 minutos e metade do volume da mistura de ligação foi usado para transformar bactérias competentes *E. coli*, JM109. A selecção dos vectores recombinantes foi feita por comparação do padrão de restrição dos vectores isolados com o padrão de restrição do pDL481 do tipo selvagem, após digestão com a enzima de restrição *XhoI*. O vector resultante é idêntico ao pDL481 com excepção da sequência de 2473 a 2696 que foi removida.

### II.3.2.2.2 CONSTRUÇÃO DOS VECTORES pDL481Δδ E pDL481ΔNEEδ

Para além do pDL481ΔNEE, construíram-se os vectores pDL481Δδ e pDL481ΔNEEδ. O pDL481Δδ tem menos 189 bp do que o pDL481 do tipo selvagem, por remoção do fragmento de DNA compreendido entre os nucleótidos 3208 e 3397 do pDL481. O pDL481ΔNEEδ apresenta duas deleções, uma de 223 bp, entre as bases 2473 e 2696, e outra de 189 bp, entre as bases 3208 e 3397 do pDL481.

Para a construção dos dois mutantes de deleção do pDL481, o vector foi inicialmente digerido com a enzima de restrição *Bpil* (Fermentas) durante 16 horas, a 37°C.

A enzima de restrição *Bpil* reconhece dois locais de restrição no plasmídeo pDL481, nas posições 3098 e 3397, originando após clivagem, dois fragmentos, um com 5975 bp e outro com 299 bp. Após a restrição enzimática, procedeu-se ao preenchimento das extremidades coesivas originadas pela *Bpil*. Para isso, os produtos da hidrólise enzimática com a endonuclease *Bpil* foram purificado e incubados durante 10 min., a 37°C, em tampão do fragmento *Klenow* da DNA polimerase I contendo 0.05 mM de cada dNTP e 5U de Klenow

(Fermentas). Subsequentemente, os fragmentos de DNA com extremidades cegas foram purificados utilizando o kit GFX PCR DNA (GE Healthcare). Finalmente, metade do produto da digestão com *Bpil* foi submetido a uma nova hidrólise enzimática com *Apal*, para construir o vector pDL481 $\Delta\delta$ , ou com *Nhel* para construir o vector pDL481 $\Delta$ NEE $\delta$ .

Tal como já foi mencionado, a enzima de restrição *Apal* reconhece dois locais de restrição no plasmídeo pDL481, nas posições 2696 e 3208. Assim, da digestão dupla do plasmídeo pDL481 com *Bpil* e *Apal* resultam quatro fragmentos de DNA, com as dimensões 110, 189, 402 e 5573 bp. A enzima *Nhel* reconhece apenas um local de restrição no vector pDL481, na posição 2473. Da digestão dupla com *Bpil* e *Nhel* resultam 3 fragmentos de DNA com as seguintes dimensões, 299, 625 e 5350 bp. Após digestão com as enzimas *Apal* e *Nhel*, procedeu-se à separação dos fragmentos de DNA por electroforese em gel de agarose *low-melting point* 2%. Removeram-se e purificaram-se os fragmentos com 5573 e 5350 bp do gel com o kit GFX PCR DNA (GE Healthcare), para posterior ligação com o segmento de DNA de 2696 a 3208 do pDL481, amplificado por PCR.

Antes das reacções de ligação, foi necessário criar extremidades compatíveis no fragmento de DNA amplificado por PCR, com as extremidades dos fragmentos de DNA de 5573 e 5350 bp do vector pDL481. Como estes possuem uma extremidade cega, o produto de PCR foi digerido com a enzima *Agel*, e após purificação foi incubado a 37°C durante 10 min., com 0.05 mM de cada dNTP e 5U de Klenow (Fermentas). Após o preenchimento das extremidades 5' protuberantes originadas pela *Agel*, o produto de PCR foi purificado e sujeito a uma segunda hidrólise enzimática com as enzimas *Apal* ou *Nhel*. Os DNAs foram purificados com o kit GFX PCR DNA (GE Healthcare). O produto de PCR duplamente digerido foi finalmente ligado com os fragmentos de 5573 e 5350 bp do pDL481, respectivamente. As reacções de ligação foram efectuadas com o kit Rapid DNA ligation (Roche). Foi usado metade do volume da mistura de ligação na transformação de bactérias competentes *E. coli*, JM109 e a selecção de recombinantes foi realizada por digestão com a enzima de restrição *XhoI*, comparando o padrão de restrição obtido com o do vector parental.

### II.3.3 CULTURA DE CÉLULAS EUCARIOTAS

A linha celular Huh7, derivada de um hepatoma humano, foi cultivada em monocamada, em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS; Invitrogen).

A linha celular Huh7-D12 foi cultivada em monocamada, em meio idêntico ao utilizado para as células Huh7, suplementado adicionalmente com 200 µg/ml geneticina (G418; Sigma). Esta linha resulta da transfecção estável da linha celular Huh7 com o plasmídeo pSVL(D3) (Kuo *et al.*, 1988). O plasmídeo pSVL(D3) contém um trímero do cDNA completo do HDV, originariamente obtido por transcrição reversa do RNA total do fígado de uma marmota infectada com HDV, e clonado no vector de expressão eucariota pSVL.

As duas culturas foram mantidas a 37°C, numa atmosfera húmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

### II.3.4 TRANSFECCÃO TRANSITÓRIA DE CÉLULAS EUCARIOTAS

Para transfecção, as células Huh7 foram cultivadas em lamelas de vidro de 12 x 12 mm ou em frascos de 25 cm<sup>2</sup> até atingirem cerca de 50 a 60% de confluência, de acordo com o objectivo pretendido.

Para a introdução de DNA plasmídico nas células utilizou-se uma mistura de lípidos comercial, o FuGENE® 6 Transfection Reagent (Roche). O reagente de transfecção (6 a 15 µl) foi diluído em meio RPMI 1640 sem soro (100 a 250 µl) e incubado durante 5 min., à temperatura ambiente. De seguida, adicionou-se o DNA plasmídico e incubou-se a mistura pelo menos 15 minutos, à temperatura ambiente. Por fim, a mistura de transfecção foi cuidadosamente adicionada às células em cultura. As células foram incubadas após transfecção, durante 48 horas, nas condições de crescimento já referidas.

A quantidade de DNA plasmídico usado nas transfecções variou conforme os ensaios a que se destinavam. Para os ensaios de quantificação da expressão da proteína CAT por ELISA (CAT-ELISA), as células Huh7 foram transfectadas em triplicado com 100 ng de vector repórter, 20 ng de pSV-β-galactosidase e 1.88 µg de pUC19 ou pGEX-6p-2. Nos ensaios CAT-ELISA em que se utilizou leptomicina B (LMB; Sigma), 18 horas após a transfecção procedeu-se à substituição do meio de cultura por meio novo contendo 10 nM de LMB ou meio novo sem LMB, e as células foram incubadas durante 24 horas e recolhidas para análise (Paca *et al.*, 2000).

Para os ensaios de *Northern blot* e qRT-PCR, as células Huh7 cultivadas em frascos de 25 cm<sup>2</sup>, foram transfectadas com cerca de 5 µg de DNA plasmídico. Nos ensaios de hibridação *in situ*, as células Huh7 cultivadas em placas de 35 mm, foram transfectadas com cerca de 1 µg de DNA plasmídico.

### II.3.5 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA ACETILTRANSFERASE DO CLORANFENICOL DE *E. coli* EM EXTRACTOS CELULARES

Para avaliar os níveis de expressão transitória do gene repórter, acetiltransferase do cloranfenicol de *E. coli*, em células Huh7 transfectadas com o plasmídeo pDM138 ou com os seus derivados, realizaram-se ensaios imunológicos colorimétricos do tipo ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) sanduíche. Recorreu-se a um kit comercial, CAT ELISA (*Colorimetric enzyme immunoassay for the quantitative determination of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) from E. coli in transfected eukaryotic cells*; Roche), que contém placas de 96 poços revestidas com um anticorpo policlonal de carneiro específico para a proteína repórter, a acetiltransferase do cloranfenicol (CAT).

O procedimento experimental foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Após transfecção, as células Huh7 cultivadas em monocamada foram lavadas três vezes com 5 ml de PBS 1X pré-arrefecido, sendo, em seguida, incubadas à temperatura ambiente com 1 ml de tampão de lise (Roche). Após 30 min. de incubação, os lisados celulares foram recolhidos para um tubo de 1.5 ml e centrifugados a 15000 x g durante 10 minutos, a 4°C. Transferiram-se os sobrenadantes resultantes para tubos de 1.5 ml que foram de imediato usados para a quantificação da proteína repórter, ou em alternativa, congelados em azoto líquido e guardados a -80°C até serem usados.

Para a quantificação da proteína repórter, aplicaram-se 200 µl dos extractos proteicos de células Huh7, nos poços da placa. Para além dos extractos celulares com níveis de expressão da proteína repórter desconhecidos, aplicaram-se ainda 200 µl, de 4 soluções padrão com concentrações crescentes de CAT na placa (0.125, 0.25, 0.5 e 1 ηg/ml). Dois dos poços da placa foram preenchidos apenas com tampão de amostra. As soluções padrão foram preparadas por diluição sucessiva de 1:2 a partir de uma solução inicial com 1 ηg/ml de CAT. Todas as amostras foram ensaiadas em duplicado.

Após aplicação dos extractos celulares e das soluções padrão, incubou-se a placa durante 1 hora, a 37°C. Após 5 lavagens com PBS, adicionou-se a cada poço 200 µl de uma solução contendo 2µg/ml de um anticorpo policlonal específico para a proteína repórter, conjugado com digoxigenina (anti-CAT-DIG), incubando-se, de seguida a placa durante 1 hora a 37°C. Após 5 lavagens com 250 µl de PBS por poço, adicionou-se 200 µl de tampão de amostra contendo 150 mU/ml de um segundo anticorpo específico para a digoxigenina conjugado com peroxidase (anti-DIG-POD). A incubação com o anticorpo anti-DIG-POD decorreu durante 1 hora a 37°C.

Por fim, realizaram-se 5 lavagens com PBS e adicionou-se 200 µl por poço de solução contendo substrato para a peroxidase. A placa foi incubada à temperatura ambiente, durante 10 a 15 minutos, até o substrato incolor ser convertido pela peroxidase em produto de reacção colorido.

Para a leitura das densidades ópticas, utilizou-se um leitor de placas de ELISA (Modelo 550; Bio-Rad) com dois filtros, um de 405 nm e um filtro de referência de 490 nm. O aparelho faz as duas leituras simultaneamente e subtrai os valores obtidos com o comprimento de onda de referência (490 nm) aos valores obtidos com o comprimento de onda primário, neste caso 405 nm, corrigindo, deste modo, as imperfeições ópticas da placa.

Em todos os ensaios deixaram-se dois poços da placa livres, onde se colocou apenas solução de substrato da peroxidase, usada como branco na experiência. O leitor de ELISA foi programado para subtrair o valor médio de absorvância do branco dos valores de absorvância de todas as amostras.

Finalizado o procedimento experimental, traçou-se a recta de calibração dos valores médios de absorvância das soluções padrão, em função da sua concentração e determinou-se a equação da recta, bem como o coeficiente de correlação. A partir da equação da recta calculou-se a concentração da proteína repórter CAT presente nas amostras. Os níveis de expressão da proteína CAT foram normalizados em relação aos valores de β-Galactosidase correspondendo à média de 3 ensaios independentes.

### **II.3.6 QUANTIFICAÇÃO DA ENZIMA β-GALACTOSIDASE DE *E. coli* EM EXTRACTOS CELULARES**

Para normalizar possíveis variações na eficiência da transfecção, as células Huh7 foram co-transfectadas com o plasmídeo pSV-β-galactosidase (Promega) que codifica para a β-galactosidase (β-Gal). O plasmídeo, usado como controlo interno da transfecção, contém o gene *lacZ* bacteriano, sob controlo do promotor do vírus símio 40 (SV40).

A quantificação dos níveis de expressão transitória da β-Gal, em cada transfecção, foi efectuada por um método análogo ao utilizado para determinar a concentração da proteína CAT. Para isso utilizou-se um kit comercial β-Gal ELISA (*Colorimetric enzyme immunoassay for the quantitative determination of β-galactosidase from E. coli in transfected eukaryotic cells*; Roche) que contém placas de 96 poços revestidas com um anticorpo monoclonal de murganho, específico para a β-Gal.

Tal como foi descrito para a proteína CAT, prepararam-se 5 soluções padrão com concentrações conhecidas e crescentes de  $\beta$ -Gal (0.078, 0.156, 0.312, 0.624 e 1.248  $\eta$ g/ml).

Alíquotas de 200  $\mu$ l de cada uma das soluções padrão, bem como, dos extractos celulares utilizados na quantificação da proteína CAT, foram aplicadas em placas de ELISA revestidas com o anticorpo primário anti- $\beta$ -Gal. Cada amostra foi testada em duplicado. Após 1 hora de incubação a 37°C, realizaram-se 3 lavagens com PBS e adicionou-se a cada poço da placa 200  $\mu$ l de uma solução contendo um anticorpo específico para a  $\beta$ -Gal conjugado com digoxigenina (0.5  $\mu$ g/ml anti- $\beta$ -Gal-DIG). A incubação com o anticorpo anti- $\beta$ -Gal-DIG decorreu durante 1 hora a 37°C. No final desta incubação, realizaram-se novas lavagens e adicionou-se um segundo anticorpo específico para a digoxigenina conjugado com peroxidase (150 mU/ml anti-DIG-POD). Após 1 hora de incubação a 37°C, realizaram-se 3 lavagens com PBS e adicionou-se por fim o substrato da peroxidase. Após breve incubação, à temperatura ambiente, realizaram-se as leituras das densidades ópticas num leitor de placas de ELISA, com os filtros de 405  $\eta$ m e de 490  $\eta$ m.

Tal como descrito anteriormente, os valores médios de absorvância das soluções padrão com concentrações de  $\beta$ -Gal conhecidas foram utilizados na construção de uma recta de calibração. A partir da equação da recta determinou-se a concentração da  $\beta$ -Gal presente nas amostras.

## **II.3.7 NORTHERN BLOT**

### **II.3.7.1 MARCAÇÃO DE SONDAS DE DNA DE CADEIA SIMPLES POR PCR ASSIMÉTRICO COM DIGOXIGENINA-11-dUTP**

Para análise por *Northern blot* utilizou-se uma sonda de DNA de cadeia simples não-isotópica, marcada com digoxigenina-11-dUTP (DIG-11-dUTP; Roche). A sonda foi marcada por reacções de PCR do tipo assimétrico.

O PCR assimétrico é usado para amplificar preferencialmente uma das cadeias do DNA molde, em relação à outra. Esta técnica é executada de forma análoga ao PCR convencional, mas um dos *primers* é adicionado em excesso em relação ao outro, de modo a maximizar a síntese da cadeia complementar à sequência alvo. A quantidade de DNA produzida por este processo é menor do que no PCR convencional, dado que a reacção de amplificação deixa de ser exponencial e passa a ser aritmética, a partir do momento em que o *primer* em menor concentração é gasto.

Como molde para as reacções de PCR assimétrico utilizou-se o vector repórter pDM138. Os *primers* sintéticos utilizados no PCR assimétrico foram desenhados para amplificar uma região de 481 bp da ORF da proteína CAT (Tabela II.3.4). O *primer reverse* foi adicionado à reacção numa concentração 10 vezes maior do que o forward primer, obtendo-se um fragmento de DNA maioritariamente de cadeia simples, complementar aos mRNAs com a ORF da proteína CAT inserida no intrão.

Fragmento amplificado da ORF da proteína CAT	<i>Forward primer</i> 5' → 3'	<i>Reverse primer</i> 5' → 3'
nt 109 a 590	GTTTCAGCTGGATATTACGGCC	TCACAGACGGCATGATGAAC

**Tabela II.3.4.** Sequências dos *primers* sintéticos utilizados na síntese de sondas de DNA de cadeia simples marcadas com DIG-11-dUTP.

As reacções de PCR foram feitas num volume de 50 µl, cada uma com tampão de PCR 1x (75 mM Tris-HCl, pH 8.8 a 25°C, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% Tween 20), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dATP, dCTP e dGTP, 0.13 mM dTTP, 0.07 mM DIG-11-dUTP, 0.1 µM *forward primer*, 1 µM *reverse primer*, 10-50 ng de DNA molde e 2,5 U de polimerase de DNA *Taq* (Fermentas). As misturas de reacção foram colocadas no termociclador e sujeitas a 35 ciclos de amplificação. Após a desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos, seguiram-se 35 ciclos de amplificação, cada um constituído por 3 etapas sucessivas: a desnaturação a 94°C durante 30 segundos, o emparelhamento a 55°C durante 45 segundos e a extensão a 72°C durante 60 segundos. Por fim decorreu a extensão final, a 72°C durante 10 minutos.

Efectuaram-se, em todos os casos, reacções controlo sem o DNA molde. Para além disso, reacções de PCR convencional testaram a especificidade dos *primers* desenhados, antes da realização do PCR assimétrico. Neste caso, os *primers* foram usados numa concentração final de 0.5 µM. Paralelamente às reacções de PCR assimétrico na presença de DIG-11-dUTP, realizaram-se reacções somente com 0.2 mM dTTP, sem DIG-11-dUTP. Este controlo foi realizado tendo em conta que a incorporação de DIG-11-dUTP nas cadeias de DNA atrasa a sua migração num gel de agarose, por comparação com a migração do mesmo DNA não marcado. Desta forma, pode-se avaliar a incorporação do nucleótido modificado nas moléculas de DNA, através de uma simples electroforese, em gel de agarose. Os produtos do PCR assimétrico, bem como, os controlos foram analisados por electroforese em géis de agarose, a 1%. Posteriormente as sondas foram purificadas usando o kit GFX PCR DNA e eluídas em 50 µl de água tratada com DEPC (Sambrook *et al.*, 1989).

### II.3.7.2 NORTHERN BLOT, GÉIS DE AGAROSE DESNATURANTES, TRANSFERÊNCIA, FIXAÇÃO E CONDIÇÕES DE HIBRIDAÇÃO

Para os ensaios de Northern blot, o mRNA de extractos totais e citoplasmáticos de células Huh7 foi isolado utilizando o kit Oligotex (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. De seguida, as amostras de mRNA foram separadas por electroforese em géis de agarose a 1%, contendo formaldeído 2.2 M numa solução de 1X MOPS (40 mM ácido-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS), pH 7.0, 10 mM acetato de sódio e 1 mM EDTA, pH 8.0). As amostras foram colocadas em gel equilibrado em tampão de electroforese, 1X MOPS, durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Para a electroforese, as amostras foram diluídas em tampão de amostra (5X tampão de amostra; 4X MOPS, 30.84% (v/v) formamida, 0.89 M (v/v) formaldeído, 4 mM EDTA, pH 8.0, 20% (p/v) glicerol e 0.4% azul de bromofenol) e desnaturadas por aquecimento, a 65°C durante 5 minutos, seguido de uma incubação de 5 minutos no gelo.

A electroforese decorreu a 5V/cm, até o azul de bromofenol ter percorrido cerca de três quartos do comprimento do gel. Após a electroforese, o gel foi incubado 2 vezes durante 30 minutos, com agitação em tampão de transferência, 0.5X TBE (44.5 mM Tris, 44.5 mM ácido bórico e 1 mM EDTA, pH 8.0). A eletrotransferência das moléculas de RNA para membranas de nylon (Hybond-N Amersham) foi efectuada num aparelho de transferência semi-seca (Trans-Blot SD semi-dry electrophoretic transfer cell, BioRad) a 200 mA durante 30 minutos.

Após a transferência, o RNA foi fixado por irradiação com luz ultravioleta no aparelho *Stratalinker UV Crosslinker 1800 & 2400* (Stratagene), em modo *autocrosslink*. Neste modo, a membrana é exposta a uma radiação de 1200 microjoules/cm<sup>2</sup>, aproximadamente durante 30 segundos. Neste período de tempo formam-se ligações covalentes entre os grupos amino do nylon e as bases azotadas uracilo das moléculas de RNA.

Após fixação do RNA, por irradiação com luz ultravioleta, as membranas foram lavadas com uma solução 2X SSC (1XSSC: 150 mM NaCl, 15 mM Citrato de sódio, pH 7.0) e em seguida lavadas com 6X SSC e colocadas num tubo de hibridação com a face contendo o RNA, voltada para o interior. As membranas foram pré-hibridadas durante 1 hora, a 42°C, com agitação em 1 ml de solução de pré-hibridação/hibridação [5X SSC, 5X Solução de Denhart, 2% (p/v) Ficoll 400, 2% (p/v) PVP e 2% (p/v) BSA), 1% SDS, 50% (v/v) formamida e 100 µg/ml tRNA] por cm<sup>2</sup> de membrana. Após esse tempo, adicionou-se 2 µl de sonda marcada com DIG-11-dUTP por ml de solução de pré-hibridação/hibridação e a hibridação foi efectuada a 42°C durante 16 horas com agitação.

Após hibridação, as membranas foram lavadas duas vezes em 2X SSC contendo 0.1% SDS, durante 5 minutos à temperatura ambiente e duas vezes em 0.2X SSC e 0.1% SDS, durante 5 minutos, à mesma temperatura. Realizaram-se mais duas lavagens em 0.2X SSC, contendo 0.1% SDS, a 42°C durante 15 minutos, seguidas de uma lavagem rápida em tampão de ácido maleico (0.1 M ácido maleico, 0.15 M NaCl, pH 7.5 suplementado com 0.3% Tween 20). Em seguida, as membranas foram bloqueadas, durante 1 hora à temperatura ambiente em tampão de ácido maleico contendo 5% (p/v) de leite magro em pó, e incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com 150 mU/ml de anticorpo monoclonal anti-DIG conjugado com peroxidase (anti-DIG-POD; Roche) no mesmo tampão. Após três lavagens de 15 minutos, à temperatura ambiente, em tampão de ácido maleico, adicionaram-se os reagentes do sistema de detecção (Lumi-Light<sup>PLUS</sup> Western Blotting Kit, Mouse/Rabbit; Roche), segundo as indicações do fabricante e as membranas foram expostas a chapas de auto-radiografia (Hyperfilm; Amersham) por períodos de tempo variáveis.

### II.3.8 RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

Para a quantificação do RNA do HDV nas fracções nucleares e citoplasmáticas de células Huh7 por qRT-PCR, procedeu-se, inicialmente, ao fraccionamento celular. A separação dos núcleos dos citoplasmas foi efectuada de acordo com o procedimento descrito por Wang *et al.* (2006). Sucintamente, 48 horas após a transfecção, as células Huh7 foram tripsinizadas, recolhidas em meio RPMI com 10% FBS e lavadas três vezes com PBS 1X pré-arrefecido a 4°C. Após uma centrifugação a 4000 rpm durante 3 min. a 4°C, os sedimentos celulares foram gentilmente ressuspensos em 1 ml de tampão RSB (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>). Após uma breve incubação a 4°C, seguida de uma centrifugação nas condições anteriores, as células túrgidas foram ressuspensas em quatro volumes de tampão de lise RSBG40 (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% (p/v) Glicerol, 0.5% Nonidet-P40, 0.5 mM DTT e 100U/ml inibidores de RNases (Ribolock, Fermentas). Seguiu-se uma nova centrifugação a 7000 rpm, durante 3 min., a 4°C, e os sobrenadantes (primeira fracção citoplasmática) foram transferidos para um novo tubo. Os núcleos sedimentados foram ressuspensos e incubados durante 5 min. em tampão de lise suplementado com 0.3% deoxicolato de sódio. Seguidamente, os núcleos foram centrifugados e o sobrenadante resultante (segunda fracção citoplasmática) foi adicionado à fracção citoplasmática, previamente recolhida. Os núcleos foram lavados, uma última vez, em tampão de lise RSBG40

e centrifugados a 10000 rpm a 4°C, durante 5 min. A lise celular e a integridade dos núcleos foi analisada por microscopia óptica, após incubação de uma alíquota da suspensão nuclear, com uma solução de 0.4% azul tripano.

Os extractos nucleares e citoplasmáticos foram imediatamente utilizados para extracção do RNA e das proteínas totais com o kit NucleoSpin® RNA/Protein (Macherey-Nagel). As proteínas totais das fracções celulares foram analisadas por electroforese em géis de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), seguida da técnica de *Western blot*, para monitorizar possíveis contaminações entre as fracções citoplasmáticas e nucleares (descrito mais a frente, no ponto II.3.9 dos materiais e métodos deste capítulo).

Apesar do kit NucleoSpin® RNA/Protein incluir um passo que consiste na hidrólise enzimática do DNA presente nos extractos celulares, o RNA total de ambas as fracções celulares foi, antes das reacções de síntese de cDNA, submetido a uma segunda incubação com DNase I para assegurar a remoção completa de quaisquer vestígios de DNA das amostras. Para isso, utilizou-se o kit comercial DNA-free™ (Ambion), de acordo com as instruções indicadas pelo fabricante.

O RNA livre de DNA foi, em seguida, utilizado na síntese de cDNA por transcrição reversa (RT), utilizando o kit Revert Aid™ first strand cDNA Synthesis (Fermentas). Antes de se iniciarem as reacções de RT, procedeu-se à desnaturação de cerca de 5 µg de RNA total e 0.2 µg de *primers* aleatórios num volume total de 12.5 µl, por aquecimento a 70°C durante 5 min. Após desnaturação, as amostras foram colocadas em gelo e adicionou-se tampão da transcriptase reversa do vírus da leucemia murina Moloney (M-MuLV), 2 mM dNTP e 20 U de inibidores de RNAses. As amostras foram então incubadas durante 5 min. à temperatura ambiente, para permitir o emparelhamento dos *primers* aleatórios com as sequências de RNA presentes na amostra. Por fim, adicionou-se 200 U de transcriptase reversa M-MuLV, num volume final de 20 µl e incubaram-se as amostras durante 10 min., à temperatura ambiente, seguindo-se uma incubação de uma hora, a 42°C. Por fim a transcriptase reversa do M-MuLV foi inactivada por aquecimento a 70°C, durante 10 min.

O cDNA resultante foi, em seguida, utilizado em reacções de PCR em tempo real para quantificação do RNA do HDV presente nas fracções nucleares e citoplasmáticas de células Huh7. O PCR em tempo real difere do convencional, na medida em que, os produtos de amplificação são analisados na fase exponencial da reacção. Durante esta fase, a quantidade de DNA obtido por amplificação reflecte a concentração de cDNA inicial presente na amostra. A acumulação do DNA, como resultado da amplificação por PCR, foi detectada através da excitação de um fluorocromo que se intercala entre as de bases do DNA, SYBR® Green I, e

emite uma fluorescência directamente proporcional à quantidade de DNA de cadeia dupla presente na amostra. Os resultados do qRT-PCR foram posteriormente analisados segundo o método de quantificação relativa  $\Delta\Delta C_t$  (Livak and Schmittgen, 2001).

As reacções de PCR em tempo real foram realizadas no aparelho GeneAmp<sup>®</sup> 5700 SDS Sequence Detection System (Applied Biosystems) e os resultados foram processados pelo *software* GeneAmp<sup>®</sup> 5700 SDS (Applied Biosystems).

Todas as amostras foram analisadas em triplicado, num volume de reacção de 20  $\mu$ l com 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP e dUTP), 0.6  $\mu$ l SYBR<sup>®</sup> Green I (Eurogentec), 0.5 U DNA polimerase *HotGold Star* (Eurogentec), 1X tampão de reacção, 300  $\eta$ M de *forward* e *reverse primer* e 2  $\mu$ l de cDNA. Após uma incubação de 10 min. a 95°C, para activação da DNA polimerase (HotGoldStar), as amostras foram sujeitas a 40 ciclos de amplificação constituídos por uma incubação de 15 segundos, a 95°C, para desnaturação das cadeias de DNA, seguida de uma incubação de 1 min., a 60°C, para emparelhamento e extensão dos *primers*.

A quantidade de DNA em cada reacção de PCR é expressa pelo valor de Ct, que corresponde ao ciclo da fase exponencial de amplificação em que o valor de fluorescência intersecta o limiar definido pelo experimentador, sendo neste caso de 0.1.

Para aplicação do método de quantificação relativa  $\Delta\Delta C_t$ , utilizaram-se dois pares de *primers* nas reacções de PCR em tempo real. Um dos pares de *primers* foi utilizado para amplificar o cDNA complementar ao RNA do HDV, presente nas fracções nucleares e citoplasmáticas de células Huh7 e o outro par, usado para amplificar o cDNA complementar ao mRNA da  $\beta$ -2-microglobulina ( $\beta$ -2-MG), utilizado como normalizador. Utilizou-se o programa Primer Express<sup>™</sup> 1.5 para desenhar os pares de *primers* sintéticos utilizados nas reacções de PCR, cujas sequências se encontram na tabela II.3.5.

cDNA amplificado	<i>Forward primer</i> 5'→ 3'	<i>Reverse Primer</i> 5'→ 3'	Código de acesso à base de dados Genebank da NBCI
$\beta$ 2MG	GGCTATCCAGCGTACTCCAA	TCACACGGCAGGCATACTC	NM_004048
HDV	CAGAGATTCTCCGGCGTTGT	CGGTAAAGAGCATTGGAACG	M21012

**Tabela II.3.5.** Sequência dos *primers* sintéticos utilizados nas reacções de amplificação por qPCR.

O método  $\Delta\Delta C_t$  requer que a eficiência de amplificação dos *primers* seleccionados para o gene de interesse e para o gene normalizador seja muito aproximada, com valores superiores a 95%. A eficiência dos *primers* foi calculada pela fórmula  $E = 10^{(-1/m)}$ , sendo (m) o declive das rectas

de regressão linear construídas com os valores de Ct obtidos na amplificação das diluições 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000 do cDNA, com os *primers* seleccionados. Foi ainda, traçada a recta de regressão que representa a variação dos valores de Ct ( $\Delta Ct$ ) obtidos para o RNA do HDV em relação ao mRNA da  $\beta$ -2-MG, em função da concentração de cDNA. O declive desta recta de regressão, que deve ser inferior a 0.1, é um indicador de que a eficiência das reacções de amplificação com os dois pares de *primers* se mantém constante, independentemente da concentração do cDNA.

De acordo com o método de quantificação relativa  $\Delta\Delta Ct$ , os valores de Ct obtidos em amostras diferentes não podem ser directamente comparados. Os valores de Ct para o RNA de interesse, neste caso o RNA do HDV nas duas fracções celulares, foram primeiro comparados com os valores de Ct obtidos para o mRNA da  $\beta$ -2-MG, a partir da mesma amostra de cDNA. Esta comparação,  $\Delta Ct (Ct_{\text{RNA do HDV}} - Ct_{\beta\text{-2-MG}})$  destina-se a normalizar a quantidade de cDNA obtida por transcrição reversa do RNA total das fracções nucleares e citoplasmáticas de células Huh7. Em seguida, os valores de Ct normalizados para o RNA do HDV no citoplasma foram comparados com os respectivos valores nucleares, obtendo-se um valor  $\Delta\Delta Ct$  para cada transfectão. As variações na proporção núcleo-citoplasmática de RNA do HDV, em relação ao valor de  $\Delta\Delta Ct$  para as células Huh7 transfectadas com o vector pDL481, são expressas pelos valores  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Os resultados apresentados correspondem à média de dois ensaios independentes.

### II.3.9 WESTERN BLOT

Para avaliar a eficácia do método utilizado no fraccionamento celular, as proteínas das fracções nucleares e citoplasmáticas foram separadas por electroforese em géis de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), seguida da técnica de *Western Blot*, utilizando um anticorpo específico para uma proteína celular predominantemente citoplasmática, a desidrogenase gliceraldeído-3-fostato (GAPDH; Ambion).

Antes da electroforese, os extractos celulares foram diluídos em tampão de amostra com SDS (6X tampão de amostra: 0.35 M Tris-HCl, pH 6.8, 10.28% SDS, 36% glicerol, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.012% azul de bromofenol) e desnaturadas por aquecimento a 100°C durante 5 minutos.

A separação das proteínas das fracções nucleares e citoplasmáticas foi feita em mini-géis verticais de poliacrilamida a 12%, em condições desnaturantes, isto é, na presença de dodecil

sulfato de sódio (SDS), utilizando o sistema descontínuo de dois géis, descrito inicialmente por Laemmli (1970).

A composição dos géis desnaturantes de poliacrilamida a 12% encontra-se indicada na tabela II.3.6. Preparou-se, primeiro, a solução do gel de separação com uma concentração de acrilamida a 12% e depositou-se a solução entre duas placas de vidro. Adicionaram-se alguns microlitros de isopropanol no topo da solução do gel de separação, para impedir o contacto com o O<sub>2</sub> que inibe a polimerização. Depois do gel de separação estar polimerizado, preparou-se a solução do gel de concentração com uma concentração de acrilamida a 4%. Removeu-se o isopropanol, com papel absorvente, e cobriu-se o gel de separação com a solução de concentração deixando-se polimerizar, à temperatura ambiente, durante 20-30 minutos.

SOLUÇÕES STOCK	GEL DE SEPARAÇÃO	GEL DE CONCENTRAÇÃO
30% (p/v) acrilamida (29% acrilamida, 1% bisacrilamida)	4.0 ml	1.3(3) ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 ml	-
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	2.5 ml
10% SDS	100 µl	100 µl
H <sub>2</sub> O	3.4 ml	6.07 ml
10% APS	40 µl	30.5 µl
TEMED	20 µl	30.5 µl

**Tabela II.3.6.** Soluções utilizadas na preparação dos géis de separação e concentração de poliacrilamida-SDS.

Após a polimerização, procedeu-se à montagem do gel no aparelho de electroforese e adicionou-se tampão de electroforese (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0.1% SDS). Finalmente, aplicaram-se as amostras e uma alíquota de padrões moleculares de proteínas (Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range; Biorad) em diferentes poços do gel.

A electroforese decorreu a 60 V, até as amostras atingirem o gel de concentração e a partir desse momento a voltagem foi aumentada para 100 V, até o azul de bromofenol atingir o fim do gel de resolução.

Após a electroforese, os géis foram equilibrados em tampão de transferência (48 mM Tris, 39 mM Glicina, 0,04% SDS e 10% Metanol) durante 20 minutos, à temperatura ambiente. De seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose Protran BA 85 (Schleicher and Schuell, Germany) num aparelho de transferência semi-seca (BioRad

Laboratories, USA) a 100 mA, durante 48 min. Após transferência, as membranas foram bloqueadas, durante pelo menos 1 hora, com 5% (p/v) de leite magro em pó em PBS 1X, à temperatura ambiente. Depois do bloqueio, incubou-se a membrana com 1 µg/ml de anticorpo primário diluído em PBS com 5% leite magro em pó durante 16 horas, a 4°C. O anticorpo primário utilizado foi um anticorpo monoclonal produzido em murganho, que reconhece especificamente a proteína GAPDH (Ambion). Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes, durante 15 min., com PBS 1X, contendo 2% leite magro em pó e 0.05% Tween 20. Após as lavagens, procedeu-se à incubação, à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário anti-imunoglobulinas de murganho conjugado com peroxidase (anti-IgG-HRP de murganho; BioRad Laboratories, USA) diluído 1:3000 em PBS 1X contendo 5% leite magro em pó. Após cerca de 1 hora de incubação, realizaram-se 3 lavagens com PBS 1X contendo 2% leite magro em pó e 0.05% Tw-20 durante 10 min., seguidas de 2 lavagens com PBS 1X. A detecção da proteína GAPDH foi efectuada com o sistema quimioluminescente ECL™ Western blotting analysis system (GE Healthcare).

### **II.3.10 HIBRIDAÇÃO *IN SITU***

A hibridação *in situ* do RNA do HDV foi efectuada de acordo com o método descrito por Zirbel *et al.* (1993), com algumas modificações introduzidas por Cunha *et al.* (1998).

#### **II.3.10.1 MARCAÇÃO DE SONDAS POR *NICK-TRANSLATION* COM DIGOXIGENINA-11-dUTP**

A hibridação *in situ* em células Huh7 transfectadas com o plasmídeo pDL542 ou com os 17 mutantes de deleção do plasmídeo pDL542 que expressam o RNA genómico do HDV completo ou fragmentos progressivamente menores do RNA do vírus foi efectuada utilizando como sondas os plasmídeos usados na transfecção marcados com digoxigenina-11-dUTP (Roche). Para detecção do RNA do HDV em células Huh7-D12 utilizou-se o plasmídeo pSVL(D3) (Kuo *et al.*, 1988). Este plasmídeo contém um trímico do cDNA completo do cDNA do HDV clonado no vector de expressão eucariota pSVL.

A marcação das sondas foi realizada por *nick-translation* (Johnson *et al.*, 1991). As reacções foram efectuadas a 15°C, durante 2 horas, num volume final de 100 µl, na presença de 2 µg de DNA plasmídico, 5 ηg de DNase I (Roche), 20U de DNA polimerase I de *E. coli* (Fermentas), 1 mM DTT, 40.2 µM dATP, dCTP e dGTP, 26 µM dTTP, 14 µM dig-11-dUTP em tampão de *nick-*

*translation* (0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.01 M MgSO<sub>4</sub>, 50 µg/ml BSA e 0.1 mM DTT). Terminado o tempo de incubação, avaliou-se a dimensão dos fragmentos de DNA originados pela acção combinada da DNase I e DNA polimerase I, por electroforese em gel de agarose a 1%. A maioria dos fragmentos de DNA deve ter cerca de 200 bp, pois tamanhos inferiores aumentam a probabilidade de ocorrência de hibridação não específica, enquanto que, a utilização de sondas com dimensões superiores pode resultar na redução da capacidade de detecção da sequência alvo.

Confirmada a dimensão dos fragmentos de DNA marcados com dig-11-dUTP, a actividade enzimática da DNase I e da DNA polimerase foi inactivada por adição de 100 µl de solução de paragem (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl, 20 mM EDTA, pH 8.0, 0.1% de azul de bromofenol e 0.5% azul dextrano). Procedeu-se de seguida, à purificação dos fragmentos de DNA, marcados com dig-11-dUTP dos nucleótidos não incorporados, por precipitação com etanol. Para isso, a cada reacção de *nick-translation* adicionou-se 10 µg tRNA de *E. coli*, 0.05 volumes de 3M acetato de sódio e 2.5 volumes de etanol absoluto. A mistura foi incubada pelo menos uma hora, a -20°C, sendo de seguida centrifugada a 4°C, durante 30 min. a 10000 rpm. O sobrenadante foi removido e o DNA precipitado foi lavado com 70% etanol (p/v) pré-arrefecido a -20°C. Após nova centrifugação a 4°C, durante 5 min. a 10000 rpm, o DNA foi seco e, por fim, foi ressuspenso em tampão de hibridação (50% formamida, 10% sulfato dextrano, 2X SSC, 50 mM fosfato de sódio, pH 7.0).

### II.3.10.2 HIBRIDAÇÃO *IN SITU*

Previamente à hibridação do RNA do HDV com as respectivas sondas marcadas com dig-11-dUTP, as células cultivadas em lamelas de vidro de 12 x 12 mm foram fixadas e permeabilizadas. A fixação e a permeabilização foram efectuadas à temperatura ambiente, por incubação sequencial, com uma solução de 3.7% (p/v) formaldeído (PFA) e 0.5% Triton X-100 em PBS durante 10 min., respectivamente. De seguida, procedeu-se à hidrólise enzimática *in situ* do DNA. Para isso, as células foram equilibradas durante 15 min. em tampão da DNase I (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM MgCl<sub>2</sub> e 2 mM DTT), seguida de uma incubação durante 2 horas a 37°C, em câmara escura húmida com 200 U/ml de DNase I livre de RNases (Roche) em tampão da DNase I contendo inibidores das RNases (Roche).

Após incubação com DNase I, as células foram lavadas três vezes durante cinco min. com PBS 1X. Depois disso, os RNAs virais intracelulares foram desnaturados por incubação com uma solução com 70% formamida (v/v), 2X SSC, 50 mM fosfato de sódio, pH 7.0 durante 3 min. a

73°C, seguida de uma nova incubação com 50% formamida (p/v), 2X SSC, 50 mM fosfato de sódio, pH 7.0 durante 1 min. a 73°C. Com esta desnaturação pretendeu-se reduzir o elevado número de emparelhamentos internos entre as sequências intramoleculares complementares do RNA do HDV, aumentando a probabilidade de hibridação da sonda com o RNA alvo.

Imediatamente a seguir à desnaturação dos RNAs intracelulares, adicionou-se às lamelas 8 µl de sonda em mistura de hibridação (10 ng/µl), previamente desnaturada por aquecimento a 75°C durante cinco minutos. A hibridação decorreu a 37°C, durante 12 a 16 horas, em câmara escura húmida. Após hibridação das sondas marcadas com dig-11-dUTP com o RNA do vírus realizaram-se três lavagens de cinco min. com cada uma das seguintes soluções: solução de 50% formamida (p/v), 2X SSC, a 45°C, solução de 2X SSC, a 60°C, e solução de 4X SSC contendo 0.1% Tween-20, a 37°C.

A detecção da sonda marcada com dig-11-dUTP foi efectuada por incubação das células, a 37°C, durante 30 min., com os seguintes anticorpos, diluídos 1:100, em 4X SSC contendo 0.1% Tween-20 e 1% BSA: monoclonal anti-dig-11-dUTP conjugado com fluoresceína (Roche) e monoclonal anti-fluoresceína conjugado com FITC (Molecular Probes, USA). Entre as incubações, as células foram lavadas três vezes durante 5 min. com 4X SSC contendo 0.1% Tween-20, a 37°C. No final da última incubação realizaram-se três lavagens de 5 min. com PBS 1X contendo 0.05% Tween-20 (PBS-T).

Para a detecção simultânea do RNA do HDV e dos antígeno delta nas células Huh7-D12, após a hibridação do RNA viral com a sonda pSVL(D3) marcada com dig-11-dUTP e detecção, as células foram incubadas com os seguintes anticorpos, diluídos 1:100, em PBS-T: soro policlonal de coelho anti-antígenos delta, B3 (Saldanha *et al.*, 1990) e monoclonal anti-imunoglobulinas de coelho conjugado com Texas Red (Jackson Immunoresearch Laboratories). As incubações com os anticorpos decorreram durante 1 hora, à temperatura ambiente, em câmara escura húmida.

Finalmente, após incubação com os anticorpos, procedeu-se à pós-fixação das células com 3.7% PFA em PBS, à temperatura ambiente, durante 5 min. e à montagem das lamelas em lâminas de vidro com meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories).

### **II.3.11 MICROSCOPIA CONFOCAL**

A análise das amostras marcadas com fluorocromos foi efectuada num microscópio confocal Zeiss LSM 510, equipado com um laser de argon (488 nm) para excitar FITC e um laser de

hélio-néon (543 nm) para excitar Texas Red. Em experiências de marcação dupla (dois fluorocromos), as imagens do mesmo plano focal foram primeiro captadas em canais diferentes e depois sobrepostas. Com o objectivo de obter um alinhamento preciso das imagens sobrepostas, o equipamento foi calibrado com o auxílio de microesferas fluorescentes (Molecular Probes, USA) e de um filtro de banda dupla que permite a visualização simultânea de fluorescência verde e vermelha.

## **II.3.12 IMUNOPRECIPITAÇÃO DE RIBONUCLEOPROTEÍNAS**

A imunoprecipitação das ribonucleoproteínas (RNPs) do HDV foi efectuada seguindo o procedimento descrito por Niranjanakumari *et al.* (2002).

### **II.3.12.1 FIXAÇÃO DAS RNPs DO HDV E CONDIÇÕES DE IMUNOPRECIPITAÇÃO**

Nos ensaios de imunoprecipitação utilizaram-se extractos da linha celular Huh7-D12, que deriva da transfecção estável de células de hepatoma humano, Huh7, com um vector que codifica para o RNA e HDAGs do HDV.

Para a preparação dos extractos, cerca de  $10^7$  células Huh7-D12 em cultura foram tripsinizadas, recolhidas em meio RPMI suplementado com 10% FBS e lavadas duas vezes com PBS 1X, a 4°C. Após uma centrifugação a 2000 rpm, durante 10 min., a 4°C, os sedimentos celulares foram ressuspensos em 10 ml de PBS 1X com 0.5% (v/v) de PFA e incubados durante 10 min., à temperatura ambiente, com ligeira agitação. A incubação com PFA foi efectuada para fixar as interacções existentes entre os RNAs e as proteínas intracelulares. A fixação pelo PFA foi, em seguida, bloqueada pela adição de uma solução de glicina numa concentração final de 0.25 M. Após uma breve incubação à temperatura ambiente, as células foram sedimentadas por centrifugação e lavadas duas vezes com PBS frio, procedendo-se, então, à lise celular. Para isso, as células foram ressuspensas em 2 ml de tampão de lise RIPA I (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxicolato de sódio, 0.05% SDS, 1 mM EDTA, pH 8.0, 150 mM NaCl e um cocktail de inibidores de proteases; Roche) e submetidas a quatro ciclos de 20 segundos de sonicação, alternados com incubações de 2 min. em gelo. A lise celular foi confirmada por microscopia óptica após incubação de uma alíquota do extracto celular com uma solução 0.4% de azul tripano.

Após sonicação, os extractos celulares foram centrifugados a 14000 rpm, durante 10 min., a 4°C. O sobrenadante resultante foi transferido para tubos de 1.5 ml, em alíquotas de 250 µl, às quais se adicionou 0.1 µg/µl de tRNA de *E. coli* e 40 µl de 50% (v/v) de proteína A ou G conjugada com sefarose (GE Healthcare), em tampão de lise RIPA I. Seguiu-se uma incubação de 1 hora, a 4°C, com o objectivo de remover as proteínas dos extractos celulares que apresentam ligação não específica com a proteína A ou G conjugada com sefarose. Após centrifugação a 4000 rpm, durante 5 min., a 4°C, recolheram-se os extractos celulares utilizados nos ensaios de imunoprecipitação. Um dos extractos foi utilizado de imediato para extracção de RNA total com o kit RNeasy (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Os restantes extractos foram incubados com 2 µg de anticorpos previamente imobilizados em cerca de 100 µl de 50% proteína A ou G-sefarose em tampão RIPA I.

Os anticorpos utilizados nos ensaios de imunoprecipitação foram os seguintes: soro policlonal de cabra anti-CRM1 (Santa Cruz Biotechnology), soro policlonal de coelho anti-HDAgs (B3; Saldanha *et al.*, 1988) e os soros normais de coelho e cabra inactivados.

A imobilização dos anticorpos foi efectuada por incubação durante 2 horas a 4°C, de 2 µg de anticorpo com 100 µl de 50% (v/v) proteína A-sefarose para o soro policlonal de coelho anti-HDAg e soro normal de coelho inactivado ou com 100 µl de 50% (v/v) proteína G-sefarose para o soro policlonal de cabra anti-CRM1 e soro normal de cabra inactivado, em tampão RIPA I.

No final desta incubação, a matriz de sefarose com os anticorpos imobilizados foi lavada cinco vezes com tampão RIPA I. Por fim, os anticorpos imobilizados foram, ainda, incubados durante 10 min., à temperatura ambiente, na presença de 40 U de inibidores de RNAses (Roche).

As imunoprecipitações decorreram a 4°C, durante 12 a 16 horas. Finalizada esta incubação, recolheram-se os sobrenadantes da imunoprecipitação por centrifugação a 6000 rpm durante um minuto, tendo sido posteriormente utilizados para extracção do RNA total. Os imunoprecipitados foram ainda, lavados cinco vezes durante 10 min. com tampão RIPA II ( 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sódio, 0.1% SDS, 1mM EDTA, 1 M NaCl, 0.2 mM PMSF e 3M Ureia). Finalmente, os imunoprecipitados foram ressuspensos em 100 µl de 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 0.5 mM EDTA, 10 mM DTT e 1% SDS e incubados a 70°C, durante 45 min., para reverter a acção do fixador nas interacções RNA-proteínas. Após incubação, os imunoprecipitados foram centrifugados e o sobrenadante resultante foi utilizado na extracção de RNA total com o kit RNeasy (Qiagen).

### II.3.12.2 RT-PCR

A extracção de RNA total foi realizada com o kit RNeasy (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Antes das reacções de transcrição reversa os RNAs foram incubados com 2 U de DNase I livre de RNases (Ambion). O RNA total purificado foi, em seguida, utilizado na síntese de cDNA com o kit Revert Aid™ first strand cDNA Synthesis (Fermentas). As reacções de transcrição reversa foram efectuadas tal como descrito anteriormente no ponto II.3.2.8 deste capítulo.

O cDNA resultante foi amplificado por PCR com um par de *primers* específico para o cDNA do HDV (Tabela II.3.7). As reacções de PCR foram efectuadas num volume de 50 µl tal como descrito anteriormente.

Fragmento amplificado do cDNA do HDV	<i>Primer forward</i> 5' → 3'	<i>Primer reverse</i> 5' → 3'	Dimensão do produto de PCR (bp)
927 a 1469 cDNA genómico 211 a 753 cDNA antigenómico	AAACCTGTGAGTGGAAACCCG	ATAGAGGACGAAAATCCCTGGC	542

**Tabela II.3.7.** Sequência dos *primers* sintéticos utilizados na amplificação do cDNA do HDV após ensaios de imunoprecipitação.

Após 35 ciclos de amplificação, os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1%.



## II.4 RESULTADOS

### II.4.1 DISTRIBUIÇÃO INTRACELULAR DOS MUTANTES DE DELEÇÃO DO RNA GENÓMICO DO HDV

A análise da distribuição intracelular das RNPs do HDV por técnicas de hibridação *in situ* e imunofluorescência mostrou que o RNA e as proteínas virais apresentam uma localização exclusivamente nuclear, podendo esta ser difusa ou concentrada em inclusões esféricas discretas, vulgarmente designadas por focos delta (Cunha *et al.*, 1998). Este padrão de distribuição não significa contudo, que as RNPs do HDV se encontram retidas permanentemente no núcleo das células. A detecção das RNPs do HDV no núcleo de fibroblastos de murganho NIH 3T3, após fusão celular induzida por glicol de polietileno com células de hepatoma humano Huh7-D12, que expressam constitutivamente o RNA do HDV e os HDAGs, indica claramente que as RNPs do HDV são capazes de ser exportadas para o citoplasma (Tavanez *et al.*, 2002). A análise separada dos componentes do HDV mostrou que os antígenos delta não possuem os sinais necessários para a exportação nuclear das RNPs do vírus, colocando-se a hipótese da migração das RNPs do HDV do núcleo para o citoplasma ser mediada por sinais presentes no RNA viral. De acordo com esta hipótese, o RNA do HDV na ausência dos HDAGs é detectado no citoplasma das células (Tavanez *et al.*, 2002).

Para testar a hipótese da exportação nuclear do RNA do HDV ser mediada por elementos *cis* específicos, começou-se por construir uma série de mutantes de deleção com dimensões progressivamente menores do cDNA do HDV. Com este objectivo, utilizou-se o plasmídeo pDL542 que contém a sequência completa do cDNA genómico do HDV (Lazinski and Taylor, 1994). Da transfecção com este plasmídeo são produzidas unicamente moléculas de RNA genómico circulares, incapazes de se replicar, devido à deleção de 2 bp da ORF do S-HDAg (Lazinski and Taylor, 1994).

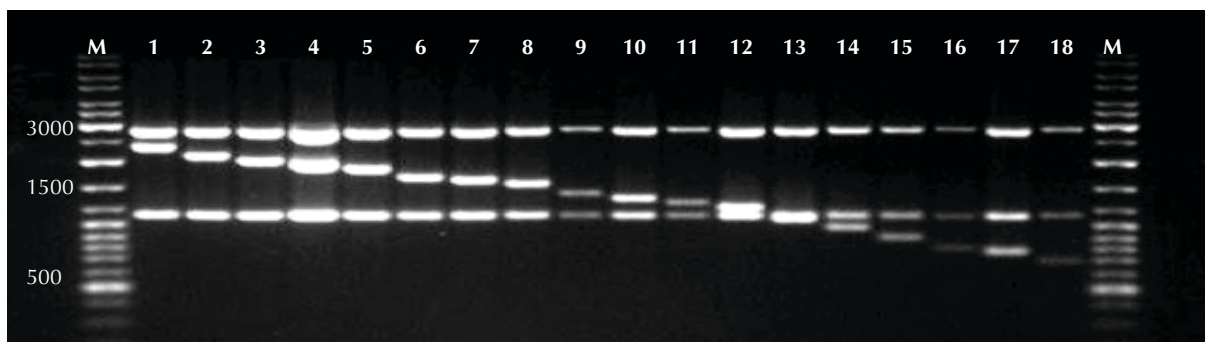
Na construção dos mutantes de deleção do cDNA do HDV utilizou-se a Exo III, enzima que cataliza a remoção unidireccional de nucleótidos a partir das extremidades 3'-OH recessivas ou cegas de sequências de DNA de cadeia dupla. Para que apenas as extremidades 3'-OH do cDNA do HDV fossem alvo da actividade de exonuclease da enzima Exo III, o vector pDL542 foi duplamente digerido com as enzimas de restrição *SacI* e *BoxI*. Enquanto, a enzima *BoxI* origina extremidades cegas sensíveis à digestão pela Exo III, a endonuclease *SacI* cria extremidades 3'-OH protuberantes, que são resistentes à actividade de exonuclease 3'→5' da



Exo III. Assim, foi possível obter fragmentos progressivamente menores do cDNA do HDV, sem contudo, digerir a região correspondente ao plasmídeo pSVL no plasmídeo pDL542.

A digestão unidireccional do cDNA do HDV foi efectuada a 25°C, temperatura para a qual a taxa de remoção de nucleótidos pela Exo III é de, aproximadamente, 90 a 100 nucleótidos por minuto.

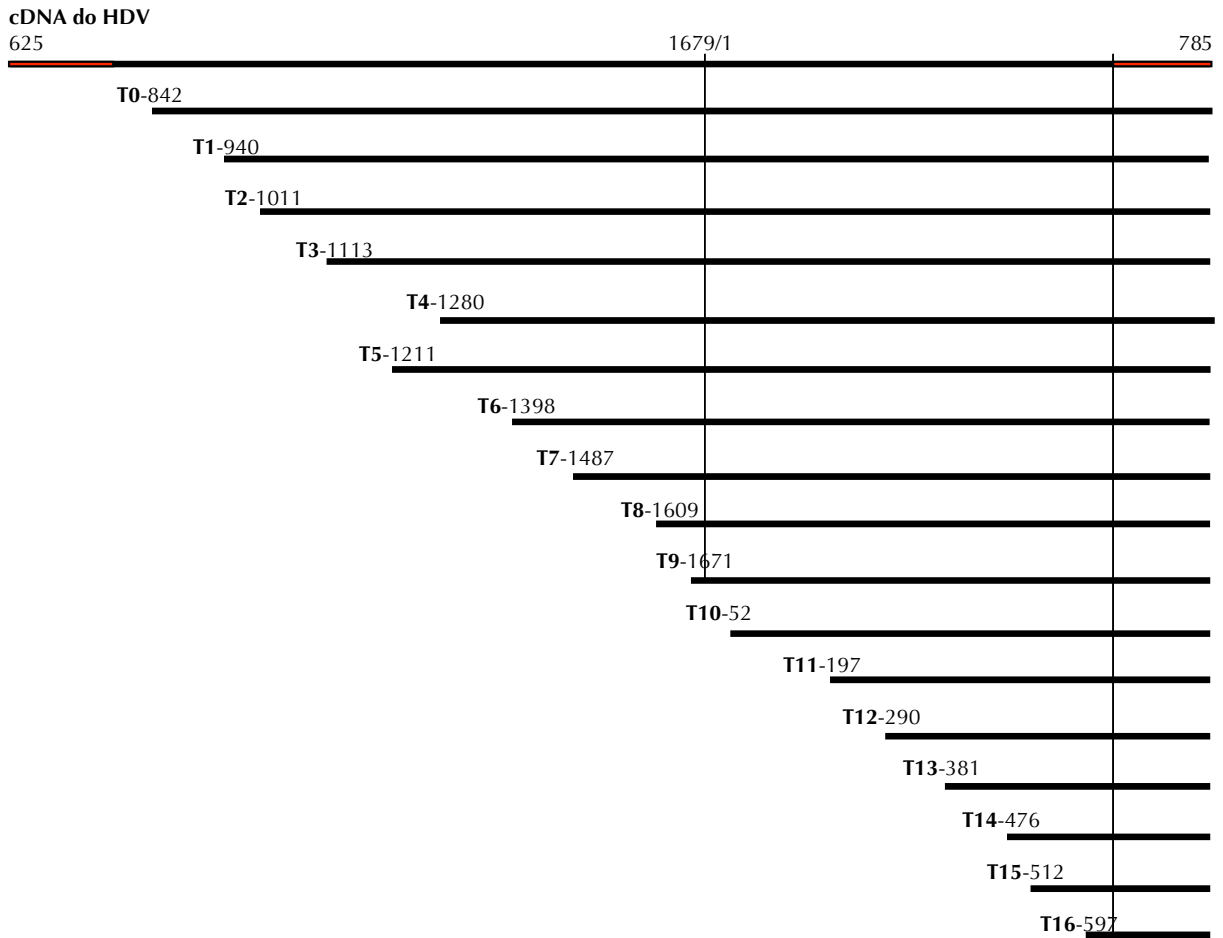
Os DNAs resultantes da digestão com a Exo III foram de seguida incubados com a nuclease S1, de modo a criar extremidades cegas nas moléculas de DNA, passíveis de serem religadas e usadas para transformar bactérias competentes. Das colónias bacterianas recombinantes, foram isolados 17 mutantes de deleção do plasmídeo pDL542, que após, digestão com a enzima de restrição *Hind*III, apresentam um padrão de bandas cujas dimensões são próximas das previstas para cada ponto temporal de digestão com a Exo III, a 25°C (Figura II.4.1.1). A enzima *Hind*III reconhece no plasmídeo pDL542 e nos 17 mutantes de deleção três locais de restrição. Note-se que, apenas um dos fragmentos de DNA, resultantes da hidrólise enzimática dos mutantes de deleção do plasmídeo pDL542 com a enzima *Hind*III, apresenta dimensões progressivamente menores. Estes fragmentos correspondem ao cDNA do HDV e são resultantes da digestão do plasmídeo pDL542 com a Exo III.



**Figura II.4.1.1.** Análise por electroforese em gel de agarose do plasmídeo pDL542 (coluna nº1) e dos 17 mutantes de deleção (colunas nº2 a nº18) digeridos com a enzima de restrição *Hind*III. A primeira e última colunas, assinaladas com um **M** correspondem aos marcadores de dimensões de DNA *GeneRuler DNA ladder mix* (Fermentas). A hidrólise enzimática do plasmídeo pDL542 (coluna nº1) com a enzima *Hind*III origina um padrão de restrição com 3 fragmentos, com as seguintes dimensões: 2795, 2337 e 1118 bp. Nas restantes colunas pode-se observar que os mutantes de deleção apresentam o mesmo número de fragmentos de restrição que o vector parental, porém, em resultado da digestão com a Exo III, o fragmento que contém o cDNA do HDV (banda intermédia) é progressivamente menor.

Os 17 mutantes de deleção do plasmídeo pDL542, que codificam para partes do RNA genómico do HDV foram sequenciados e posteriormente utilizados para transfectar células Huh7. Na figura II.4.1.2 apresentam-se as dimensões dos mutantes de deleção do cDNA

genômico do HDV e as posições onde se iniciam as sequências de RNA do vírus produzidas após transfecção.



**Figura II.4.1.2.** Representação esquemática das sequências dos mutantes de deleção do cDNA genômico do HDV originadas por digestão do plasmídeo pDL542 com a Exo III. O primeiro retângulo corresponde ao cDNA completo do HDV que tem início na posição 625 do RNA genômico do HDV. A sequência estende-se até ao final do RNA do HDV, posição 1679, e termina na posição 785. A região assinalada a vermelho corresponde à sequência de 160 bp do cDNA do HDV que se encontra repetida no plasmídeo pDL542. À esquerda dos restantes retângulos encontra-se indicada a posição onde se iniciam as sequências de RNA genômico do HDV codificadas pelos 17 mutantes de deleção do cDNA do HDV.

Numa abordagem preliminar testou-se se os RNAs virais truncados, produzidos a partir dos mutantes de deleção do cDNA do HDV, são capazes de ser exportados do núcleo para o citoplasma ou, em alternativa, por perda dos sinais de exportação, apresentam eventualmente um padrão de distribuição intracelular diferente do exibido pelo RNA genômico do HDV do tipo selvagem, localizando-se exclusivamente no núcleo.

A distribuição intracelular dos RNAs virais foi analisada por hibridação *in situ*, utilizando como sondas os respectivos mutantes de deleção do plasmídeo pDL542 marcados com dig-11-dUTP. A marcação de sondas para os ensaios de hibridação *in situ* foi efectuada por *nick-translation*. De modo a aumentar a probabilidade de hibridação da sonda com o RNA viral, que possui um elevado número de sequências intramoleculares complementares, a hibridação foi efectuada em condições desnaturantes (Cunha *et al.*, 1998).

Como se pode observar nas figuras II.4.1.3 A e B, o RNA genómico do HDV, em células Huh7 transfectadas com o plasmídeo pDL542, apresenta dois padrões de distribuição intracelular.

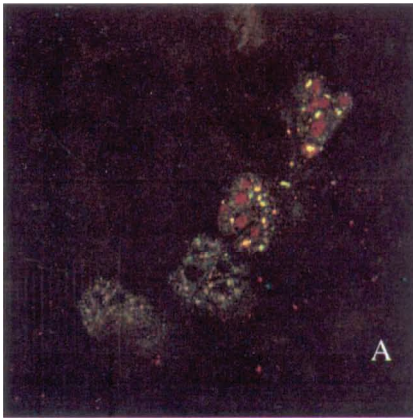


**Figura II.4.1.3.** Distribuição intracelular do RNA genómico do HDV em células Huh7 transfectadas com o plasmídeo pDL542 (A e B). Células Huh7 foram transfectadas com o plasmídeo pDL542 e o RNA viral (verde) foi detectado por hibridação *in situ*, utilizando-se como sonda o vector pDL542 marcado com dig-11-dUTP. Na maioria das células, o RNA viral é detectado exclusivamente no núcleo, com excepção dos nucléolos (A). Numa percentagem significativa de células transfectadas, o RNA genómico do HDV pode ser observado no citoplasma (B).

Na maioria das células transfectadas é possível observar uma marcação exclusivamente nuclear para o RNA genómico do HDV (Figura II.4.1.3 A). Este padrão de distribuição é idêntico ao observado para o RNA do HDV em células Huh7-D12, as quais expressam constitutivamente o RNA e as proteínas virais (Figura II.4.1.4). A linha celular Huh7-D12 resulta da transfecção estável de células Huh7 com o plasmídeo pSVL(D3) (Cheng *et al.*, 1993). Esta construção contém um trímero do cDNA completo do HDV clonado no vector de expressão eucariota pSVL e codifica exclusivamente para o RNA genómico do HDV e para o S-HDAg (Kuo *et al.*, 1988). Para além dos RNAs virais sintetizados como resultado da transcrição do cDNA do HDV são, também produzidas moléculas de RNA genómico e antigenómico do HDV, por um mecanismo de círculo rolante, em que os RNAs virais servem de molde à síntese de RNAs multiméricos complementares. Estes RNAs são autoclivados dando origem a

moléculas monoméricas que, após ligação, continuam a replicar-se no interior da célula. Nas experiências de hibridação realizadas, a sonda utilizada permite detectar tanto com o RNA genómico como o RNA antigenómico do vírus.

As células Huh7-D12, para além dos RNAs do HDV, acumulam as duas formas do antigénio delta. Para analisar a localização do RNA do HDV e dos HDAGs, as células Huh7-D12 foram hibridadas com a sonda pSVL(D3) e incubadas com soro policlonal de coelho anti-antigénios delta. De acordo com o esperado, o RNA do HDV, bem como os HDAGs, localizam-se exclusivamente no núcleo das células (Figura II.4.1.4). Estes resultados mostram que na presença dos HDAGs, os RNAs genómico e antigenómico do HDV são detectados, somente, no núcleo das células.



**Figura II.4.1.4.** Distribuição intracelular do RNA do HDV e dos HDAG em células Huh7-D12. Células Huh7-D12 após fixação e permeabilização foram hibridadas, em condições desnaturantes, com a sonda pSVL(D3) (verde) e incubadas com soro policlonal de coelho anti-antigénios delta (vermelho).

Em contraste com a distribuição exclusivamente nuclear do RNA do HDV nas células Huh7-D12, verificou-se que um número significativo de células Huh7 transfectadas com o plasmídeo pDL542 exibe um padrão núcleo-citoplasmático de distribuição do RNA genómico do HDV (Figura II.4.1.3 B). A localização citoplasmática do RNA genómico, na ausência dos HDAGs, está em conformidade com a hipótese dos sinais para exportação das RNPs do HDV se encontrarem no RNA viral.

As experiências de hibridação *in situ*, efectuadas para examinar a distribuição intracelular dos RNAs do HDV codificados pelos mutantes de deleção do plasmídeo pDL542 mostraram que todos os RNAs virais truncados apresentam, de um modo geral, o mesmo padrão de distribuição do RNA genómico completo do HDV. À semelhança do que sucede com o RNA genómico completo do HDV, todos os mutantes de deleção do genoma do HDV são detectados no núcleo e no citoplasma das células transfectadas. Nas figuras II.4.1.5 A e B podem-se observar os padrões típicos da localização intracelular dos RNAs virais truncados.



**Figura II.4.1.5.** Distribuição intracelular dos mutantes de deleção do RNA genómico do HDV (A e B). Células Huh7 foram transfectadas com os mutantes de deleção do plasmídeo pDL542 e os RNAs truncados foram detectados por hibridação *in situ* (verde). À semelhança do que sucede com o RNA genómico completo do HDV, os RNAs truncados podem ser observados no núcleo (A) mas também no citoplasma (B) das células transfectadas.

A expressão e análise da distribuição intracelular de uma série de mutantes de deleção do RNA genómico do HDV não permitiu identificar nenhuma sequência essencial para a exportação nuclear do RNA do vírus.

Com o objectivo de verificar se alguns dos mutantes de deleção do RNA genómico do HDV são menos eficientes na exportação nuclear do que o RNA genómico do vírus do tipo selvagem procedeu-se à contagem do número de células com marcação citoplasmática do RNA do HDV, após transfecção com o plasmídeo pDL542 e com os 17 mutantes de deleção (Tabela II.4.1).

Os resultados obtidos mostraram não existir diferença significativa na percentagem de células com marcação citoplasmática do RNA genómico do HDV entre o plasmídeo pDL542 e os mutantes de deleção T0, T1, T2, T3 e T5 indicando que a sequência compreendida entre os nucleótidos 625 a 1211 do RNA genómico do HDV não é necessária para a exportação nuclear (Tabela II.4.1 e resultados não apresentados). Note-se que parte desta sequência, nomeadamente entre os nucleótidos 625 a 785, encontra-se repetida em todos os mutantes de deleção.

Por outro lado, verificou-se, em relação ao vector pDL542, que a digestão parcial ou completa da sequência compreendida entre os nucleótidos 1211 e 1487 do RNA genómico causa uma redução significativa no número de células com marcação citoplasmática do RNA do vírus. Em relação ao vector pDL542 observou-se uma redução de 40 e 50% do número de células com RNAs virais no citoplasma após transfecção com os mutantes de deleção T4 e T7,

respectivamente (Tabela II.4.1). Os mutantes de deleção do plasmídeo pDL542 T4 e T7 codificam para RNAs virais com menos 167 e 374 nucleótidos do que os RNAs produzidos a partir do mutante de deleção T3 (Figura II.4.1.2).

Esta diminuição na percentagem de células com marcação citoplasmática poderá indicar que os RNAs genómicos do HDV sem a sequência compreendida entre os nucleótidos 1211 e 1487 são menos eficazmente exportados para o citoplasma.

A redução na percentagem de células com um padrão de marcação citoplasmática foi, ainda, maior quando se analisaram os mutantes de deleção que codificam para RNAs genómicos do HDV com dimensões inferiores a 300 nucleótidos, sem a sequência compreendida entre os nucleótidos 476 e 512 (mutantes de deleção T15 e T16). Nestes casos, a redução na percentagem de células com RNAs genómicos do HDV distribuídos no citoplasma foi de 67% (Tabela II.4.1 e resultados não apresentados).

Em resumo, os resultados parecem sugerir que os mutantes de deleção do RNA genómico do HDV sem as sequências compreendidas entre os nucleótidos 1211 e 1487 e os nucleótidos 476 e 512 são menos eficientemente exportados para o citoplasma.

PLASMÍDEOS	NÚMERO DE CÉLULAS COM MARCAÇÃO NUCLEAR DO RNA DO HDV	NÚMERO DE CÉLULAS COM MARCAÇÃO NÚCLEO-CITOPLASMÁTICA DO RNA DO HDV	% DE CÉLULAS COM MARCAÇÃO NUCLEAR DO RNA DO HDV	% DE CÉLULAS COM MARCAÇÃO NÚCLEO-CITOPLASMÁTICA DO RNA DO HDV
pDL542	102	32	76	24
T0	100	35	73	27
T1	102	34	75	25
T4	112	18	86	14
T5	113	28	80	20
T7	121	17	88	12
T15	106	10	92	8

**Tabela. II.4.1.** Percentagem de células Huh7 transfectadas com o plasmídeo pDL542 ou com os mutantes de deleção indicados, que exhibe um padrão de distribuição citoplasmático do RNA genómico do HDV, em relação às células Huh7 com um padrão de marcação exclusivamente nuclear.

As experiências anteriores não permitiram identificar, inequivocamente, nenhuma região no RNA genómico do HDV, essencial para promover a sua exportação para o citoplasma.

Para investigar a provável presença e identificar os elementos *cis* envolvidos na exportação nuclear do RNA do HDV utilizou-se uma abordagem experimental que consiste na transfecção

transitória de células eucariotas com o vector repórter pDM138, no qual foram inseridos vários cDNAs que codificam para o RNA do HDV.

Este vector foi originariamente desenvolvido para identificar a sequência mínima do genoma do HIV-1, designada de RRE (*Rev responsive element*), indispensável para a exportação nuclear de mRNAs virais com intrões que codificam para as proteínas estruturais do vírus (Huang *et al.*, 1991). O vector pDM138, tal como o vector que lhe deu origem, o pDM128, codifica a segunda metade do genoma do HIV-1/SF2, sob controlo do promotor do vírus SV40. Na região intrónica do gene que codifica para as proteínas do envelope do HIV-1 foi inserida uma sequência de 780 bp que codifica para a proteína repórter acetiltransferase de cloranfenicol (CAT; Hope *et al.*, 1990). A expressão da proteína repórter depende da exportação nuclear de moléculas de mRNA com um intrão na sua sequência. Regra geral, estes mRNAs ficam retidos no núcleo das células até a remoção completa dos intrões, que acabam por ser degradados. Os mRNAs produzidos em resultado da transcrição do vector pDM128 são eficientemente exportados para o citoplasma desde que as células expressem simultaneamente a proteína Rev. A Rev, proteína codificada pelo HIV-1, reconhece especificamente o elemento de exportação nuclear RRE presente a jusante da sequência que codifica para a CAT e promove o transporte nuclear dos mRNAs com um intrão, produzidos a partir do vector pDM128, pela via celular mediada pela exportina CRM1 (Hope *et al.*, 1990).

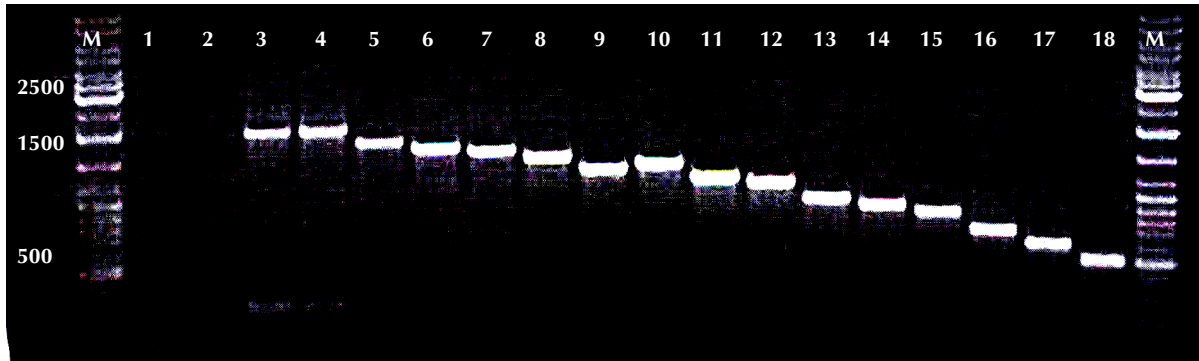
A sequência que contém o elemento de transporte RRE foi retirada do pDM138 e substituída por um *linker* que possui um local de corte único para a enzima de restrição *Clal*. Deste modo, a exportação nuclear dos mRNAs sintetizados a partir do vector pDM138 e consequente expressão da proteína repórter depende da inserção de um elemento de transporte funcional no local de restrição *Clal* do vector pDM138 (Huang *et al.*, 1991).

## **II.4.2 IDENTIFICAÇÃO DO(S) ELEMENTO(S) DE EXPORTAÇÃO NUCLEAR PRESENTES NO RNA DO HDV**

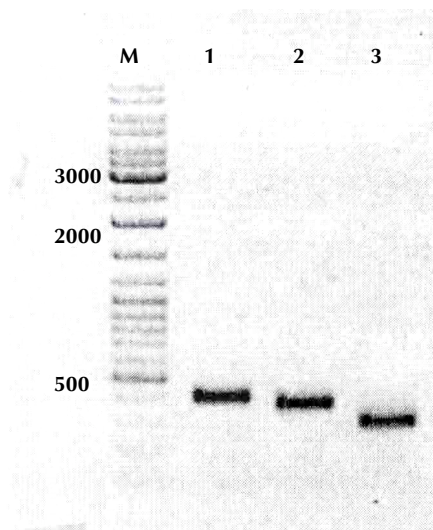
### **II.4.2.1 CLONAGEM DO cDNA DO HDV NO VECTOR pDM138**

Com o objectivo de investigar se o RNA do HDV possui elementos *cis* na sua sequência, capazes de promover a exportação nuclear de mRNAs heterólogos com um intrão, com o consequente aumento na expressão da proteína CAT, procedeu-se à clonagem de vários fragmentos de cDNA do HDV no único local de restrição da enzima *Clal* do plasmídeo pDM138.

As sequências de cDNA do HDV foram amplificadas por PCR usando-se *primers* específicos. Inicialmente foram amplificados os 17 mutantes de deleção do cDNA do HDV, construídos por digestão unidireccional do plasmídeo pDL542 com a Exo III, e ainda o cDNA completo do HDV (Figuras II.4.2.1 e II.4.2.2).



**Figura II.4.2.1.** Análise por electroforese em gel de agarose a 1% dos fragmentos de cDNA do HDV amplificados por PCR a partir do vector pDL542 e dos mutantes de deleção do vector pDL542 T0 a T13. A primeira e última colunas, assinaladas com um **M** correspondem aos marcadores de dimensões de DNA *GeneRuler DNA ladder mix* (Fermentas). Foram utilizados dois pares de *primers* específicos para amplificação do cDNA do HDV. As colunas indicadas com os números 1 e 2 correspondem aos controlos negativos das reacções de PCR com omissão do DNA molde. As colunas nº3 e nº4 correspondem ao cDNA completo do HDV amplificado a partir do plasmídeo pDL542. As restantes colunas (nº5 a nº18) correspondem aos produtos resultantes da amplificação por PCR dos mutantes de deleção do cDNA do HDV T0 a T13.



**Figura II.4.2.2.** Análise por electroforese em gel de agarose a 1% dos fragmentos de cDNA do HDV amplificados por PCR a partir dos mutantes de deleção do plasmídeo pDL542 T14 a T16.

Atendendo ao facto das sequências dos mutantes de deleção do cDNA do HDV e do cDNA completo do vírus se encontrarem flanqueadas por sequências nucleotídicas idênticas, as

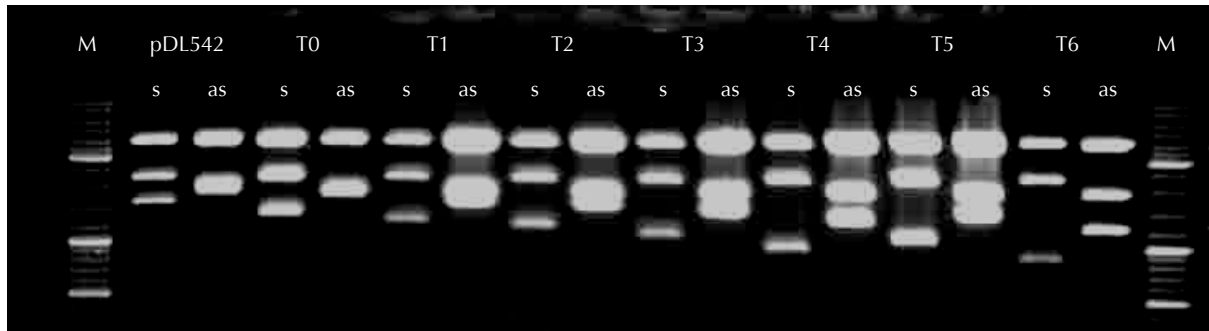
reacções de amplificação, com excepção dos mutantes T5 e T7, foram efectuadas unicamente com um par de *primers* sintéticos.

Verificou-se, após sequenciação, que os mutantes de deleção do plasmídeo pDL542 T5 e T7 (colunas nº10 e nº12 da Figura II.4.2.1), muito provavelmente devido à presença de *nicks* nas cadeias de DNA, a montante das extremidades 3'-OH protegidas da actividade da Exo III, possuem uma deleção de 276 e 65 nucleótidos, respectivamente, da região pSVL do plasmídeo pDL542. Para amplificação destes mutantes foi, por isso, necessário utilizar nas reacções de PCR um *forward primer* diferente do usado para amplificar os restantes mutantes. Para criar nos produtos de PCR extremidades compatíveis com as geradas por clivagem do vector pDM138 com a enzima de restrição *Clal*, adicionou-se a sequência de reconhecimento e clivagem desta endonuclease nas extremidades 5' dos *primers* sintéticos (ponto II.3.2.1.3 dos materiais e métodos do capítulo II).

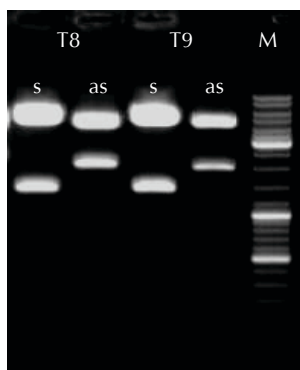
Os 18 fragmentos do cDNA do HDV, em que o maior com 1955 bp contém o cDNA completo do HDV e o menor possui apenas 307 bp foram, após PCR, clivados com a enzima de restrição *Clal* e inseridos no vector pDM138.

Para além de se procurar identificar as sequências responsáveis pela exportação do RNA genómico do HDV, pretendeu-se igualmente investigar a presença de elementos *cis* com função na exportação no RNA antigenómico do vírus. Para isso os cDNAs do HDV obtidos por PCR foram clonados nas duas orientações possíveis, *sense* e *antisense*, no vector pDM138. Uma vez que o RNA antigenómico do HDV é complementar ao RNA genómico do vírus, por cada reacção de ligação do pDM138 com um cDNA do HDV, foram isolados dois vectores repórter, sendo que um deles codifica para um mRNA heterólogo que contém um fragmento do RNA genómico do HDV e o outro, após transfecção, expressa um mRNA repórter com uma sequência do RNA antigenómico viral inserido no intrão.

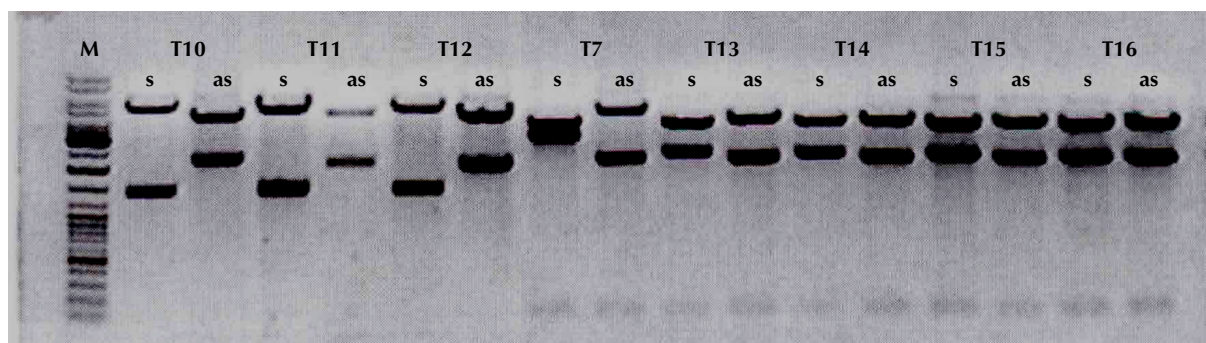
A selecção dos vectores recombinantes foi efectuada por comparação do padrão de restrição dos vectores isolados com o vector pDM138 parental, após digestão com enzimas de restrição apropriadas. Nas figuras II.4.2.3, II.4.2.4 e II.4.2.5 podem-se observar os resultados da análise por electroforese em gel de agarose dos vectores pDM138 isolados, digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI*, *PstI* e *XbaI*. Nas tabelas II.4.2, II.4.3 e II.4.4 apresentam-se as dimensões, em bp, dos fragmentos de restrição resultantes da clivagem dos vectores pDM138 recombinantes com as enzimas de restrição indicadas.



**Figura II.4.2.3.** Análise por electroforese em gel de agarose a 1% dos vectores pDM138-pDL542 e pDM138-T0 a T16 digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*. As colunas assinaladas com um **S** correspondem às construções que codificam para o RNA genómico do HDV, e as que se encontram indicadas com **AS** correspondem aos vectores pDM138 que codificam para o RNA antígenómico do vírus.



**Figura II.4.2.4.** Análise por electroforese em gel de agarose a 1% dos vectores pDM138-T8 e T9 com a enzima de restrição *XbaI*. **S**: Construções em que o cDNA do HDV foi clonado na orientação sense; **AS**: Construções em que o cDNA do HDV foi clonado na orientação antisense.



**Figura II.4.2.5.** Análise por electroforese em gel agarose a 1% dos vectores pDM138-T10 a T12 digeridos com a enzima *XbaI* e dos vectores pDM138-T7 e pDM138-T13 a T16 digeridos com a enzima de restrição *PstI*. **S**: Construções em que o cDNA do HDV foi clonado na orientação sense; **AS**: Construções em que o cDNA do HDV foi clonado na orientação antisense.

pDM138.pD		pDM138.T0		pDM138.T1		pDM138.T2		pDM138.T3		pDM138.T4		pDM138.T5		pDM138.T6	
S	AS	S	AS	S	AS	S	AS	S	AS	S	AS	S	AS	S	AS
3640	3640	3640	3640	3640	3640	3640	3640	3640	3640	3640	3640	3640	3640	3640	3640
2236	1988	2236	1877	2236	1877	2236	1877	2236	1877	2236	1877	2236	1877	2236	1877
1629	1877	1411	1770	1312	1671	1243	1602	1141	1500	974	1333	1062	1421	856	1215

**Tabela II.4.2.** Dimensões dos fragmentos de DNA, em bp, originados por hidrólise enzimática dos vetores pDM138-pDL542 e pDM138-T0 a T6 com a enzima de restrição *EcoRI*. As colunas indicadas com um **S** correspondem às construções que codificam para o RNA genómico do HDV e as colunas **AS** as que codificam para o RNA antigenómico do vírus.

pDM138.T7		pDM138.T8		pDM138.T9		pDM138.T10		pDM138.T11		pDM138.T12	
S	AS	S	AS	S	AS	S	AS	S	AS	S	AS
3843	4759	5070	4172	5009	4172	4952	4172	4778	4172	4715	4172
2717	1801	1449	2347	1449	2286	1449	2229	1449	2055	1449	1992
142	142										

**Tabela II.4.3.** Dimensões dos fragmentos de DNA, em bp, originados por hidrólise enzimática dos vetores pDM138-T7 e pDM138-T8 a T12 com as enzimas de restrição *PstI* e *XbaI*, respectivamente. As colunas indicadas com um **S** correspondem às construções que codificam para o RNA genómico do HDV e as que se encontram assinaladas com **AS** correspondem aos vetores pDM138 que codificam para o RNA antigenómico do vírus.

pDM138.T13		pDM138.T15		pDM138.T16		pDM138.T14	
S	AS	AS	S	S	AS	S	AS
3843	4104	4006	3843	3843	3977	3843	3895
2065	1801	1801	1964	1935	1801	1853	1801
142	142	142	142	142	142	142	142

**Tabela II.4.4.** Dimensões dos fragmentos de DNA, em bp, originados por hidrólise enzimática dos vetores pDM138-T13 a T16 com a enzima de restrição *PstI*. As colunas assinaladas com um **S** correspondem às construções que codificam para o RNA genómico do HDV, e as que se encontram indicadas com **AS** correspondem aos vetores pDM138 que codificam para o RNA antigenómico do vírus.

No total foram isoladas 36 construções derivadas do plasmídeo pDM138, das quais 18 codificam para diferentes partes do RNA genómico do vírus e os restantes para diferentes porções do RNA antigenómico do HDV.

### II.4.2.2 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CAT EM EXTRACTOS PROTEICOS DE CÉLULAS HUH7

Após confirmação da inserção dos fragmentos de cDNA do HDV no plasmídeo pDM138, os 36 vectores construídos foram utilizados para transfectar transitoriamente células Huh7.

Tal foi como descrito anteriormente, a exportação nuclear e acumulação citoplasmática dos mRNAs heterólogos com um intrão foi avaliada pelos níveis de expressão da proteína repórter CAT. A quantificação da proteína CAT em lisados celulares, foi efectuada por ensaios imunológicos colorimétricos do tipo ELISA, com um kit comercial, CAT ELISA (Roche), seguindo as recomendações do fabricante.

Os níveis de expressão de um gene repórter podem variar de acordo com a eficiência da transfecção. Para minimizar os efeitos que a variação na eficiência de transfecção poderiam ter na interpretação dos resultados foi necessário proceder à sua normalização. Assim, assegura-se que as diferenças encontradas na expressão da proteína CAT resultam da exportação e acumulação citoplasmática de mRNAs com um intrão e não a diferenças a nível da eficiência da transfecção.

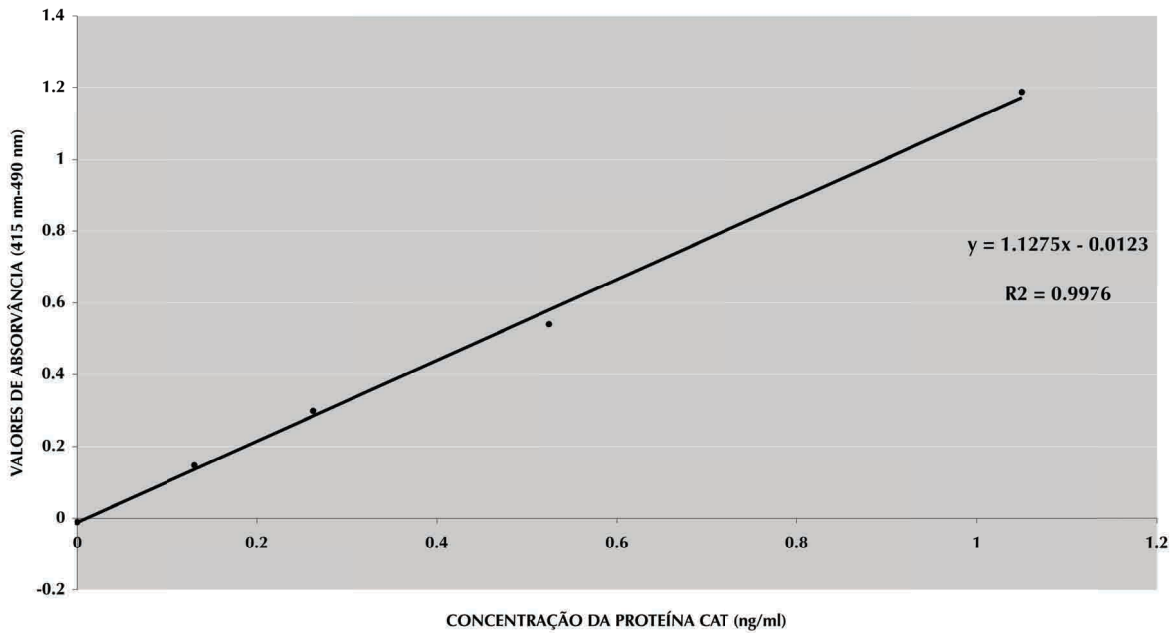
Deste modo, as células Huh7 foram co-transfectadas com um vector comercial, pSV- $\beta$ -galactosidase, que codifica para a  $\beta$ -Gal. A quantificação dos níveis de expressão da  $\beta$ -Gal em extractos proteicos de células Huh7 co-transfectadas com o plasmídeo pSV- $\beta$ -galactosidase e com os vectores derivados do pDM138 foi efectuada através de um método análogo ao utilizado para quantificar a proteína CAT, recorrendo ao kit comercial  $\beta$ -Gal ELISA (Roche).

A concentração das proteína CAT e  $\beta$ -Gal nos extractos celulares ensaiados foi determinada a partir de rectas de calibração construídas a partir dos valores médios de absorvância de soluções padrão com concentrações de proteína CAT e  $\beta$ -Gal conhecidas. Foram determinadas tantas rectas de calibração quantas as placas ensaiadas. As figuras II.4.2.6 e II.4.2.7 apresentam dois exemplos das rectas de calibração utilizadas para calcular a concentração das proteínas CAT e  $\beta$ -Gal, respectivamente.

Os resultados apresentados dos níveis de expressão da proteína CAT por ELISA, normalizados em relação aos valores de B-Gal correspondem à média 3 ensaios independentes.

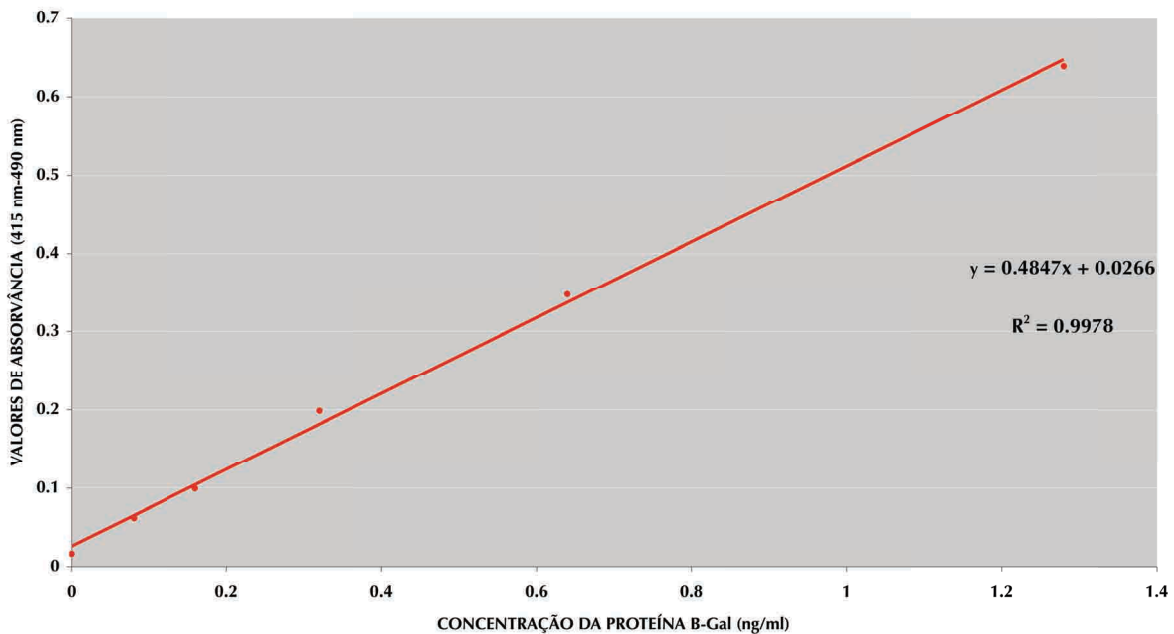


RECTA DE CALIBRAÇÃO PARA A PROTEÍNA CAT



**Figura II.4.2.6.** Exemplo de uma recta de calibração para a proteína CAT. A recta foi determinada a partir dos valores médios de absorvância, obtidos por ELISA de quatro soluções com concentrações de CAT crescentes. A equação da recta de calibração é dada por  $y=1.1275x-0.0123$ , em que  $y$  corresponde ao valor médio da absorvância e  $x$  à concentração da proteína CAT.

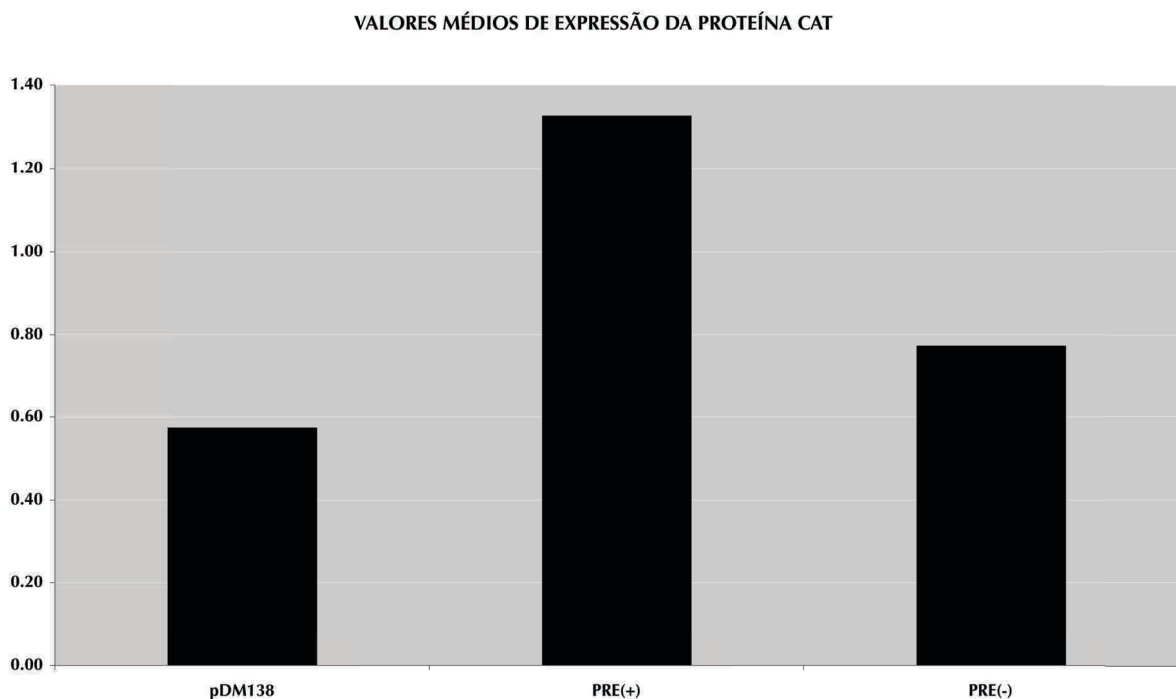
RECTA DE CALIBRAÇÃO PARA A PROTEÍNA B-Gal



**Figura II.4.2.7.** Exemplo de uma recta de calibração para a proteína  $\beta$ -Gal. A recta foi determinada a partir dos valores médios de absorvância, obtidos por ELISA de cinco soluções com concentrações de  $\beta$ -Gal crescentes. A equação da recta de calibração é dada por  $y=0.4847x+0.0266$ , em que  $y$  corresponde ao valor médio da absorvância e  $x$  à concentração da proteína  $\beta$ -Gal .

Como controlos do sistema repórter escolhido para identificação dos sinais de exportação do RNA do HDV utilizaram-se o plasmídeo pDM138 parental e os vectores pDM138-PRE(+) e pDM138-PRE(-). Estes vectores contêm um fragmento de DNA com 570 bp que codifica para o PRE do HBV, inserido em orientações opostas (Huang and Yen, 1995).

Estudos prévios mostraram que o PRE do HBV é capaz de substituir o RRE/Rev do HIV-1 no sistema repórter pDM138 e induzir um aumento de cerca de oito vezes na actividade da proteína repórter CAT, quando quantificada por cromatografia de camada fina (Huang and Yen, 1995). Foi também demonstrado que a função do PRE do HBV na exportação nuclear depende da sua orientação em relação ao gene da proteína repórter.



**Figura II.4.2.8.** Valores médios de expressão da proteína CAT em extractos de células Huh7 transfectadas com os vectores pDM138, pDM138-PRE(+) e pDM138-PRE(-). Para efeitos de normalização da eficiência da transfecção, as células Huh7 foram co-transfectadas com o plasmídeo pSV- $\beta$ -Galactosidase. Os níveis da expressão da proteína CAT foram quantificados por ELISA e normalizados, dividindo os valores de concentração determinados para a proteína CAT pela concentração calculada para a  $\beta$ -Gal. Os valores normalizados da proteína CAT apresentados correspondem à média de três ensaios independentes.

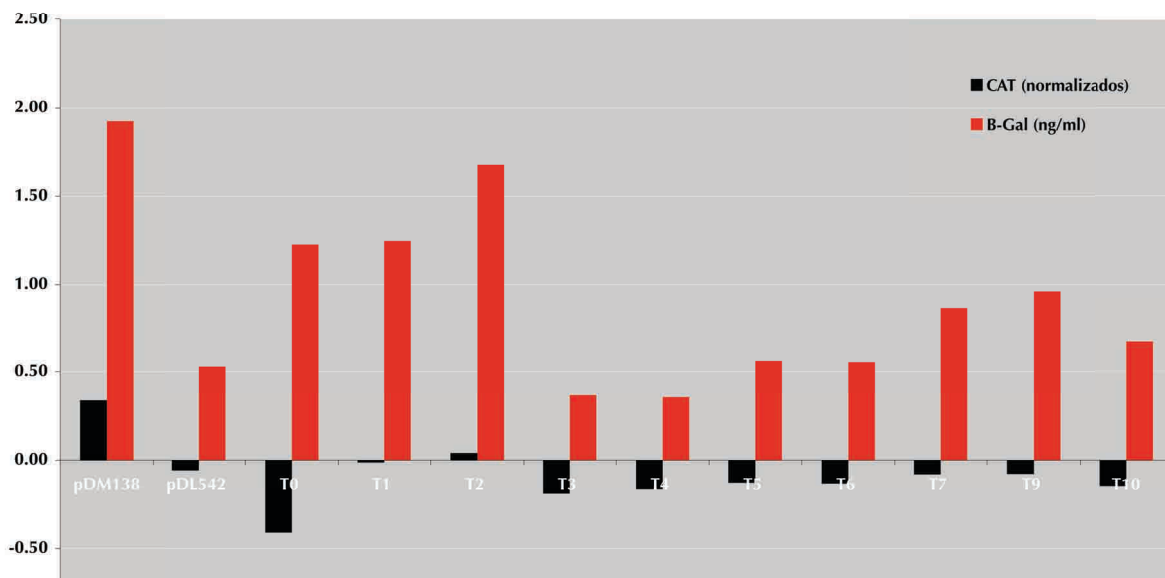
Tal como se pode observar na figura II.4.2.8, apenas as células Huh7 transfectadas com o vector pDM138-PRE(+), que possui o PRE do HBV na mesma orientação da ORF da proteína repórter, apresentam valores médios de CAT significativamente superiores aos observados com o vector parental. Por outro lado, células transfectadas com o PRE do HBV inserido na orientação inversa à da sequência que codifica para a proteína CAT, pDM138-PRE(-)



apresentam valores médios de expressão da proteína repórter semelhantes aos obtidos com o vector pDM138 sem nenhum sinal de exportação nuclear. Estes resultados mostram que a inserção de um sinal de exportação nuclear funcional e na orientação correcta no plasmídeo pDM138 causa um aumento significativo na expressão da proteína CAT.

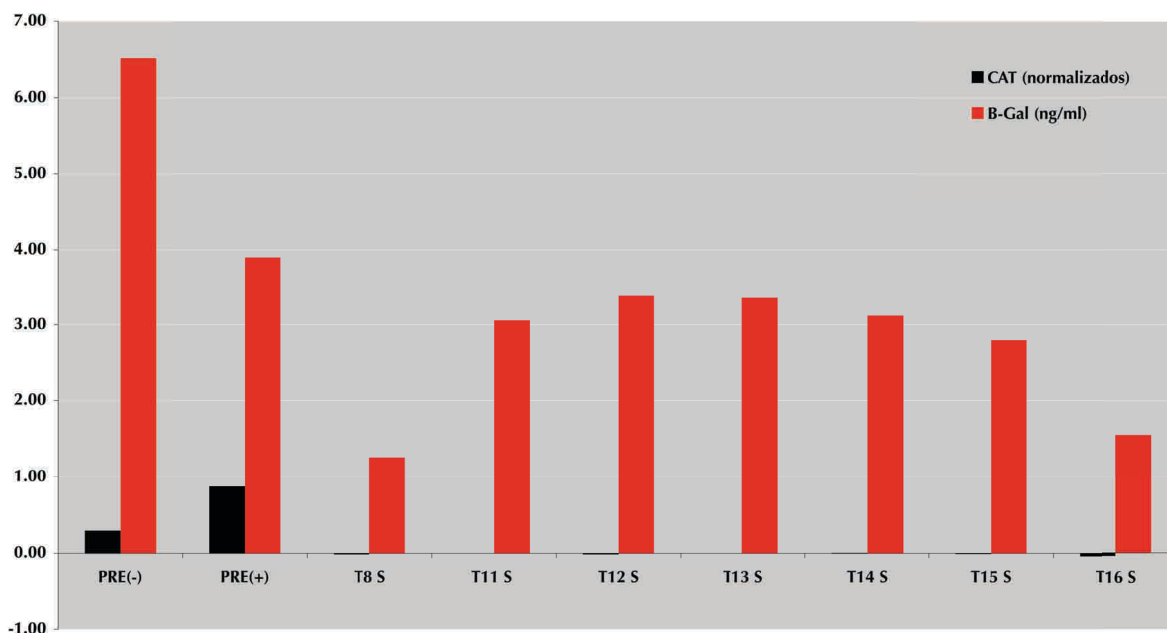
Os ensaios do tipo ELISA, realizados para quantificação dos níveis da proteína repórter nos extractos de células Huh7 transfectadas com as 36 construções derivadas do vector pDM138, mostraram que as sequências de RNA do HDV testadas são incapazes de promover um aumento na expressão da CAT superior ao registado com os vectores pDM138 sem nenhum elemento de transporte ou com o PRE(-) do HBV (Figuras II.4.2.9 e II.4.2.10, barras a preto). Com efeito, não foi possível detectar a expressão da proteína repórter em células transfectadas com os vectores que codificam para o RNA genómico do HDV. Verificou-se contudo, que as células foram eficazmente transfectadas, dado que todos os extractos celulares ensaiados apresentam níveis de  $\beta$ -Gal mensuráveis (Figuras II.4.2.9 e II.4.2.10, barras a vermelho).

VALORES MÉDIOS DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CAT E B-Gal



**Figura II.4.2.9.** Valores médios de expressão da proteína CAT em extractos de células Huh7 transfectadas com os vectores pDM138, pDM138-pDL542, pDM138-T0 a T7 e pDM138-T9 a T10, que codificam para as sequências completa ou parciais do RNA genómico do HDV. Para efeitos de normalização da eficiência da transfecção, as células Huh7 foram co-transfectadas com o plasmídeo pSV- $\beta$ -Galactosidase. Os níveis da expressão da proteína CAT foram quantificados por ELISA e normalizados, dividindo os valores de concentração determinados para a proteína CAT pela concentração calculada para a  $\beta$ -Gal. Os valores normalizados da proteína CAT e a concentração média de  $\beta$ -Gal apresentados correspondem à média de três ensaios independentes.

## VALORES MÉDIOS DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CAT E B-Gal



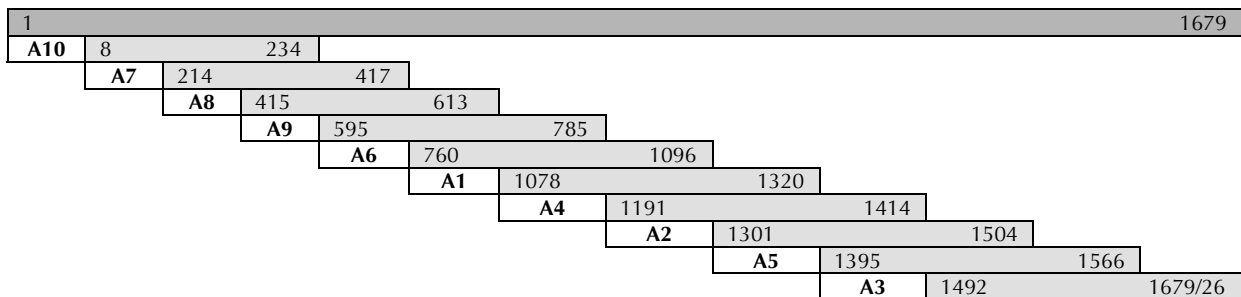
**Figura II.4.2.10.** Valores médios de expressão da proteína repórter CAT em extractos de células Huh7 transfectadas com os vetores pDM138-PRE(-), pDM138-PRE(+), pDM138-T8 e pDM138-T11 a T16, que codificam para sequências parciais do RNA genómico do HDV. Para efeitos de normalização da eficiência da transfecção, as células Huh7 foram co-transfectadas com o plasmídeo pSV- $\beta$ -Galactosidase. Os níveis de expressão da proteína CAT foram quantificados por ELISA e normalizados, dividindo os valores de concentração determinados para a proteína CAT pela concentração calculada para a  $\beta$ -Gal. Os valores normalizados da proteína CAT e a concentração média de  $\beta$ -Gal apresentados correspondem à média de três ensaios independentes.

Obtiveram-se resultados muito semelhantes quando se analisaram os níveis de expressão da proteína CAT em células transfectadas com os vetores pDM138 que codificam para a sequência completa ou subregiões do RNA antígenómico do HDV. Os valores médios da proteína CAT mostraram-se, mais uma vez, sempre abaixo dos determinados para os controlos negativos (resultados não apresentados).

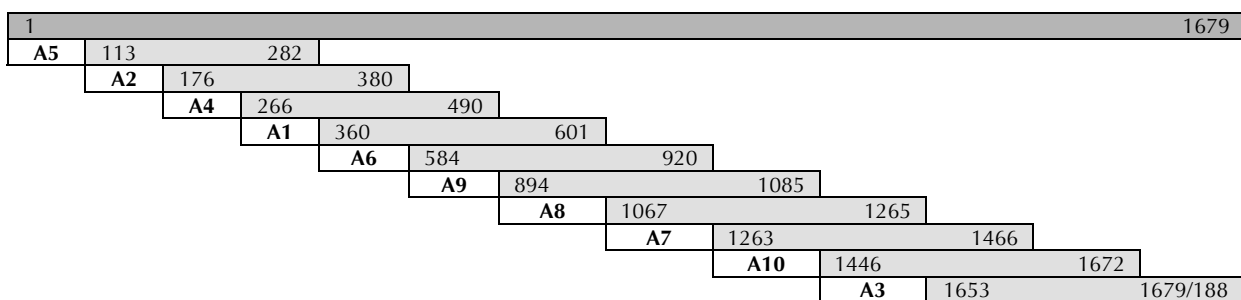
As experiências atrás descritas, mostram que nenhum dos fragmentos de cDNA do HDV analisados é capaz de induzir um aumento da expressão da proteína CAT superior ao vector parental e ao controlo negativo, pDM138-PRE(-). Estes resultados parecem indicar que os RNAs do HDV não possuem quaisquer elementos *cis* capazes de mediar a exportação nuclear de mRNAs heterólogos com um intrão ou que eventualmente as sequências parciais analisadas não apresentam um elemento de transporte completo e funcional. Esta hipótese parece, contudo, pouco provável uma vez que dois dos fragmentos de cDNA do HDV clonados no vector pDM138 codificam para o genoma e antígenoma completo do vírus. Em alternativa, os RNAs genómico e antígenómico do HDV testados poderão conter mais do que um elemento *cis* na sua sequência nucleotídica com funções antagónicas na exportação nuclear.

### II.4.2.3 CLONAGEM DE FRAGMENTOS DE cDNA DO HDV NO VECTOR pDM138

Para evitar a presença de mais do que um elemento *cis*, possivelmente com funções opostas no transporte núcleo-citoplasmático, no mesmo fragmento de cDNA do HDV, optou-se como alternativa à estratégia baseada na inserção de um conjunto de sequências obtidas por digestão sequencial do cDNA completo do HDV pela Exo III, por clonar dez sequências mais pequenas e distintas do cDNA do HDV no único local *Clal* do plasmídeo pDM138. Os vários fragmentos com tamanhos entre os 167 e os 337 bp foram amplificados por PCR. Note-se que os fragmentos amplificados cobrem a totalidade do genoma e antigenoma do vírus (Tabelas II.4.5 e II.4.6).



**Tabela II.4.5.** Fragmentos de cDNA genómico do HDV clonados no vector pDM138. Os números indicados correspondem às sequências de RNA genómico do HDV codificadas por cada um dos fragmentos de cDNA amplificados por PCR.



**Tabela II.4.6.** Fragmentos de cDNA antigenómico do HDV clonados no vector pDM138. Os números indicados correspondem às sequências de RNA antigenómico do HDV codificadas por cada um dos fragmentos de cDNA amplificados por PCR.

Após amplificação, os produtos de PCR foram digeridos com a enzima *Clal* e clonados nas duas orientações no vector pDM138. A inserção e a orientação dos fragmentos de cDNA, foi confirmada por hidrólise enzimática com enzimas de restrição adequadas.

Obtiveram-se 20 construções derivadas do pDM138, em que cada uma codifica para uma região diferente do RNA do HDV.

Para testar a capacidade destas sequências de RNA do HDV (10 de RNA genómico e 10 de antigenómico) mediarem a exportação nuclear de moléculas de mRNA heterólogas com um intrão, transfectaram-se células Huh7. A exportação nuclear dos mRNAs, produzidos após a transfecção, foi avaliada pelos níveis de expressão da proteína repórter detectados por ELISA, tal como atrás descrito.

#### II.4.2.4 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE RNA GENÓMICO DO HDV NA EXPORTAÇÃO NUCLEAR DE mRNAs HETERÓLOGOS

Os resultados obtidos por ELISA, mostram que nenhuma das sequências de cDNA genómico do HDV inseridas no pDM138, é capaz de causar um aumento na expressão da proteína CAT tão significativo como o induzido pelo PRE do HBV, clonado na orientação correcta (Figura II.4.2.11).



**Figura II.4.2.11.** Valores médios de expressão da proteína repórter CAT em extractos de células Huh7 transfectadas com os vectores pDM138, pDM138-PRE(+), pDM138-PRE(-) e pDM138-A2 a A10, em que o cDNA do HDV foi clonado na orientação *sense*. Para efeitos de normalização da eficiência da transfecção, as células Huh7 foram co-transfectadas com o plasmídeo pSV- $\beta$ -Galactosidase. Os níveis de expressão da proteína CAT foram quantificados por ELISA e normalizados, dividindo os valores de concentração determinados para a proteína CAT pela concentração calculada para a  $\beta$ -Gal. Os valores da proteína CAT apresentados correspondem à média de três ensaios independentes.

Conforme se pode observar na figura II.4.2.11, nas células transfectadas com o vector pDM138-A9S, que contém a sequência que codifica para a ribozima do RNA genómico do vírus, não foi possível detectar a proteína repórter. Para além disso, observou-se que seis dos

vectores analisados, mostram valores de expressão inferiores ou comparáveis aos detectados em extractos de células Huh7 transfectadas com o vector pDM138 parental. Estes resultados indicam que os RNAs genómicos do HDV codificados por estes vectores são incapazes de promover a exportação nuclear de mRNAs heterólogos com intrões.

Por outro lado, em contraste com os resultados anteriores, foram detectados níveis de expressão da proteína CAT superiores aos obtidos com o pDM138 e pDM138-PRE(-), em extractos proteicos de células Huh7 transfectadas com vectores pDM138-A4S, A6S e A8S.

O vector pDM138-A4S codifica para a sequência compreendida entre os nucleótidos 1191 e 1414 do RNA genómico do HDV e o vector A6S para uma sequência adjacente no genoma do vírus, situada entre os nucleótidos 760 e 1096 (Tabela II.4.5).

De acordo com a análise da distribuição intracelular do RNA genómico do HDV por hibridação *in situ*, a digestão parcial ou completa da sequência compreendida entre os nucleótidos 1211 a 1487 pela Exo III causa uma redução de 40 a 50% na percentagem de células com marcação citoplasmática específica para o RNA do HDV (Figura II.4.1.2, Tabela II.4.1 e resultados não apresentados). Estes resultados, em conjunto com os valores de proteína CAT detectados por ELISA para o vector pDM138-A4S parecem indicar um possível papel para a sequência compreendida entre os nucleótidos 1191 e 1414 do RNA genómico do HDV na exportação nuclear.

A análise da distribuição intracelular dos mutantes de deleção do RNA genómico do HDV mostrou ainda que a deleção simultânea das sequências compreendidas entre os nucleótidos 1211 e 1487 (mutantes de deleção T4 e T7) e 476 e 512 (mutantes de deleção T15 a T16) causa uma redução ainda mais evidente no número de células que exhibe um padrão citoplasmático de distribuição do RNA do vírus (Figura II.4.1.2, Tabela II.4.1 e resultados não apresentados). Curiosamente, a sequência situada entre os nucleótidos 476 e 512 faz parte do fragmento de cDNA do HDV clonado no vector pDM138-A8S (nt 415 a 613), para o qual foram detectados níveis intermédios de expressão da proteína CAT. Estes resultados, apesar de não poderem ser considerados conclusivos, sugerem a presença de sequências específicas para exportação no RNA genómico do HDV.

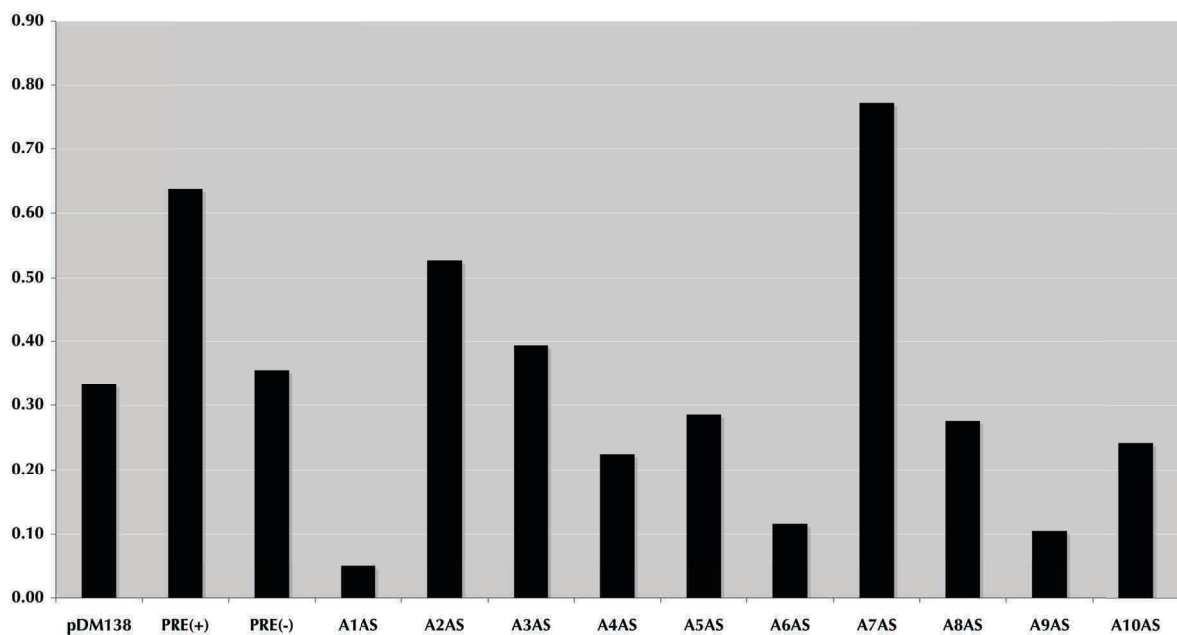
#### **II.4.2.5 O RNA ANTIGENÓMICO DO HDV POSSUI UM ELEMENTO CIS FUNCIONALMENTE EQUIVALENTE AO PRE DO HBV**

Após a análise do RNA genómico do HDV utilizou-se a mesma abordagem para investigar a presença de sinais de exportação no RNA antigenómico do vírus. Para isso, células Huh7

foram transfectadas com as construções derivadas do pDM138 que codificam para sequências do RNA antigenómico do HDV e os níveis de expressão da proteína repórter foram quantificados por ELISA.

De acordo com os resultados obtidos o antigenoma do HDV possui uma sequência compreendida entre os ribonucleótidos 1263 e 1466, designada de A7AS, que constitui um forte activador da expressão da proteína CAT, o que sugere a presença de um elemento de exportação no RNA antigenómico do vírus (Figura II.4.2.12).

VALORES MÉDIOS DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CAT



**Figura II.4.2.12.** Valores médios de expressão da proteína repórter CAT em extractos de células Huh7 transfectadas com os vetores pDM138, pDM138-PRE(+), pDM138-PRE(-) e pDM138-A2AS a A10AS, em que o cDNA do HDV foi clonado na orientação antisense. Para efeitos de normalização da eficiência da transfecção, as células Huh7 foram co-transfectadas com o plasmídeo pSV- $\beta$ -Galactosidase. Os níveis de expressão da proteína CAT foram quantificados por ELISA e normalizados, dividindo os valores de concentração determinados para a proteína CAT pela concentração calculada para a  $\beta$ -Gal. Os valores de proteína CAT apresentados correspondem à média de três ensaios independentes.

Tal como se pode observar na figura II.4.2.12, células Huh7 transfectadas com o vector pDM138-A7AS apresentam níveis de expressão da proteína repórter comparáveis aos registados para o PRE do HBV. Foi registado um aumento de cerca de 2 vezes na expressão da proteína CAT para os vetores pDM138-A7AS e pDM138-PRE(+) em relação aos vetores pDM138 parental e pDM138-PRE(-). Com excepção das sequências A7AS e A2AS, todas as outras mostraram-se incapazes de promover o transporte núcleo-citoplasmático de mRNAs

heterólogos com intrões, apresentando valores médios de CAT comparáveis ou inferiores aos dos controlos negativos. Em relação ao vector pDM138-A2AS, registaram-se valores médios de proteína CAT situados entre os observados para os controlos positivo e negativo.

A actividade da sequência identificada no antigenoma do HDV na exportação nuclear parece depender, à semelhança do PRE do HBV, da orientação em relação à ORF da proteína repórter. De acordo com as figuras II.4.2.11 e II.4.2.12, apenas as células transfectadas com o vector que codifica para a sequência de 1263 a 1466 do RNA antigenómico do HDV (A7AS) e não a sua complementar (A7S) apresentam valores de proteína CAT semelhantes aos obtidos com o controlo positivo pDM138-PRE(+).

#### **II.4.2.6 A EXPORTAÇÃO NUCLEAR DE mRNAs REPÓRTER MEDIADA PELO MOTIVO A7AS É SENSÍVEL À LEPTOMICINA**

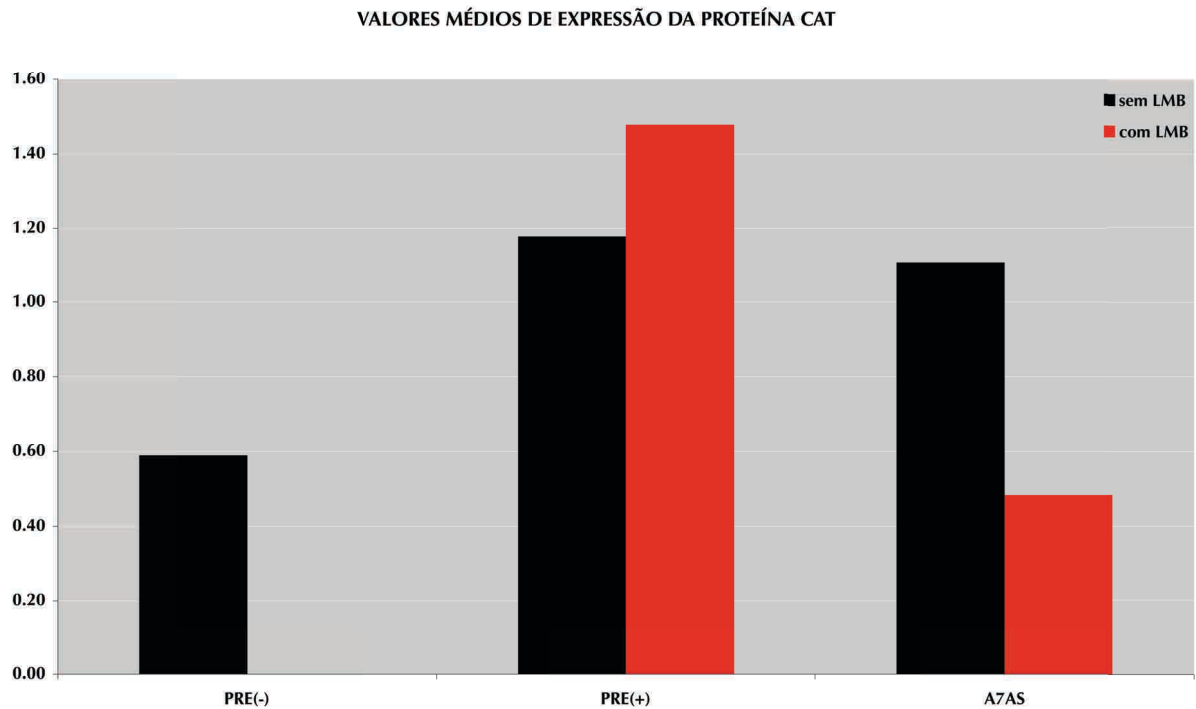
Vários RNAs celulares, bem como os mRNAs com intrões codificados pelo vírus HIV-1, utilizam a exportina CRM1 para mediar a sua exportação para o citoplasma das células. No caso do HIV-1, a exportação nuclear depende da presença de uma sequência com estrutura complexa, designada de RRE, situada no intrão do gene *env* e da proteína Rev. Esta proteína serve de adaptador entre os mRNAs que possuem RRE e a exportina CRM1. A interacção da proteína Rev com a CRM1 é mediada por um sinal de exportação nuclear (NES) rico em resíduos de leucina, presente na extremidade carboxílica da proteína (Askjaer *et al.*, 1998). Por outro lado, a exportação nuclear da maioria dos mRNAs celulares e a actividade do PRE do HBV é independente da CRM1 (Otero *et al.*, 1998; Zang and Yen, 1999).

Estudos anteriores mostraram que a leptomicina B (LMB) constitui um forte inibidor, específico da actividade da CRM1, podendo ser utilizada para investigar a participação desta exportina na exportação nuclear de RNAs e proteínas (Kudo *et al.*, 1999).

Para averiguar se a CRM1 intervém na via de exportação nuclear do RNA antigenómico do HDV, numa primeira abordagem analisou-se o efeito da LMB na expressão da proteína CAT em células Huh7 transfectadas com o vector pDM138-A7AS. Para isso, as células Huh7 foram tratadas com 10 nM LMB durante 24 horas após a transfecção. Como controlo negativo da acção da LMB na exportação nuclear utilizou-se o vector pDM138-PRE(+).

Os valores médios de proteína CAT registados na ausência de LMB confirmam os resultados anteriores em que a sequência compreendida entre 1263 e 1466 do RNA antigenómico do HDV possui um elemento de exportação nuclear capaz de induzir o transporte núcleo-citoplasma de RNAs, que normalmente ficariam retidos no núcleo. De acordo com a figura

II.4.2.13, a actividade do PRE do HBV não é inibida na presença de LMB, verificando-se mesmo um ligeiro aumento dos níveis médios de expressão da proteína CAT na presença de 10 nM de antibiótico. Este efeito da LMB na exportação nuclear mediado pelo PRE do HBV foi anteriormente descrito em estudos que quantificaram as variações na expressão da proteína CAT através de métodos que medem a sua actividade enzimática (Otero *et al.*, 1998).



**Figura II.4.2.13.** Valores médios de expressão da proteína repórter CAT em extractos de células Huh7 transfectadas com os vectores pDM138-PRE(-), pDM138-PRE(+) e pDM138-A7AS na ausência e presença de 10 nM de LMB. Para efeitos de normalização da eficiência da transfecção, as células Huh7 foram co-transfectadas com o plasmídeo pSV- $\beta$ -Galactosidase. Os níveis de expressão da proteína CAT foram quantificados por ELISA e normalizados, dividindo os valores de concentração determinados para a proteína CAT pela concentração calculada para a  $\beta$ -Gal. Os valores de proteína CAT apresentados correspondem à média de três ensaios independentes.

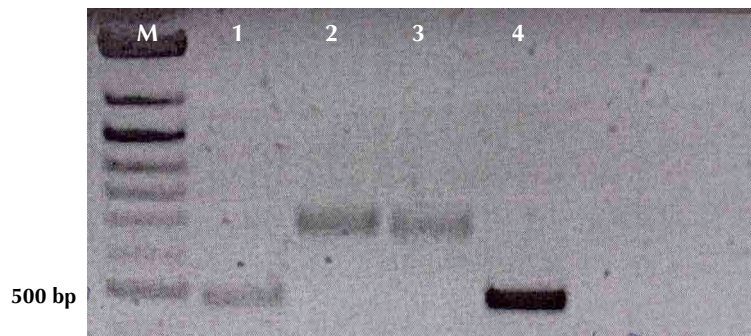
Em oposição, verificou-se que a actividade do elemento de exportação do HDV é afectada na presença de LMB. Registou-se uma diminuição de aproximadamente 50% nos valores médios da proteína CAT em extractos de células Huh7 transfectadas com o pDM138-A7AS na presença de 10 nM de LMB (Figura II.4.2.13). Os resultados, obtidos no sistema repórter utilizado, mostram que a exportação nuclear mediada pelo elemento identificado no antigenoma do HDV é dependente da CRM1 e sugerem um possível envolvimento desta exportina na exportação do RNA do HDV.

#### **II.4.2.7 O AUMENTO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CAT RESULTA DA PRESENÇA DE mRNAs REPÓRTER NO CITOPLASMA**

A quantificação dos níveis de expressão transitória da proteína CAT constitui um método indirecto de medição da acumulação de mRNAs com intrões, no citoplasma das células. Com o objectivo de averiguar se o aumento observado na expressão da proteína repórter, em extractos de células Huh7 transfectadas com o pDM138-A7AS, resulta da acumulação de mRNAs repórter com um intrão no citoplasma, realizaram-se ensaios de *Northern blot*. Para isso, as células Huh7 foram transfectadas com o vector pDM138-A7AS e após 48 horas foi extraído o mRNA total e citoplasmático.

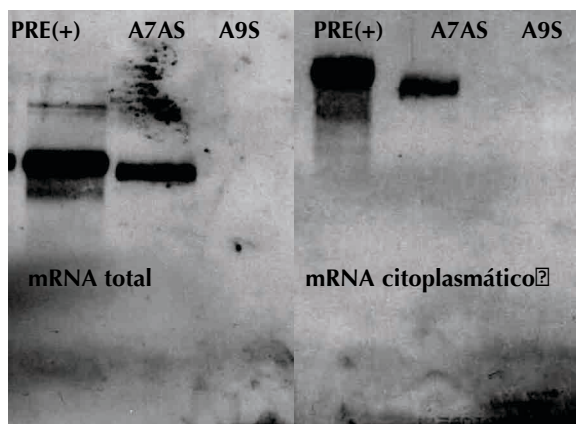
Como controlos, transfectaram-se células Huh7 com os vectores pDM138-PRE(+) e pDM138-A9S. A função do PRE do HBV na exportação nuclear encontra-se bem estudada, tendo sido por diversas vezes demonstrado que este elemento promove a exportação e acumulação citoplasmática de moléculas de mRNA, incluindo as produzidas a partir do vector repórter pDM138 (Huang and Liang, 1993; Huang and Yen, 1995; Zang and Yen, 1999). O plasmídeo pDM138-A9S, por sua vez, foi utilizado como controlo negativo. Recorde-se que o vector pDM139-A9S codifica para a ribozima do RNA genómico do HDV e que em células transfectadas com esta construção não foi possível detectar a proteína repórter (Figura II.4.2.11).

Após extracção, as fracções de mRNA totais e citoplasmáticas foram separadas por electroforese em condições desnaturantes, e transferidas para membranas de nylon. A detecção dos mRNAs repórter contendo a ORF da proteína CAT inserida no intrão foi efectuada por hibridação do mRNA imobilizado na membrana com uma sonda de DNA de cadeia simples marcada com digoxigenina-11-dUTP por PCR assimétrico. A sonda utilizada nos ensaios de *Northern blot* é complementar à sequência de RNA que codifica para a proteína CAT, hibridando apenas com os mRNAs heterólogos com a ORF da proteína CAT inserida no intrão. A incorporação da dig-11-dUTP nas moléculas de DNA foi confirmada por comparação do padrão de migração em gel de agarose do DNA amplificado na presença de dig-11-dUTP com um produto de PCR idêntico, originado na ausência do nucleótido modificado. Tal como se pode observar na Figura II.4.2.14, os produtos da amplificação por PCR na presença de dig-11-dUTP migram mais lentamente do que moléculas de DNA não marcadas com dimensões idênticas (comparar as colunas 2 e 3 com as colunas 1 e 4).



**Figura II.4.2.14.** Análise por electroforese em gel de agarose a 1% da sonda de DNA marcada com dig-11-dUTP por PCR assimétrico. Em 1, 2 e 3 pode-se observar o produto de amplificação por PCR assimétrico na ausência (coluna nº1) e presença de dig-11-dUTP (colunas nº2 e 3). A coluna nº4 corresponde ao produto obtido numa reacção de amplificação por PCR convencional, em que os primers *forward* e *reverse* foram adicionados em quantidades equimolares. À esquerda encontra-se o perfil electroforético de uma mistura de DNAs de cadeia simples, cujas dimensões são conhecidas.

A figura II.4.2.15 representa um resultado típico de hibridação do mRNA produzido a partir dos vectores pDM138-PRE(+), pDM138-A7AS e pDM138-A9S, em extractos celulares totais e citoplasmáticos, por *Northern blot*.



**Figura II.4.2.15.** Detecção por *Northern blot* do mRNA repórter nas fracções de mRNA totais e citoplasmáticas de células Huh7 transfectadas com os vectores pDM138-PRE(+), pDM138-A7AS e pDM138-A9S. Após transferência para membranas de nylon, os mRNAs de cada uma das fracções foram hibridados com uma sonda de DNA marcada com dig-11-dUTP. As sequências alvo foram detectadas por quimioluminescência, após incubação das membranas com um anticorpo anti-Dig conjugado com peroxidase.

Conforme esperado foi possível detectar a presença de mRNA que codifica para a CAT nas fracções de mRNA totais e citoplasmáticas de células transfectadas com o pDM138-PRE(+) e pDM138-A7AS. De acordo com a figura II.4.2.15, as células transfectadas com o vector pDM138-PRE(+) apresentam uma maior quantidade de mRNA com intrão no citoplasma do

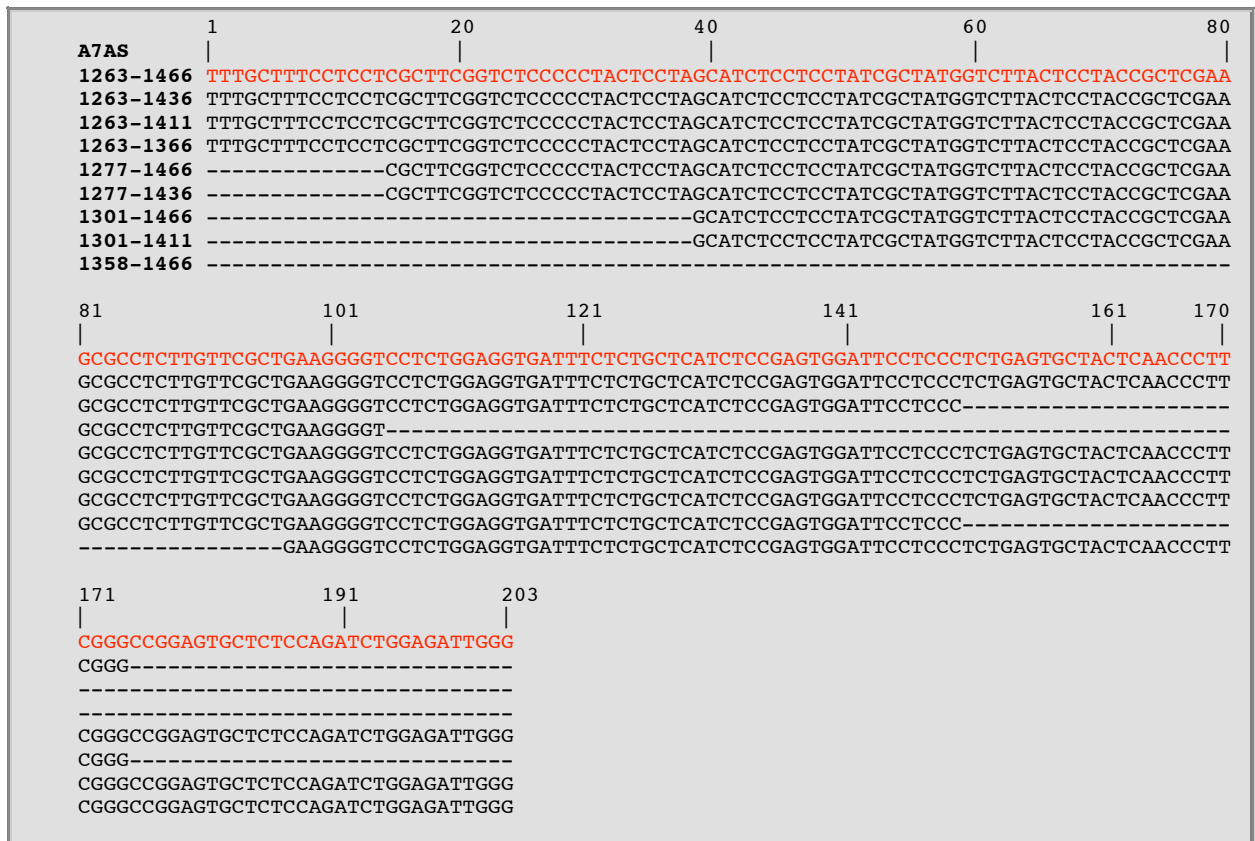
que células transfectadas com o pDM138-A7AS. Verificou-se uma variação semelhante na quantidade de mRNA quando se analisaram as fracções de mRNA totais, sugerindo que as diferenças observadas na quantidade de mRNA citoplasmático entre as células transfectadas com o pDM138-A7AS e o controlo positivo traduzem variações na eficiência de transfecção entre os ensaios e não a diferenças na capacidade de exportação dos RNAs. Em células transfectadas com o vector pDM138-A9S, não foi possível detectar a presença de mRNAs que codificam para a proteína CAT em nenhuma das fracções celulares analisadas. É de salientar que os resultados de *Northern blot* para o pDM138-A9S são compatíveis com os resultados obtidos por ELISA, em que se verificou ausência de expressão da proteína repórter. Estes resultados sugerem que a ausência de expressão da proteína CAT nas células transfectadas com o vector pDM138-A9S resulta da incapacidade dos mRNAs repórter serem exportados para o citoplasma, e provavelmente devido à presença de uma sequência com actividade autocatalítica são degradados logo após a síntese no núcleo.

A quantificação do mRNA que codifica para a CAT em extractos totais e citoplasmáticos por *Northern blot* veio confirmar que o aumento na expressão da proteína CAT observado em células transfectadas com o vector pDM138-A7AS resulta da exportação e acumulação de mRNAs repórter no citoplasma, em virtude da presença de um sinal para exportação na sequência de 1263 a 1466 do antígenoma do HDV.

#### **II.4.2.8 ANÁLISE DETALHADA DA SEQUÊNCIA DO ANTIGENOMA DO HDV NECESSÁRIA PARA PROMOVER A EXPORTAÇÃO NUCLEAR**

Tendo-se demonstrado a presença de um motivo de exportação nuclear na sequência de 1263 a 1466 do RNA antígenómico do HDV (A7AS) procedeu-se, de seguida, a uma análise mais detalhada da sequência do RNA antígenómico do HDV necessária para substituir funcionalmente o PRE do HBV nos ensaios de exportação nuclear com o plasmídeo pDM138. Para isso, clonaram-se oito formas truncadas da sequência A7AS no local de corte *Clal* do vector pDM138. Dos vectores recombinantes obtidos, seleccionaram-se apenas os que codificam para RNAs do HDV de polaridade antígenómica. Os vectores pDM138 com cDNA do HDV na orientação pretendida, foram seleccionados por hidrólise enzimática com as enzimas de restrição adequadas. A capacidade destas sequências promoverem a exportação nuclear de mRNAs heterólogos com intrões foi testada por medição da expressão da proteína CAT após transfecção. Na figura II.4.2.16 apresentam-se as oito sequências truncadas dos

cDNAs clonadas no vector pDM138, que codificam para RNAs antigenômicos do HDV, alinhadas em relação à sequência A7AS.



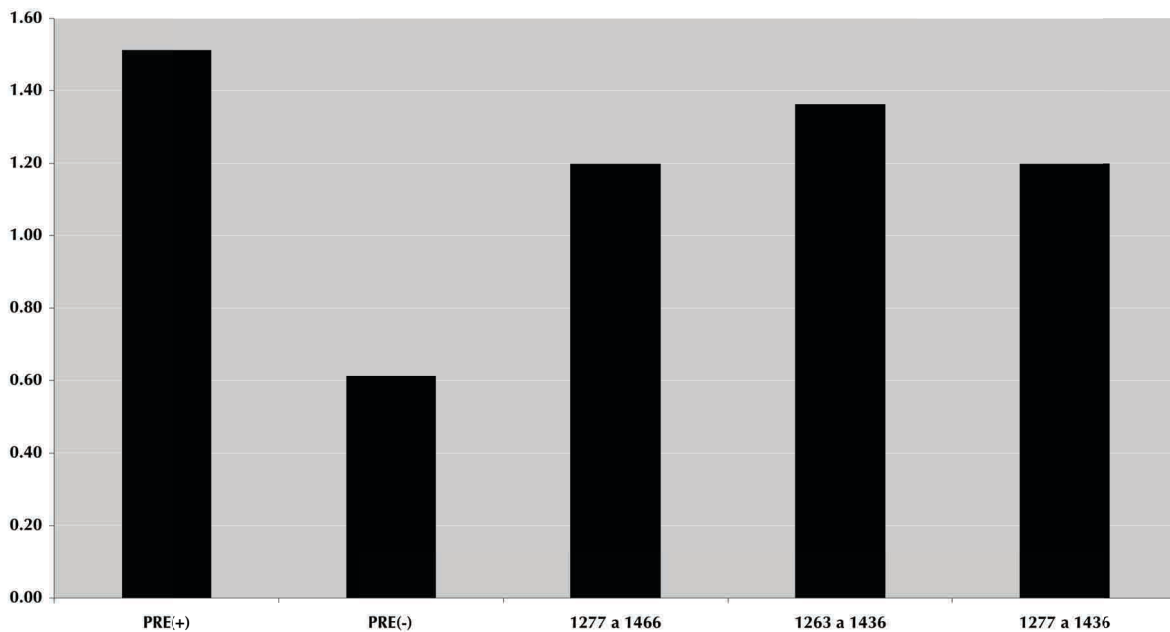
**Figura II.4.2.16.** Sequências nucleotídicas dos cDNAs do HDV que codificam para oito versões mais pequenas do sinal de exportação, situado entre os nucleótidos 1263 a 1466 do antigenoma do vírus.

Os valores médios da expressão da proteína CAT obtidos com as novas construções mostram que os últimos 14 e 30 nucleótidos das extremidades 5' e 3', respectivamente, da sequência compreendida entre os nucleótidos 1263 a 1466 do RNA antigenômico do HDV, não são necessários para a exportação nuclear dos mRNAs repórter produzidos a partir do vector pDM138 (Figura II.4.2.17). As sequências que compreendem os nucleótidos 1277 a 1466 e 1263 a 1436 do RNA antigenômicos do HDV, induzem um aumento na expressão da proteína CAT comparável ao registado para o PRE(+) do HBV. Estes resultados mostram que os nucleótidos 5' e 3' terminais do sinal de exportação identificado no antigenoma do HDV são dispensáveis para a sua função, sugerindo que a sequência compreendida entre os nucleótidos 1277 a 1436 do RNA antigenômico do vírus é suficiente para promover a acumulação citoplasmática de mRNAs heterólogos com um intrão. De acordo com esta hipótese, verificou-se que células Huh7 transfectadas com a construção que codifica para a sequência



compreendida entre os nucleótidos 1277 a 1436 do RNA antigenómico do HDV, apresentam um valor médio expressão da proteína CAT semelhante ao registado para os vectores pDM138-(1263-1436) e pDM138-(1277-1466). Estes resultados indicam que a sequência de 1277 a 1436 do RNA antigenómico do HDV é suficiente para substituir funcionalmente o PRE do HBV no sistema repórter pDM138, constituindo possivelmente a sequência de RNA mínima que define o sinal de exportação nuclear do antigenoma do HDV. □

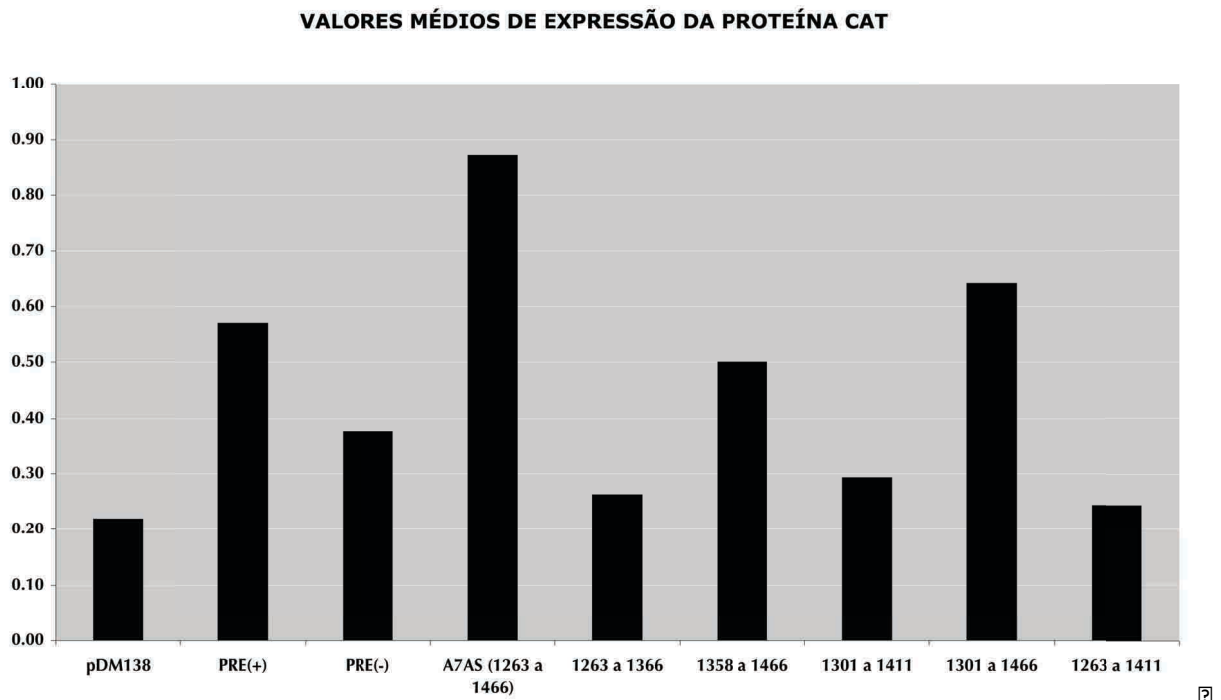
VALORES MÉDIOS DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CAT



**Figura II.4.2.17.** Valores médios de expressão da proteína repórter em extractos de células Huh7 transfectadas com os vectores pDM138-PRE(+), pDM138-PRE(-), pDM138-1277-1466(AG), pDM138-1263-1436(AG) e pDM138-1277-1436(AG). Para efeitos de normalização da eficiência da transfecção o plasmídeo pSV- $\beta$ -Galactosidase foi incluído em todos os ensaios. Os níveis de expressão da proteína CAT foram quantificados por ELISA e normalizados, dividindo os valores de concentração determinados para a proteína CAT pela concentração calculada para a  $\beta$ -Gal. Os valores de CAT apresentados correspondem à média de três ensaios independentes.

No que diz respeito às restantes formas truncadas do elemento de exportação do antigenoma do HDV, verificou-se que nenhuma mostrou ser tão eficiente quanto a sequência completa (A7AS) no aumento da expressão da proteína repórter (Figura II.4.2.18). As sequências compreendidas entre os nucleótidos 1358 e 1466 e 1301 e 1466 causam um aumento na expressão da proteína CAT muito aproximado ao registado para o PRE do HBV clonado na orientação correcta. Note-se contudo, que os valores médios da proteína CAT obtidos para estas sequências são cerca de 30 a 45% inferiores aos observados com a sequência completa do sinal de exportação do RNA antigenómico do HDV. Neste ensaio, a variação na expressão da proteína CAT em células Huh7 transfectadas com o vector pDM138-A7AS, em relação ao

vector parental vazio, foi cerca de 1.5 vezes superior à registada para o PRE do HBV orientado correctamente.



**Figura II.4.2.18.** Valores médios de expressão da proteína repórter CAT em extractos de células Huh7 transfectadas com os vectores pDM138, pDM138-PRE(+), pDM138-PRE(-), pDM138-A7AS, pDM138-1263-1366(AG), pDM138-1358-1466(AG), pDM138-1301-1411(AG), pDM138-1301-1466(AG) e pDM138-1263-1411(AG). Para efeitos de normalização da eficiência da transfecção, o plasmídeo pSV- $\beta$ -Galactosidase foi incluído em todos os ensaios. Os níveis de expressão da proteína CAT foram quantificados por ELISA e normalizados, dividindo os valores de concentração determinados para a proteína CAT pela concentração calculada para a  $\beta$ -Gal. Os valores de CAT apresentados correspondem à média de três ensaios independentes.

As restantes sequências analisadas, compreendidas entre os nucleótidos 1263 e 1411, 1263 e 1366 e 1301 e 1411 do RNA antigenómico do HDV, são menos eficientes na exportação nuclear, uma vez que as quantidades de proteína CAT detectadas por ELISA são similares às observadas para os controlos negativos. O facto das sequências compreendidas entre os nucleótidos 1301 e 1466, 1277 e 1436 do RNA antigenómico do HDV induzirem um aumento significativo na expressão da proteína CAT, parece indicar que a sequência situada entre os nt 1301 a 1346 corresponde à região mais pequena do RNA antigenómico do HDV capaz de substituir funcionalmente o PRE do HBV no sistema repórter pDM138. No entanto, os nucleótidos situados entre as posições 1277 a 1301 parecem contribuir de alguma forma para a actividade do sinal de exportação, uma vez que a remoção desta sequência causa uma diminuição da expressão da proteína CAT comparativamente aos valores obtidos em células transfectadas com o vector pDM138-A7AS.

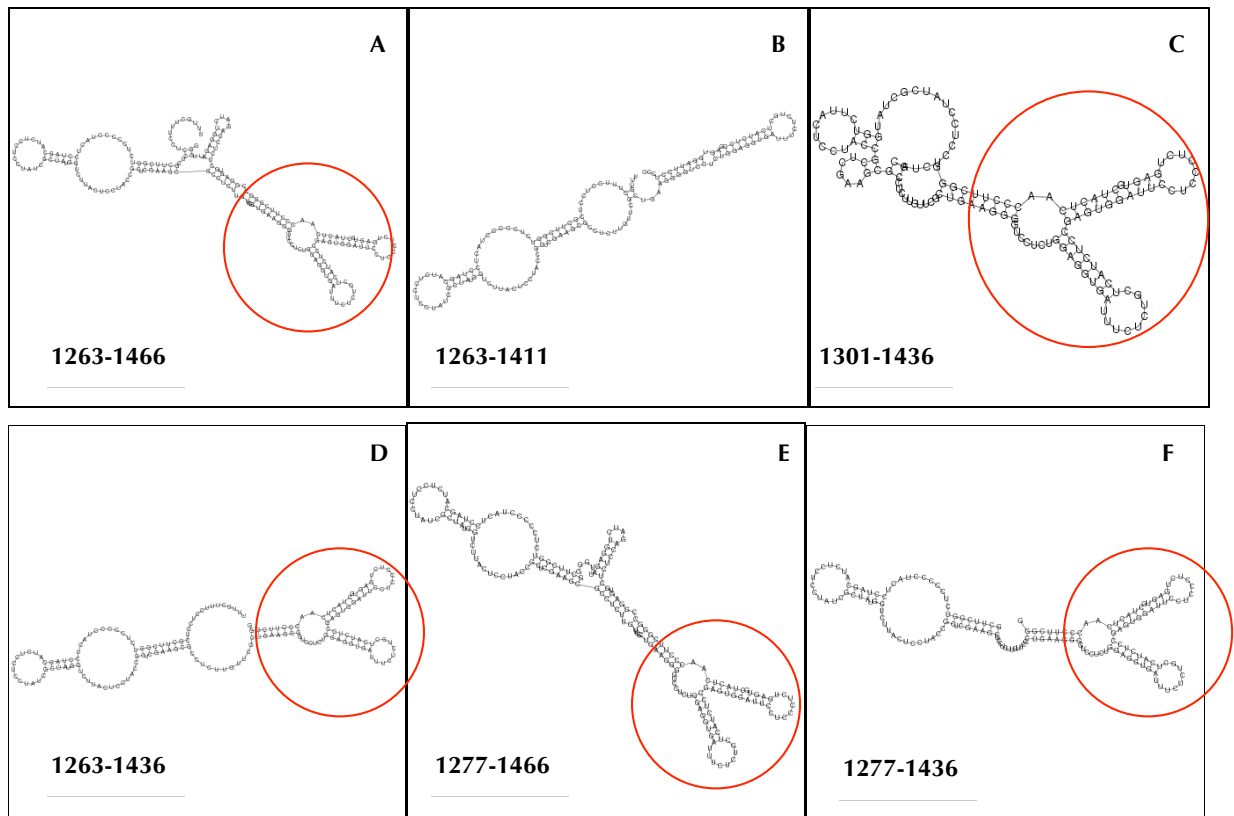
### II.4.3 A SEQUÊNCIA COMPREENDIDA ENTRE OS NUCLEÓTIDOS 1263 A 1466 ALTERA A DISTRIBUIÇÃO INTRACELULAR DO ANTIGENOMA DO HDV

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de transfecção transitória com o vector pDM138 e *northern blot* pode-se concluir que o RNA antigenómico do HDV possui um elemento *cis* que desempenha funções pós-transcricionais semelhantes ao PRE do HBV na acumulação de mRNAs com intrões no citoplasma. A actividade pós-transcricional do elemento de exportação do HDV (NEE) é independente das proteínas codificadas pelo vírus, tal como o PRE do HBV.

Apesar dos resultados obtidos indicarem que NEE do antigenoma do HDV é capaz de substituir funcionalmente o PRE do HBV no sistema repórter pDM138, desconhece-se o seu papel na exportação nuclear do RNA antigenómico do vírus. Para averiguar a eventual participação do NEE na exportação nuclear dos RNAs antigenómicos do HDV utilizou-se o plasmídeo pDL481. Este vector codifica exclusivamente moléculas de RNA antigenómico do HDV (Lazinski and Taylor, 1994) que na ausência dos HDAGs são detectadas simultaneamente no núcleo e citoplasma das células (Tavanez *et al.*, 2002). A análise funcional do motivo de exportação foi realizada por deleção da sequência que codifica o NEE do pDL481, seguida da transfecção de células Huh7 com o vector resultante, o pDL481 $\Delta$ NEE.

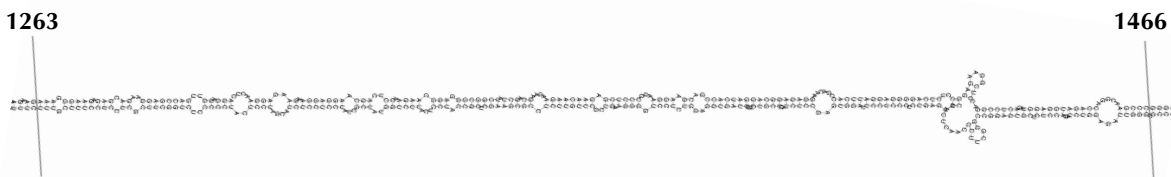
Utilizando uma interface da internet ([www.tbi.univie.ac.at/~ivo/RNA/](http://www.tbi.univie.ac.at/~ivo/RNA/)) que permite fazer predições da estrutura secundária de sequências de RNA, verificou-se que o NEE analisado isoladamente apresenta uma estrutura secundária complexa com vários *hairpins* (Figura II.4.3.1 A). Na tentativa de estabelecer uma relação entre a estrutura secundária prevista para o sinal de exportação identificado no antigenoma do HDV e a sua actividade, fizeram-se predições da estrutura secundária das oito sequências truncadas do sinal de exportação, anteriormente testadas por ELISA. Verificou-se, curiosamente, que as sequências truncadas capazes de induzir um aumento na expressão da proteína CAT semelhante ao PRE do HBV, possuem um motivo estrutural constituído por uma região de RNA de cadeia dupla que bifurca em duas mini-hélices. As duas mini-hélices, assinaladas em A, C, D e F da figura II.4.3.1 com um círculo a vermelho, são formadas por dois *stems* com 8 e 10 bp e duas ansas com 10 nucleótidos. Este motivo estrutural parece ser importante para a actividade do sinal de exportação. Deleções na sequência compreendida entre os nucleótidos 1263 e 1466 do RNA antigenómico que impossibilitam a formação desta estrutura, resultam na perda de função do sinal de exportação

nuclear, tal como observado nos ensaios de CAT-ELISA. Na figura II.4.3.1 B encontra-se representada a estrutura secundária prevista para uma das sequências truncadas considerada defectiva na exportação nuclear de mRNAs heterólogos com um intrão produzidos a partir do vector pDM138. Para esta sequência não se prevê a formação das duas mini-hélices presentes em todas as sequências de RNA antigenómico do HDV funcionais na exportação nuclear no sistema pDM138.



**Figura II.4.3.1.** Estruturas secundárias previstas para seis sequências compreendidas entre os nucleótidos 1263 e 1466, 1263 e 1411, 1301 e 1436, 1263 e 1436, 1277 e 1466, e 1277 e 1436 do RNA antigenómico do HDV. O círculo a vermelho aponta para as duas mini-hélices necessárias para a actividade do sinal de exportação do RNA antigenómico do HDV.

Contudo, as previsões informáticas para a sequência completa do RNA antigenómico do HDV sugerem uma conformação diferente para o sinal de exportação. No contexto do RNA antigenómico completo, o sinal de exportação identificado situa-se na região central de cadeia dupla da estrutura de bastonete do antigenoma do HDV, para a qual não se prevêem bifurcações, exceptuando a presença de duas mini-hélices com 2 e 3 bp de comprimento (Figura II.4.3.2).



**Figura II.4.3.2.** Estrutura secundária prevista para o sinal de exportação identificados (nucleótidos 1263 a 1466) na sequência completa do RNA antigênomico do HDV.

Estes dados podem sugerir que a sequência que, por complementaridade de bases, emparelha com o sinal de exportação nuclear, está também envolvida no transporte do RNA antigênomico do núcleo para o citoplasma.

Tendo em conta as previsões feitas para a estrutura secundária do NEE construíram-se mais dois mutantes de deleção do plasmídeo pDL481, o pDL481 $\Delta$ NEE $\delta$  e o pDL481 $\Delta$  $\delta$ . O plasmídeo pDL481 $\Delta$ NEE $\delta$  codifica para o RNA antigênomico do HDV sem o elemento de exportação (nt 1263 a 1466) e sem a sequência prevista de formar emparelhamentos intramoleculares com o NEE (nt 301 a 507), enquanto a construção pDL481 $\Delta$  $\delta$  codifica para um mutante do RNA antigênomico do vírus, apenas sem a sequência que emparelha com o referido sinal de exportação.

Os RNAs produzidos pelo vector pDL481 $\Delta$ NEE $\delta$ , de acordo com as ferramentas informáticas utilizadas, formam uma estrutura de bastonete sem ramificações, semelhante à conformação assumida pelas moléculas de RNA antigênomico do tipo selvagem. Deste modo foi possível estudar o papel da sequência identificada, utilizando o sistema repórter pDM138, na exportação nuclear do RNA antigênomico do HDV, preservando-se a conformação mais provável para RNA do vírus. Os RNAs antigênicos mutantes produzidos a partir dos plasmídeos pDL481 $\Delta$ NEE e pDL481 $\Delta$  $\delta$ , formam uma estrutura de bastonete interrompida numa pequena extensão da sequência por mini-hélices que ramificam da região de RNA de cadeia dupla (resultados não apresentados).

Os vectores construídos foram utilizados para transfectar células Huh7 e a distribuição intracelular dos RNAs sintetizados foi comparada com a do RNA antigênomico do tipo selvagem. No caso do NEE estar envolvido na exportação nuclear do antigenoma do HDV, seria natural registar-se uma alteração na distribuição intracelular dos RNAs mutantes em relação ao RNA do tipo selvagem, verificando-se uma acumulação no núcleo das células.

Nas transfecções utilizou-se ainda o plasmídeo pDL542, que codifica para o RNA genómico do HDV, o qual se localiza tanto no núcleo como no citoplasma das células. Recorde-se que, utilizando o sistema repórter pDM138, não foi possível identificar nenhum elemento *cis* no

genoma do HDV tão forte quanto o NEE do RNA antigenómico na exportação nuclear de mRNAs com intrões. No entanto, sabe-se que as RNPs do HDV formadas pelo RNA genómico do vírus e os HDAGs são continuamente exportados do núcleo para o citoplasma das células, sendo este processo mediado pelo RNA do vírus (Tavanez *et al.*, 2002).

A análise da distribuição núcleo-citoplasmática do RNA do HDV, após transfecção, foi efectuada por RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).

Para quantificação relativa do RNA do HDV nas fracções celulares por qPCR, os citoplasmas das células Huh7 transfectadas foram separados dos núcleos e o RNA de ambas as fracções foi isolado, purificado e utilizado na síntese de cDNA. Para avaliar a eficácia do método adoptado no fraccionamento celular, as proteínas das fracções nucleares e citoplasmáticas foram analisadas por electroforese em géis de SDS-PAGE seguida da técnica de *Western Blot*, em que se empregou um anticorpo específico para uma proteína celular predominantemente citoplasmática, GAPDH.

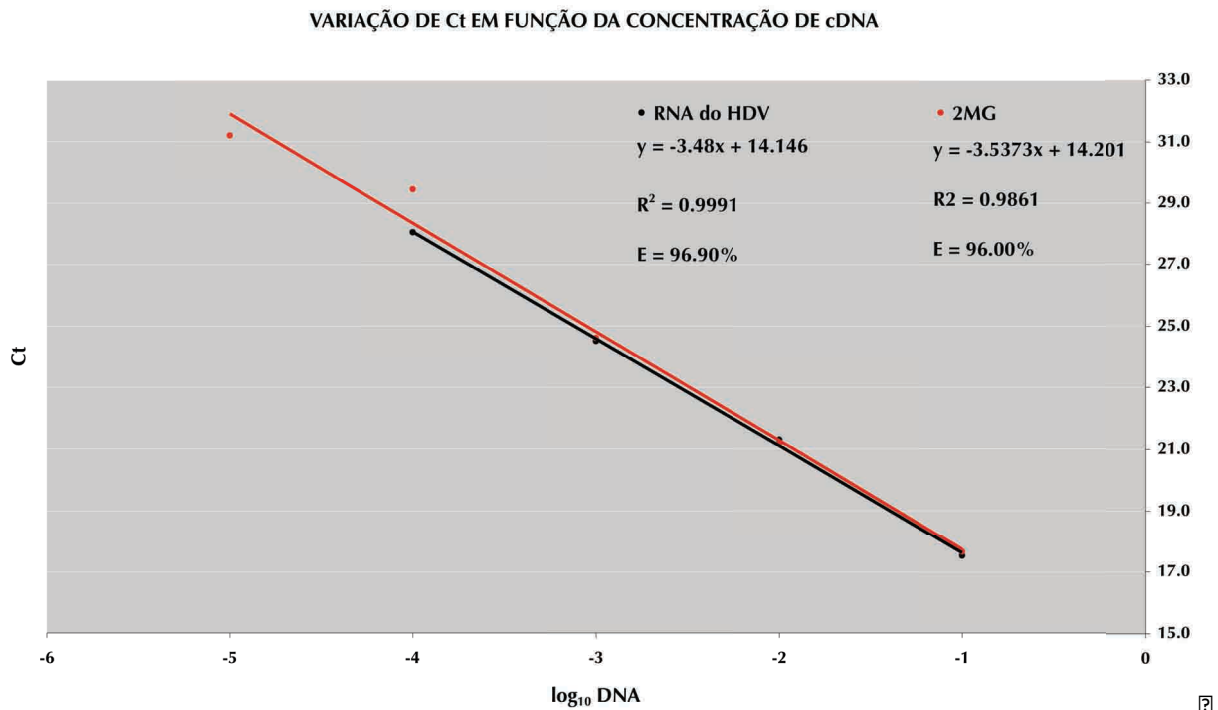
Como se pode observar na figura II.4.3.3, utilizando quantidades equivalentes de proteína total, a proteína GAPDH é detectada predominantemente nas fracções citoplasmáticas. Estes resultados mostram que o método utilizado no fraccionamento celular permite a obtenção de fracções nucleares quase livres de contaminação por proteínas citoplasmáticas, permitindo a sua utilização em ensaios de qRT-PCR.



**Figura II.4.3.3.** Análise de extractos nucleares e citoplasmáticos de células Huh7, por *Western blot* com um anticorpo anti-GAPDH (Ambion). Células Huh7 foram transfectadas com os vectores pDL481, pDL542, pDL481ΔNEE, pDL481ΔNEEδ e pDL481Δδ. Após fraccionamento celular e isolamento do RNA total, as proteínas das fracções nucleares e citoplasmáticas foram precipitadas e dissolvidas em tampão de amostra. Quantidades equivalentes de extractos nucleares (colunas assinaladas com a letra **N**) e citoplasmáticos (colunas assinaladas com a letra **C**) foram separados por electroforese em gel de poliacrilamida a 12% e transferidos para uma membrana de nitrocelulose e incubados com um anticorpo anti-GAPDH. À esquerda encontram-se indicados os pesos moleculares, em kDa, de uma mistura comercial de proteínas cujas dimensões são conhecidas.



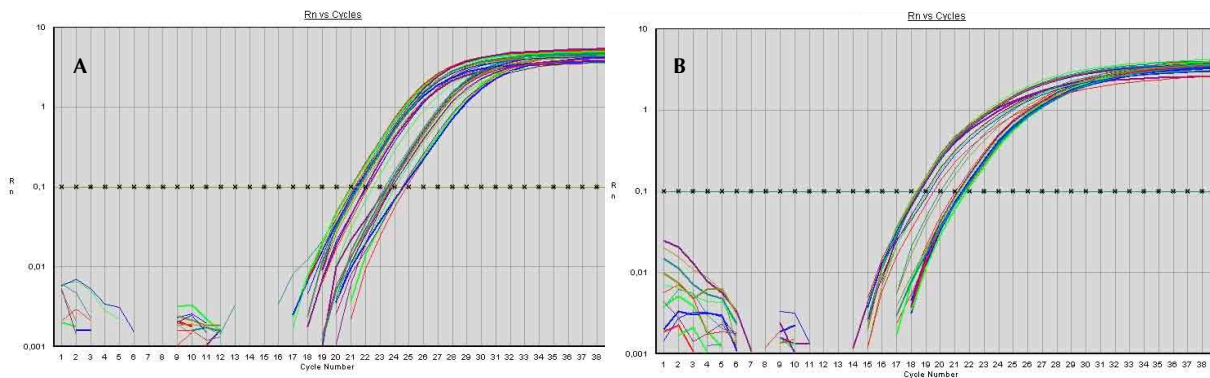
Os resultados do qRT-PCR foram analisados segundo o método de quantificação relativa  $\Delta\Delta C_t$ , utilizando-se o gene da  $\beta$ -2-MG como normalizador (Livak and Schmittgen, 2001). Na figura II.4.3.4 apresentam-se as rectas de regressão e as respectivas equações utilizadas para determinar a eficiência dos *primers* usados nas reacções de amplificação do cDNA do HDV e da  $\beta$ -2-MG.



**Figura II.4.3.4.** Determinação da eficiência de amplificação (E) nas reacções de qPCR. Para cada par de *primers* traçou-se uma recta de regressão linear dos valores de  $C_t$  obtidos por amplificação de cinco diluições sucessivas 1:10 do cDNA sintetizado por transcrição reversa. O declive (m) das rectas foi utilizado para cálculo da eficiência dos *primers* pela fórmula  $E = 10^{(-1/m)}$ .

Os valores de  $C_t$  utilizados na determinação da eficiência dos *primers* foram ainda usados para traçar uma recta de regressão que representa a variação de  $C_t$  ( $\Delta C_t$ ) do gene de interesse em relação ao gene normalizador em função da concentração de cDNA. A aplicação do método  $\Delta\Delta C_t$  implica a utilização de *primers* nas reacções de qRT-PCR com eficiências superiores a 95% e também um declive inferior a 0.1 para a recta de regressão que representa as variações de  $C_t$  do gene de interesse em relação ao gene normalizador em função da concentração de cDNA. Neste caso obtiveram-se eficiências de 96% para os dois pares de *primers* utilizados nas reacções de amplificação do cDNA do gene da  $\beta$ -2-MG e do cDNA do HDV (Figura II.4.3.4) e a inclinação da recta tem um valor de -0.0092.

Para analisar o efeito do NEE na distribuição intracelular do RNA antigenómico do HDV, determinou-se inicialmente o valor de  $\Delta Ct$  ( $Ct_{\text{RNA do HDV}} - Ct_{\text{RNA do } \beta\text{-2-MG}}$ ) para todas as fracções nucleares e citoplasmáticas. Na figura II.4.3.5 apresenta-se um exemplo das curvas de amplificação do cDNA do HDV e do gene normalizador  $\beta\text{-2-MG}$  obtidas nas reacções de PCR em tempo real.

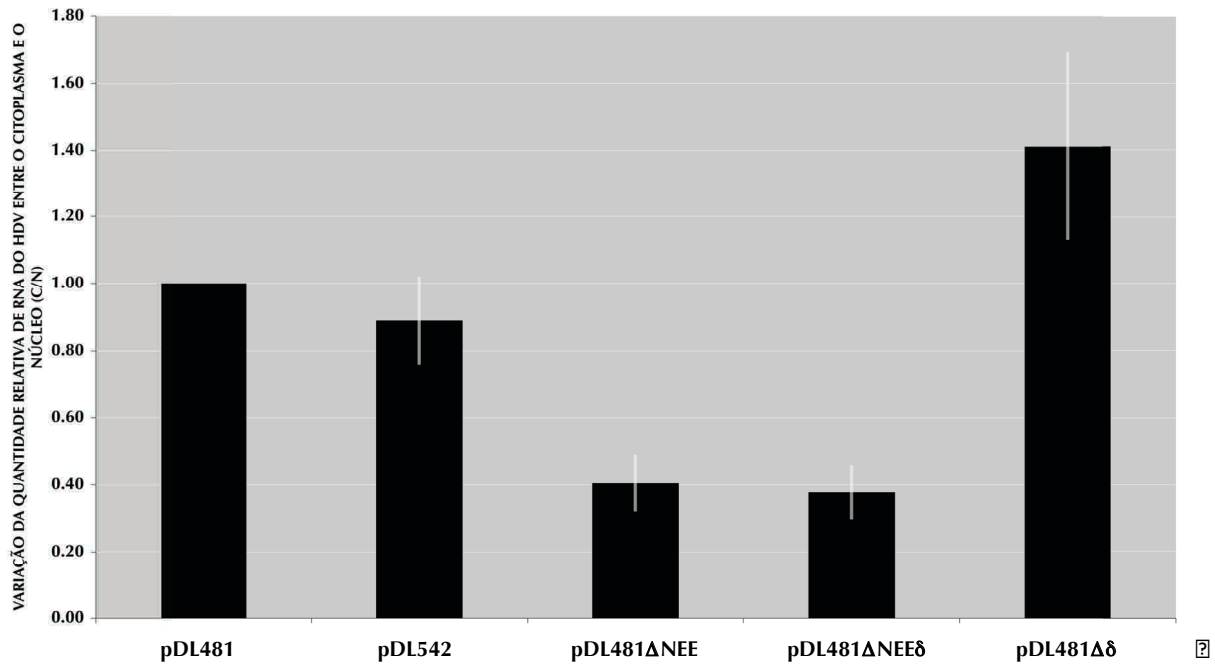


**Figura II.4.3.5.** Exemplo das curvas de amplificação do cDNA do HDV (A) e do gene normalizador  $\beta\text{-2-MG}$  (B) obtidas por PCR em tempo real. Após fraccionamento celular, as fracções nucleares e citoplasmáticas de células Huh7 transfectadas foram utilizadas para extracção do RNA total. A quantificação do RNA do HDV e do gene normalizador, a partir do cDNA complementar foi efectuada por qPCR na presença de *SYBR green* e os resultados analisados com o programa GeneAmp 5700 SDS Sequence Detection System (Applied Biosystems). O *threshold* corresponde ao ciclo de amplificação em que o valor de fluorescência emitido pelo *SYBR green*, proporcional à quantidade de DNA presente na amostra, intersecta um determinado limiar, neste caso de 0.1.

Após quantificação relativa do cDNA do HDV em cada uma das fracções celulares, os os valores de  $\Delta Ct$  das fracções citoplasmáticas foram comparados com os valores de  $\Delta Ct$  determinados para as fracções nucleares correspondentes, obtendo-se um valor de  $\Delta\Delta Ct$  para cada um dos vectores testados. Finalmente estes valores, que traduzem a abundância relativa de RNA do HDV entre os dois compartimentos celulares, foram comparados com o valor de  $\Delta\Delta Ct$  do plasmídeo pDL481, usado como calibrador dos ensaios. As variações na proporção de RNA do HDV entre o núcleo e o citoplasma, produzido a partir dos vectores pDL481 $\Delta$ NEE, pDL481 $\Delta$ NEE $\delta$ , pDL481 $\Delta$  $\delta$  e pDL542, em relação ao pDL481 são expressas pelos valores  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Figura II.4.3.6).



## DISTRIBUIÇÃO DO RNA DO HDV ENTRE O CITOPLASMA E O NÚCLEO



**Figura II.4.3.6.** Distribuição núcleo-citoplasmática do RNA do HDV em células Huh7 transfectadas com os vetores pDL542, pDL481ΔNEE, pDL481ΔNEEδ e pDL481Δδ. O RNA do vírus das fracções citoplasmáticas e nucleares (C/N) foi quantificado por qRT-PCR e os resultados foram analisados pelo método de quantificação relativa  $\Delta\Delta Ct$ . Os resultados apresentados correspondem à média de 2 experiências independentes. As barras verticais a branco correspondem ao desvio padrão.

Os resultados obtidos por qRT-PCR mostram que o elemento de exportação nuclear identificado no antigenoma do HDV altera a distribuição núcleo-citoplasmática do RNA antigenómico do HDV. Células Huh7 transfectadas com vetores pDL481ΔNEE e o pDL481ΔNEEδ, que codificam para moléculas de RNA antigenómico do HDV sem o elemento de exportação nuclear, apresentam uma diminuição de 60% na proporção de RNA antigenómico no citoplasma em relação ao núcleo. Esta redução na proporção de RNA antigenómico no citoplasma em relação ao núcleo, sugere que o NEE, para além de promover a exportação nuclear de mRNAs heterólogos com intrões, encontra-se envolvido no mecanismo de exportação nuclear do RNA antigenómico do HDV. Consequentemente, o RNA antigenómico sem NEE é menos eficiente na exportação nuclear.

Em relação à sequência predita de emparelhar com o NEE na estrutura de bastonete do RNA antigenómico do HDV, os resultados obtidos sugerem que esta sequência não se encontra directamente envolvida na exportação nuclear. A variação na distribuição núcleo-citoplasmática do RNA antigenómico do HDV em células Huh7 transfectadas com o vector

pDL481 $\Delta$ NEE $\delta$  é similar à variação observada para células que expressam antigenomas mutantes apenas para o elemento de exportação. Por outro lado, obtiveram-se evidências que os RNAs antigenómicos sem a sequência que forma emparelhamentos intramoleculares com NEE, são mais eficientes na exportação nuclear do que as moléculas de RNA antigenómico do tipo selvagem. Em relação ao vector pDL481, as células transfectadas com o vector pDL481 $\Delta$  $\delta$  apresentam uma maior quantidade de RNA antigenómico no citoplasma.

Segundo um estudo anterior (Macnaughton and Lai, 2002), o RNA genómico do HDV é preferencial e continuamente exportado do núcleo para o citoplasma, logo após a síntese e processamento, enquanto que o RNA antigenómico é detectado predominantemente no núcleo das células. Sendo o RNA genómico a única espécie de RNA do HDV detectada nos viriões, a exportação nuclear diferencial dos RNAs do HDV poderia intervir num mecanismo que contribui para a exclusão do RNA antigenómico do processo de formação de partículas virais.

Neste sistema experimental os resultados obtidos por qRT-PCR contestam as evidências anteriores de que os RNAs do HDV apresentam uma distribuição núcleo-citoplasmática distinta. Não se registaram diferenças significativas na proporção de RNA do HDV no citoplasma em relação ao núcleo, em células transfectadas com um vector que codifica exclusivamente para o RNA genómico do vírus (pDL542). A alteração média na proporção de RNA genómico em células transfectadas com o vector pDL542, em relação ao vector pDL481 foi apenas de 0.9 vezes (Figura II.4.3.6). Estes resultados mostram que, na ausência dos HDAGs, o RNA antigenómico e genómico do HDV são exportados do núcleo para o citoplasma em quantidades semelhantes.

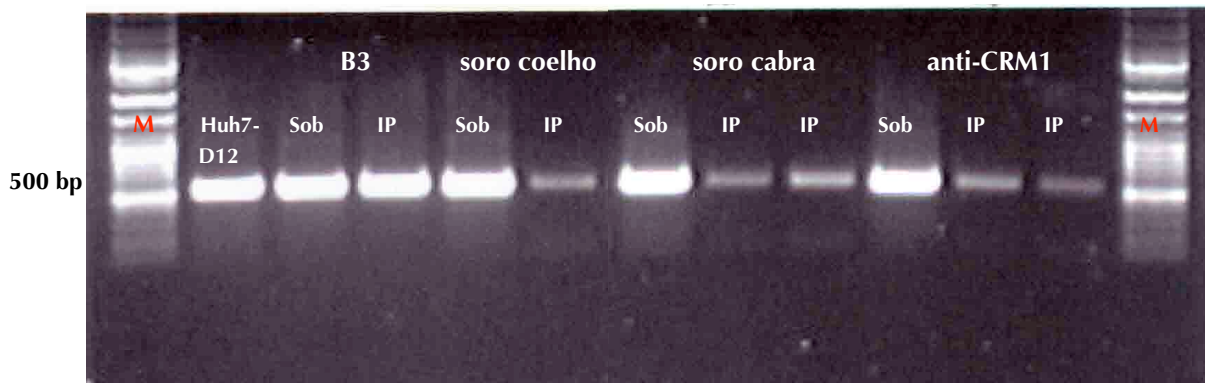
#### **II.4.4 A EXPORTINA CRM1 NÃO FORMA COMPLEXOS COM AS RNPs DO HDV**

Os resultados obtidos com o sistema repórter pDM138 mostraram que a exportação nuclear mediada pelo elemento de exportação identificado no antigenoma do HDV é inibida na presença de LMB. A LMB inibe as vias de exportação nuclear que utilizam a exportina CRM1 impedindo a formação de complexos de exportação entre a CRM1, a GTPase Ran e proteínas com sinais de exportação nucleares ricos em resíduos de leucina (Kudo *et al.*, 1999).

Com o objectivo de averiguar o papel da CRM1 na exportação das RNPs do HDV, analisou-se a capacidade da CRM1 formar complexos com as RNPs do vírus. Para isso, realizaram-se ensaios de imunoprecipitação com um anticorpo policlonal de cabra específico para a CRM1 humana (anti-CRM1; Sta Cruz) em extractos totais de células Huh7-D12 fixadas com PFA.

A linha celular Huh7-D12 apresenta cerca de 40 cópias do cDNA do HDV integradas no seu genoma e expressa constitutivamente tanto o RNA como os antígenos delta.

A presença de RNA do HDV na fracção imunoprecipitada com o anticorpo anti-CRM1 foi analisada por RT-PCR com *primers* específicos para o cDNA do HDV. Em paralelo, como controlos, realizaram-se ensaios de imunoprecipitação com o anticorpo policlonal B3, que reconhece especificamente os antígenos delta, e com os soros normais inactivados de coelho e cabra.



**Figura II.4.4.1.** Imunoprecipitação das RNPs do HDV seguido de RT-PCR. Células Huh-12 foram fixadas com PFA e sonicadas. Os lisados celulares foram incubados com soro policlonal de coelho B3, soro normal de coelho e cabra e anticorpo policlonal de cabra anti-CRM1. O RNA total presente nos lisados de células Huh7-D12 fixadas (**Huh7-D12**), nos sobrenadantes (**Sob**) e nas fracções imunoprecipitadas (**IP**) foi purificado e analisado e por RT-PCR. As colunas assinaladas com um **M** correspondem aos marcadores de dimensões de DNA *Gene Ruler DNA ladder mix* (Fermentas).

Como se pode observar na figura II.4.4.1, o RNA do HDV pode ser detectado em lisados de células Huh7-D12 fixadas com PFA, por transcrição reversa seguida de amplificação por PCR. De acordo com o esperado, obtiveram-se resultados semelhantes nas fracções de RNA purificadas do sobrenadante e nas fracções imunoprecipitadas de extractos totais de células Huh7-D12 incubadas com o anticorpo B3 (Figura II.4.4.1). O facto do RNA do HDV ser facilmente detectado por amplificação do cDNA complementar nas fracções imunoprecipitadas com o anticorpo B3 indica que o método utilizado é adequado para identificar as proteínas que interagem com o RNA do HDV, uma vez que os HDAGs formam complexos ribonucleoproteicos com o RNA do vírus. Em contraste com o observado com o anticorpo B3, o soro de coelho inactivado não é capaz de precipitar o RNA do HDV. Apesar de, em alguns ensaios, ser possível observar uma banda que corresponde ao produto da amplificação do cDNA do HDV nos precipitados pelo soro de coelho inactivado, a quantidade de DNA é muito inferior à observada com o anticorpo B3.

Utilizando este tipo de abordagem, obtiveram-se evidências que sugerem que a proteína CRM1, contrastando com os HDAGs, não forma complexos com o RNA e/ou RNPs do HDV. A quantidade, avaliada por RT-PCR, de RNA do HDV presente nos imunoprecipitados de extractos totais de células Huh7-D12 com o anticorpo anti-CRM1 é semelhante à observada com os soros inactivados de coelho e cabra.



## II.5 DISCUSSÃO

---

Neste capítulo descreveu-se o trabalho desenvolvido com o objectivo de identificar os elementos *cis* envolvidos na exportação nuclear do RNA genómico e antigenómico do HDV.

Um trabalho prévio mostrou que as RNPs do HDV, apesar da sua localização predominantemente nuclear, são exportadas para o citoplasma das células independentemente da presença de HBsAg (Tavanez *et al.*, 2002). Foi também demonstrado que nenhum dos antigénios delta é exportado para o citoplasma na ausência do RNA do vírus, observação essa que indica a ausência de NES na sequência de aminoácidos do HDAg. Por outro lado, quando analisado separadamente dos HDAGs, o RNA do HDV é detectado nos dois compartimentos celulares, o que indica que os sinais para exportação das RNPs do HDV encontram-se na componente de RNA do vírus (Tavanez *et al.*, 2002).

Com o objectivo de identificar as sequências de RNA no genoma do HDV envolvidas na exportação foram construídos 17 mutantes de deleção de um plasmídeo (pDL542) que codifica somente para o RNA genómico do vírus (Lazinski and Taylor, 1994). Na construção dos mutantes de deleção empregou-se o método, descrito por Henikoff (1984), que utiliza a Exo III para digerir, de modo unidireccional e a taxa constante, moléculas de DNA de cadeia dupla. Após clonagem dos cDNAs resultantes da digestão com a Exo III, procurou-se averiguar se os RNAs sintetizados a partir dos mutantes de deleção apresentam alterações no transporte núcleo-citoplasmático. Para isso, transfectaram-se células Huh7 com as 17 construções, procedendo-se à análise da distribuição intracelular do RNA do HDV por hibridação *in situ* seguida de microscopia confocal.

Os ensaios de hibridação *in situ* em células transfectadas com o vector pDL542 do tipo selvagem mostraram que o RNA genómico do HDV, na ausência de HDAGs, pode apresentar dois padrões de distribuição intracelular. Verificou-se que, em cerca de 76% das células transfectadas com o plasmídeo pDL542, o RNA do HDV apresenta uma localização exclusivamente nuclear. Por outro lado, nas restantes células (24%), o genoma do HDV exhibe

um padrão de distribuição núcleo-citoplasmático. Por outro lado, a detecção do RNA do HDV, em células que expressam constitutivamente os dois componentes do vírus, mostrou que o RNA e os HDAGs apresentam uma localização exclusivamente nuclear. Estes resultados confirmam as observações feitas anteriormente por Tavanez *et al.* (2002) em que o RNA do HDV é exportado do núcleo para o citoplasma, prevendo-se a existência de sinais de exportação nuclear na sua sequência nucleotídica. No caso do RNA do HDV conter sequências que o destinem à exportação nuclear, será natural que os RNAs sem os elementos *cis* envolvidos na exportação fiquem retidos no núcleo das células. Contudo, a análise da distribuição intracelular dos RNAs codificados pelos mutantes de deleção do plasmídeo pDL542 mostrou que todos os RNAs truncados, sem exceção, apresentam o mesmo padrão de distribuição do RNA produzido pelo vector pDL542 do tipo selvagem. A aparente ausência de alterações na distribuição intracelular dos RNAs truncados do HDV sugere que a exportação do genoma do HDV é independente da presença de sequências de RNA específicas. Porém, em relação ao RNA do HDV produzido a partir do plasmídeo pDL542, verificou-se uma redução de 40 a 50% na percentagem de células com marcação núcleo-citoplasmática para as formas truncadas do RNA do vírus, com tamanhos abaixo dos 1300 nucleótidos, sem a sequência compreendida entre os nucleótidos 1211 e 1487. A redução na percentagem de células com marcação núcleo-citoplasmática é, ainda, mais evidente para RNAs de polaridade genómica do HDV com dimensões inferiores a 300 nucleótidos, sem a sequência compreendida entre os nucleótidos 476 e 512, sendo nestes casos de 67%. Se por um lado, estes resultados parecem sugerir que os RNAs virais sem as sequências compreendidas entre os nucleótidos 1211 e 1487, e 467 e 512 são menos eficientemente exportados para o citoplasma, por outro lado, podem ser igualmente indicativos de que a eficiência da exportação nuclear do RNA genómico do HDV se encontra relacionada com o comprimento dos RNAs virais.

Curiosamente, foram encontradas evidências de que a eficiência da exportação nuclear do mRNA está relacionada com o comprimento, sendo os mRNAs mais pequenos piores substratos para a exportação nuclear (Rodrigues *et al.*, 2001; Erkmann *et al.*, 2005). Masuyama *et al.* (2004b), enquanto procuravam identificar os elementos que definem a identidade do mRNA e os destinam à via de exportação nuclear mediada pelo complexo TAP/p15, mostraram que os mRNAs com cerca de 130 nucleótidos encontram-se preferencialmente associados à proteína PHAX, factor envolvido na exportação nuclear dos UsnRNAs que ocorre através da exportina CRM1. Estes resultados mostram que para o mRNA, o comprimento das moléculas de RNA é um factor determinante na associação dos factores de exportação específicos para esta classe de RNA.

Os resultados obtidos para o RNA genómico do HDV parecem indicar que os RNAs com tamanhos próximos do RNA viral do tipo selvagem são mais eficientes na exportação nuclear do que as formas truncadas com dimensões abaixo dos 1300 nucleótidos, constituindo os RNAs mutantes com dimensões inferiores a 300 nucleótidos os piores substratos para a exportação nuclear. Porém, a redução na percentagem de células que exibem marcação núcleo-citoplasmática para o RNA do HDV poderá não ser o resultado da incapacidade dos RNAs mais pequenos serem exportados para o citoplasma, mas da alteração da conformação das moléculas de RNA. Por outro lado, o RNA pode conter mais do que uma sequência ou elemento estrutural envolvidos na exportação nuclear e a deleção de uma das sequências como resultado da digestão do cDNA do HDV com a Exo III, estar na base dos resultados obtidos.

Na tentativa de clarificar se a exportação do genoma do HDV depende da presença de sequências de RNA específicas, utilizou-se um sistema repórter originariamente desenvolvido para o estudo da exportação nuclear dos mRNAs com intrões do HIV-1 (Huang *et al.*, 1991). Este sistema utiliza o plasmídeo pDM138 que codifica para a segunda metade do genoma do HIV-1. Na região intrónica do gene que codifica para as proteínas do envelope do HIV-1 foi inserida uma sequência que codifica para a proteína repórter CAT. A expressão da proteína CAT está condicionada pela capacidade dos mRNAs com um intrão, produzidos em resultado da transcrição do plasmídeo pDM138, serem exportados para o citoplasma das células. A exportação nuclear de moléculas de mRNA com intrões depende, por sua vez, da presença de sequências específicas de RNA capazes de recrutar, directamente ou por intermédio de adaptadores proteicos, receptores de transporte, tais como a exportina CRM1 ou o complexo TAP/p15.

No caso do HIV-1, foi identificada uma sequência nucleotídica, designada de RRE, que é essencial para a exportação nuclear de todos os transcritos de mRNA com intrões sintetizados durante a replicação do vírus (Cullen, 1998). A presença deste elemento em *cis*, a jusante da sequência de cDNA que codifica para a proteína repórter CAT no vector pDM138, é necessária para a indução da expressão da proteína repórter CAT, em células que produzem em simultâneo a proteína viral Rev (Hope *et al.*, 1990). A proteína Rev reconhece e liga-se especificamente ao RRE, promovendo a exportação nuclear dos mRNAs com a ORF da proteína CAT na região intrónica, por um mecanismo que envolve a interacção directa da proteína Rev com a exportina CRM1 associada à GTPase Ran na forma RanGTP (Fornerod *et al.*, 1997; Cullen, 1998; Askjaer *et al.*, 1998).

A exportação nuclear de mRNAs virais com intrões nem sempre requer a presença de adaptadores proteicos codificados pelo genoma do vírus. Os mRNAs com intrões codificados pelos retrovírus simples são exportados activamente para o citoplasma pela proteína TAP, sem a intervenção de proteínas adaptadoras virais. A proteína celular TAP, responsável pela exportação nuclear dos mRNAs celulares, estabelece interacção directa com uma sequência denominada de CTE, presente na região 3'UTR dos mRNAs com intrões dos retrovírus simples (Braun *et al.*, 1999). A sequência CTE substitui funcionalmente o RRE e a proteína Rev no sistema repórter pDM138, promovendo a eficiente exportação nuclear dos mRNAs que possuem a ORF da proteína CAT no intrão (Tang *et al.*, 1997a; Herold *et al.*, 2000). É de salientar, que a introdução do elemento CTE no vector pDM138 resulta na exportação nuclear dos mRNAs com intrões pela via da proteína TAP (Gruter *et al.*, 1998). Na ausência de elementos de exportação nuclear a jusante da ORF que codifica para a proteína CAT, os mRNAs sintetizados, em resultado da transcrição do pDM138, são processados pelo spliceossoma e degradados no núcleo (Popa *et al.*, 2002).

O sistema repórter pDM138 foi utilizado, também, na identificação e caracterização de sequências envolvidas na exportação nuclear de mRNAs virais sem intrões. Os mRNAs que codificam para as proteínas de superfície dos vírus HBV e WHV possuem um elemento designado de PRE, que se verificou desempenhar um papel importante na exportação nuclear (Huang and Yen, 1995; Donello *et al.*, 1998).

A capacidade de um elemento de RNA promover a exportação nuclear pode ser facilmente investigada por quantificação da actividade enzimática ou da concentração citoplasmática da proteína repórter CAT, em células transitoriamente transfectadas com o plasmídeo pDM138.

As sequências de cDNA do HDV utilizadas para clonagem no vector pDM138 foram obtidas por PCR, tendo-se usado o plasmídeo pDL542 que codifica para o RNA genómico do vírus e os mutantes de deleção resultantes da digestão com a Exo III, como moldes nas reacções de amplificação. Da ligação das sequências de cDNA do HDV com o vector pDM138 foram obtidas 18 construções que codificam para um mRNA quimérico com um segmento do RNA genómico do HDV inserido no intrão do vector repórter.

A presença de sinais de exportação nuclear no genoma do HDV foi testada por quantificação dos níveis de expressão da proteína repórter CAT por ELISA, após transfecção transitória de células Huh7. Os valores médios de expressão da proteína CAT, normalizados em relação aos valores de expressão da proteína  $\beta$ -galactosidase, foram comparados com os níveis de expressão da proteína repórter em células transfectadas com os vectores pDM138-PRE(+) e pDM138-PRE(-). O vector pDM138-PRE(+), utilizado como controlo positivo, contém o cDNA

do PRE do HBV inserido na orientação correcta. De acordo com os trabalhos anteriores (Huang and Yen, 1995; Donello *et al.*, 1998; Popa *et al.*, 2002), verificou-se que o PRE do HBV orientado correctamente é capaz de induzir um aumento significativo na expressão da proteína repórter comparativamente com os valores obtidos para o vector pDM138 parental. Por outro lado, o PRE do HBV na orientação inversa, parece não ser funcional na exportação nuclear, dado que os valores médios de expressão da proteína CAT para as células transfectadas com o vector pDM138-PRE(-) não são significativamente diferentes dos valores registados para o vector pDM138 parental.

Neste trabalho, para além da identificação de sinais de exportação nuclear no genoma do HDV, pretendeu-se também investigar a eventual presença de sinais para exportação no RNA antigenómico do vírus.

Durante a replicação do genoma do HDV são produzidas múltiplas cópias de um RNA cuja sequência é exactamente complementar ao RNA presente nas partículas virais. A análise da distribuição intracelular do RNA do HDV por *Northern blot* mostrou que, a quantidade de RNA antigenómico no citoplasma das células é inferior à observada para o RNA genómico, sugerindo que o antigenoma do HDV é menos eficiente na exportação nuclear (Gudima *et al.*, 2002). De facto, Macnaughton e Lai (2002), mostraram, utilizando células marcadas com ortofosfato radioactivo, que o RNA genómico é rapidamente exportado para o citoplasma, enquanto o RNA antigenómico fica retido no núcleo das células. Porém, em células transfectadas com um vector que codifica somente para o RNA antigenómico, a distribuição intracelular do RNA do vírus é semelhante à observada para o RNA genómico, indicando que os RNAs do HDV são comparáveis na exportação nuclear (Tavanez *et al.*, 2002).

Com o objectivo de investigar a presença de sinais de exportação na sequência do RNA antigenómico do HDV, as sequências de cDNA do HDV utilizadas na construção dos derivados do vector pDM138 que codificam para o RNA genómico do HDV, foram introduzidas no vector pDM138 no sentido inverso. Foram obtidas 18 construções que codificam para um mRNA quimérico com uma região do RNA antigenómico do HDV subclonado a jusante da ORF da proteína CAT.

Após transfecção, os valores médios de expressão da proteína CAT foram quantificados por ELISA e normalizados em relação aos valores de  $\beta$ -Gal. Verificou-se que nenhuma das sequências de RNA do HDV testadas são capazes de promover um aumento na expressão da proteína repórter superior ao observado para o vector pDM138 parental. Na maioria das sequências analisadas, os valores de expressão da proteína CAT foram muito inferiores aos obtidos com os vectores pDM138 parental e pDM138-PRE(-), o que indica que o RNA do HDV

é incapaz de promover a exportação nuclear de um mRNA heterólogo com um intrão na sua sequência.

Estes resultados, podem ser interpretados como ausência de sinais de exportação nuclear nas sequências do RNA genómico e antigenómico do HDV. No entanto, a ausência de sinais de exportação não é suficiente para explicar os valores de expressão da proteína CAT, muito inferiores aos obtidos com o vector pDM138 vazio.

As variações na eficiência da transfecção, entre ensaios independentes, poderiam ser uma justificação plausível para os valores de expressão da proteína repórter. Contudo, esta hipótese parece pouco provável, dado que todos os extractos celulares quantificados por ELISA apresentavam valores de expressão de  $\beta$ -Gal mensuráveis como resultado da co-transfecção com o plasmídeo pSV- $\beta$ -Galactosidase. A presença da proteína  $\beta$ -Gal mostra que as células foram eficazmente transfectadas e que a ausência, ou fraca expressão, da proteína CAT pode resultar de eventuais acontecimentos intracelulares que se seguem à transfecção, tais como retenção nuclear dos mRNAs repórter ou a rápida degradação logo após a transcrição. O RNA genómico e antigenómico do HDV possuem um elevado número de sequências intramoleculares complementares, o que contribui para a ocorrência de emparelhamentos internos, formando uma extensa região de RNA de cadeia dupla. A presença deste tipo de estrutura no interior da sequência dos mRNAs produzidos a partir do plasmídeo pDM138 poderia reduzir a estabilidade e o tempo de semi-vida dos mRNAs repórter.

Por outro lado, a presença de domínios com actividade de ribozima e de possíveis elementos de retenção nuclear nos RNAs do vírus poderão estar na base dos resultados obtidos. Neste último caso, os mRNAs retidos no núcleo acabariam por ser processados pelo spliceossoma e a ORF da proteína CAT, situada na região intrónica seria degradada.

O RNA genómico e antigenómico do HDV possuem na sua sequência nucleotídica um domínio com actividade ribozímica que cataliza reacções de autoclivagem do RNA do HDV em locais específicos. A análise detalhada da sequência do plasmídeo pDL542 mostrou que o cDNA do HDV encontra-se flanqueado por duas cópias da sequência que codifica para a ribozima do RNA genómico do HDV. Como resultado, após transfecção com o plasmídeo pDL542, são produzidas moléculas de RNA genómico, cujas extremidades, através de dois acontecimentos de autoclivagem, podem ligar-se formando moléculas circulares (Lazinski and Taylor, 1994).

Tal como mencionado anteriormente, o plasmídeo pDL542 e os 17 mutantes de deleção, foram usados como moldes nas reacções de amplificação dos cDNAs do HDV para clonagem no vector repórter pDM138. Todos os cDNAs amplificados possuem uma cópia do domínio de

ribozima na sua sequência, exceptuando o cDNA que codifica para a sequência completa do RNA genómico do HDV, que possui duas cópias. Deste modo, os mRNAs produzidos, após transfecção, com as construções derivadas do vector pDM138 possuem pelo menos um domínio de ribozima inserido no intrão.

Apesar de falta de evidências directas que mostrem que as ribozimas do HDV são capazes de mediar a autoclivagem dos mRNAs codificados pelo plasmídeo pDM138, estes RNAs autocatalíticos têm vindo a ser utilizados para clivar *in cis* sequências heterólogas de RNA (Schurer *et al.*, 2002; Price *et al.*, 2005). Estes dados e os valores de expressão da proteína CAT em extractos de células Huh7 transfectadas com as construções derivadas do vector pDM138 que codificam para o RNA do HDV suportam a hipótese das ribozimas poderem encontrar-se activas e mediar a autoclivagem dos mRNAs produzidos. Em resultado das reacções de autoclivagem, acumular-se-iam, no núcleo das células, mRNAs heterólogos sem parte da sequência da extremidade 3' e a cauda poli(A). A perda da cauda poli(A) está relacionada com a diminuição da estabilidade das moléculas de RNA, e na redução da capacidade dos mRNAs serem traduzidos em proteínas. Segundo Huang e Carmichael (1996), a poliadenilação das extremidades 3' dos mRNAs produzidos a partir do vector pDM128 é condição necessária para a exportação nuclear. O vector pDM128 contém a sequência que codifica para o RRE do HIV-1 clonado a jusante da ORF da proteína CAT. A substituição do sinal de poliadenilação do vector pDM128 por uma sequência que codifica para uma ribozima do tipo cabeça de martelo resulta na produção de mRNAs repórter que não são poliadenilados, menos estáveis e defectivos na exportação nuclear (Huang and Carmichael, 1996).

Em suma, a ausência ou fraca expressão da proteína repórter nos extractos de células Huh7 transfectadas com os derivados do vector pDM138 pode dever-se provavelmente a alterações na estabilidade dos mRNAs e à incapacidade dos mesmos serem exportados, em resultado da autoclivagem mediada pela ribozima do HDV.

Numa tentativa de minimizar os eventuais efeitos da presença das ribozimas na estabilidade dos mRNAs e na exportação nuclear procedeu-se à clonagem de dez sequências mais pequenas do cDNA do HDV no vector pDM138, que cobrem a totalidade do genoma do vírus. Apenas uma das construções, o vector pDM138-9S, possui o cDNA que codifica para o domínio autocatalítico do RNA genómico do HDV. Com estas construções pretendeu-se investigar a capacidade do RNA do HDV promover a exportação nuclear de moléculas de mRNA heterólogas com um intrão, de um modo independente das alterações na estabilidade das moléculas de mRNA induzidas pela auto-clivagem gerada pela ribozima.

Os resultados da quantificação dos níveis de expressão da proteína CAT por ELISA mostraram que nenhum dos segmentos subgenômicos do RNA do HDV é capaz de induzir um aumento na expressão da proteína repórter tão significativo como o PRE do HBV, orientado correctamente. Salienta-se contudo, que três das sequências analisadas de polaridade genômica, nucleótidos 415 a 613, 760 a 1096 e 1191 a 1414, mostraram alguma actividade na exportação nuclear, com valores de expressão da proteína CAT compreendidos entre os dos controlos positivo e negativos.

Note-se que a menor eficiência das sequências identificadas na exportação nuclear de mRNAs heterólogos com um intrão, não significa contudo, que as mesmas não estejam envolvidas no mecanismo de transporte do RNA genômico do HDV do núcleo para o citoplasma.

Os elementos reguladores pós-transcricionais presentes no genoma dos vírus HBV e WHV são um exemplo de dois sinais de exportação nuclear com elevado grau de homologia, funcionalmente equivalentes que diferem na capacidade de indução da expressão da proteína repórter CAT. Depois de terem confirmado que o WPRE é capaz de substituir funcionalmente o PRE do HBV na expressão das proteínas de superfície do HBV, Donello *et al.* (1998) investigaram o papel do WPRE na exportação nuclear. Foi demonstrado que, tal como o PRE do HBV, o WPRE é capaz de promover a exportação nuclear de mRNAs heterólogos com um intrão. Porém, neste e em comparação com o PRE do HBV, o aumento na expressão da proteína CAT é cerca de 120% (Donello *et al.*, 1998; Popa *et al.*, 2002).

A diferença nos valores de expressão da proteína CAT para células transfectadas com um sinal de exportação nuclear funcional, em relação ao vector parental pode variar consoante as metodologias empregues na quantificação da proteína repórter.

No presente estudo, registou-se um aumento de duas vezes nos valores de expressão da proteína CAT para o PRE do HBV, orientado correctamente, em relação ao vector pDM138 parental e ao vector pDM138 com o PRE do HBV orientado no sentido inverso. Esta variação, embora constante, é cerca de quatro vezes inferior ao reportado com métodos que em vez da concentração quantificam a actividade enzimática da proteína repórter (Huang and Liang, 1993; Huang and Yen, 1995). Salvo a possibilidade de ocorrência de mutações na sequência do PRE do HBV que interfiram com a sua função na exportação, muito provavelmente os métodos de quantificação baseados na actividade enzimática da proteína CAT parecem ser mais sensíveis na discriminação de sequências envolvidas na exportação daquelas que não participam neste processo.

Em conclusão, foram identificadas três sequências de RNA no genoma do HDV capazes de induzir um aumento nos níveis da proteína CAT em relação ao vector pDM138 sem nenhum

elemento de exportação funcional. Porém, dado que o aumento observado é inferior ao do controlo positivo e devido à diferença nos valores de expressão da proteína CAT, entre os controlos, ser reduzida, permanece incerto, se a exportação nuclear do RNA genómico do HDV depende da presença de sequências de RNA específicas. Os valores de expressão da proteína repórter situados entre os controlos positivo e negativo registados para três das sequências de RNA genómico do HDV analisadas, poderá indicar que a eficiência da exportação nuclear do RNA genómico do vírus depende do número de sinais de exportação presentes na sua sequência. Neste caso, as três sequências em simultâneo poderiam induzir um aumento da expressão da proteína CAT semelhante ao PRE do HBV.

Destes ensaios foi ainda possível confirmar que existe uma correlação entre a presença da ribozima do HDV e a ausência ou reduzida expressão da proteína CAT, concluindo-se que a actividade ribozímica do RNA do HDV é em parte responsável pelos valores de expressão da proteína repórter abaixo dos registados para o vector pDM138 parental.

Contrastando com os resultados obtidos para o RNA genómico, o RNA antígenómico parece possuir inequivocamente um sinal para exportação nuclear, funcional no sistema repórter pDM138.

A sequência de RNA identificada, situada entre os ribonucleótidos 1263 a 1466 das moléculas de RNA de polaridade antígenómica do HDV, mostrou-se tão eficaz quanto o PRE do HBV na indução da expressão da proteína CAT.

O elemento *cis* encontrado no antígenoma do HDV, tal como o PRE do HBV só é funcional na exportação nuclear se estiver orientado correctamente. A inserção do cDNA do HDV que codifica para a sequência 1263 a 1466 do RNA antígenómico do vírus no sentido inverso, no vector pDM138 resulta em valores de expressão da proteína repórter inferiores aos dos controlos negativos.

Para além desta sequência, foi identificada uma segunda região no RNA antígenómico para a qual se registaram valores de expressão da proteína CAT superiores aos controlos negativos. Porém, e à semelhança das sequências de RNA genómico, o efeito na exportação nuclear é menos evidente do que o observado para a sequência 1263 a 1466 do antígenoma do HDV e para o PRE do HBV.

A região identificada, localizada entre os nucleótidos 176 a 380 do RNA antígenómico do HDV, sobrepõe-se com a extremidade 5' da ORF que codifica para os HDAGs. Apesar da ORF que codifica para os HDAGs estar contida na sequência do RNA antígenómico do HDV, estes RNAs não são utilizados na tradução das proteínas virais (Lo *et al.*, 1998). Durante a replicação

do HDV são sintetizadas moléculas de mRNA poliadeniladas com cerca de 800 nucleótidos que servem de molde para a produção dos antígenos delta.

A sobreposição de um hipotético sinal de exportação com a extremidade 5' da sequência que codifica para os antígenos delta permite especular sobre a possível presença nos mRNAs do HDV de um elemento *cis* com função na exportação nuclear.

A presença de sinais de exportação nas regiões codificantes de transcritos de mRNA foi demonstrada, tanto para mRNAs celulares como virais. No caso particular dos mRNAs celulares que codificam para proteínas que são secretadas, verificou-se que a sequência que codifica para péptido sinal responsável pelo transporte destas proteínas através do retículo endoplasmático, facilita *in cis* a exportação nuclear de um mRNA repórter, sem intrões que normalmente fica retido no núcleo (Palazzo *et al.*, 2007). Um outro exemplo da presença de sinais de exportação nuclear na região codificante dos mRNAs foi reportada por Huang e Carmichael (1997). Os autores demonstraram que a exportação nuclear dos mRNAs sem intrões, que codificam para a histona H2a, é mediada por um sinal presente na região codificante.

Dado que os mRNAs virais sintetizados durante a replicação do HDV não possuem sequências intrónicas, seria interessante, no futuro, averiguar se a sequência identificada na extremidade 5' da ORF dos HDAGs desempenha algum papel na exportação nuclear dos mRNAs codificados pelo vírus.

Em conclusão, utilizando o sistema repórter pDM138 foram identificadas cinco sequências no RNA do HDV, das quais três são de polaridade genómica e duas de polaridade antígenómica, capazes de induzir um aumento na expressão da proteína CAT em relação ao vector parental, sem sinais de exportação nuclear. Destas cinco sequências, a julgar pelos valores de expressão normalizados da proteína CAT, apenas uma, localizada entre os nucleótidos 1263 e 1466 do RNA antígenómico do HDV, parece exercer um papel equivalente ao PRE do HBV na exportação nuclear. Esta hipótese foi confirmada por detecção do mRNA sintetizado em resultado da transcrição do vector pDM138, nas fracções citoplasmáticas e totais de células que expressam o PRE do HBV e a sequência de 1263 a 1466 do RNA antígenómico do HDV.

Recorde-se que a acumulação citoplasmática dos transcritos de mRNA codificados pelo pDM138 requer a presença de um sinal de exportação. Na ausência deles, a maioria desta população de mRNAs é processada pelo spliceossoma e a sequência intrónica que contém a ORF da proteína CAT acaba por ser degradada.

Em conformidade com os resultados obtidos por ELISA, que sustentam a hipótese da sequência compreendida de 1263 a 1466 do RNA antígenómico do HDV conter um sinal de exportação,

mostrou-se que o aumento na expressão da proteína CAT resulta da acumulação citoplasmática de mRNAs heterólogos com a ORF da proteína repórter no intrão. De facto, observou-se que a proporção de mRNAs heterólogos com um intrão codificados pelo pDM138 no citoplasma em relação à fracção de mRNA total para células que expressam a sequência de 1263 a 1466 do RNA antigenómico do HDV é muito semelhante à detectada para o PRE do HBV. Nas mesmas condições experimentais, não foi possível detectar mRNA com a ORF da proteína CAT em células transfectadas com o vector pDM138-A9S que contém o cDNA da ribozima do RNA genómico do HDV. É possível, assim concluir que, a ausência de expressão da proteína CAT nestas células resulta da ausência de sinais de exportação na sequência de RNA do vírus analisada e da instabilidade dos mRNAs produzidos, induzida pela autoclivagem catalizada pela ribozima do HDV.

Os valores de expressão da proteína repórter comparáveis aos observados com o PRE do HBV e a detecção de mRNA com a ORF da proteína CAT no intrão, no citoplasma das células, são evidências claras de que a sequência compreendida de 1263 a 1466 do RNA antigenómico do HDV possui um sinal de exportação nuclear.

Com o objectivo de analisar mais detalhadamente a sequência de polaridade antigenómica do RNA do HDV necessária para garantir a exportação nuclear, analisou-se o efeito da digestão crescente das extremidades 5' e 3' da sequência de 1263 a 1466 do RNA antigenómico do HDV na exportação dos mRNAs heterólogos com um intrão codificados pelo vector pDM138. Foram clonadas oito versões mais pequenas do sinal de exportação nuclear do antigenoma do HDV no vector pDM138 e a sua actividade na exportação foi avaliada por ELISA. Destes ensaios foi possível concluir que os 30 nucleótidos mais próximos da extremidade 3' são dispensáveis para a actividade do motivo identificado na exportação nuclear. Porém, deleções para além dos 30 nucleótidos terminais da extremidade 3' resultam na perda de função do sinal de exportação nuclear. Em relação à extremidade 5', verificou-se que a actividade do motivo de exportação é menos sensível a deleções nesta extremidade da sequência, do que na oposta. Registaram-se valores de expressão da proteína CAT superiores ao dos controlos negativos, mesmo após, remoção de 95 nucleótidos da extremidade 5' do sinal de exportação. Contudo, comparativamente com o PRE do HBV e com a sequência de 1263 a 1466 do antigenoma do HDV, estas formas truncadas são menos eficazes a promover a exportação nuclear dos mRNA heterólogos com um intrão.

De acordo com uma simulação baseada em ferramentas informáticas, a sequência do RNA antigenómico do HDV, identificada como sinal de exportação nuclear, apresenta uma conformação complexa. A estrutura secundária calculada prevê que os ribonucleótidos da

sequência de 1263 a 1466 do RNA antigenómico do HDV estabeleçam muitos emparelhamentos intramoleculares formando uma estrutura de RNA de cadeia dupla que bifurca numa das extremidades, interrompida nalguns locais por ansas de tamanho variável. Se procurarmos estabelecer uma relação entre a estrutura secundária prevista para o sinal de exportação e a sua actividade, podemos dizer que, o segmento de RNA de cadeia dupla que termina em duas mini-hélices pode ser necessário para a função do elemento identificado na exportação nuclear.

Porém, segundo as previsões feitas para a estrutura secundária do RNA antigenómico do HDV, o sinal de exportação nuclear localiza-se na região central de cadeia dupla do antigenoma, para a qual não se prevêem bifurcações da molécula de RNA.

As diferenças sugeridas pelas ferramentas computacionais para a estrutura secundária do sinal de exportação nuclear consoante a análise é feita com a sequência de 1263 a 1466 do RNA antigenómico do HDV ou com o antigenoma completo, dificultam a antevisão do possível papel que o motivo identificado possa ter na exportação nuclear do RNA antigenómico do HDV.

A análise funcional do sinal de exportação, identificado com o sistema repórter pDM138, no transporte para o citoplasma do RNA antigenómico do HDV, foi efectuada por comparação da distribuição intracelular do RNA do tipo selvagem com moléculas de RNA antigenómico sem o sinal de exportação.

Para expressão do RNA antigenómico do HDV, na ausência dos restantes componentes do vírus, utilizou-se o plasmídeo pDL481 e mais três construções derivadas deste, que codificam para mutantes do RNA antigenómico do HDV sem o sinal de exportação, sem o sinal de exportação e sem a sequência prevista de formar emparelhamentos intramoleculares com o sinal de exportação, ou apenas, sem a sequência predita de emparelhar com o sinal de exportação. Os dois últimos vectores foram construídos para garantir que as possíveis alterações na distribuição intracelular do RNA antigenómico são causadas pela ausência do sinal de exportação e que não resultam de alterações da estrutura secundária das moléculas de RNA.

Para além destas construções, utilizou-se também, o vector pDL542 que codifica exclusivamente para o RNA genómico do vírus (Lazinski and Taylor, 1994). Deste modo, para além de se avaliar o efeito do sinal de exportação na distribuição intracelular do RNA antigenómico do HDV, pretendeu-se averiguar se existem diferenças na exportação nuclear entre o RNA genómico e antigenómico do HDV.

As alterações na distribuição intracelular dos RNAs do HDV foram aferidas por quantificação relativa do RNA viral, presente nas fracções nucleares e citoplasmáticas, pela técnica PCR em tempo real.

Os resultados obtidos mostraram que o sinal de exportação, funcional no sistema repórter pDM138, altera a distribuição intracelular do RNA antigenómico do HDV. Em comparação com o RNA antigenómico do tipo selvagem registou-se uma redução de cerca de 60% na proporção de RNA no citoplasma em relação ao núcleo nas células transfectadas com os vectores que codificam para moléculas de RNA antigenómico sem o sinal de exportação nuclear.

Por outro lado, a sequência predita de estabelecer emparelhamentos intramoleculares com o sinal de exportação parece não ter um papel directo na distribuição núcleo-citoplasmática do RNA antigenómico do HDV. A deleção simultânea desta sequência e do sinal de exportação produz um efeito semelhante à remoção apenas do sinal de exportação na distribuição intracelular do RNA antigenómico.

Estes resultados mostram que a sequência de 1263 a 1466 do RNA antigenómico do HDV, para além, de promover a exportação nuclear de mRNAs heterólogos com um intrão, encontra-se envolvida no mecanismo de exportação do RNA antigenómico do vírus.

Curiosamente, quando se analisou o efeito da sequência predita de emparelhar com sinal de exportação na distribuição intracelular do RNA antigenómico, verificou-se que a sua deleção causa um aumento na proporção de RNA no citoplasma em relação ao núcleo. A deleção da sequência predita de emparelhar com o sinal de exportação pode induzir uma alteração na conformação local das moléculas de RNA antigenómico do HDV, que por sua vez facilitará o acesso dos receptores de transporte às sequências de RNA que destinam o RNA antigenómico à exportação. Esta interpretação é meramente especulativa dado que se desconhece a conformação exacta assumida pelas moléculas de RNA antigenómico do HDV durante o processo de exportação nuclear. Existem, contudo, evidências de que os RNAs do HDV podem assumir conformações diferentes da estrutura de bastonete. A conformação mais provável para o RNA antigenómico do HDV do genótipo III, à semelhança dos RNAs do vírus do genótipo I, é a estrutura de bastonete. Esta estrutura, porém, não é compatível com os requisitos estruturais necessários para a reacção de deaminação da adenosina do codão stop (UAG) da ORF do SHADg em inosina (UIG) (Linnstaedt *et al.*, 2006). Esta modificação pós-transcricional, designada de *editing* do RNA, é essencial para a síntese do HDAg grande do HDV, necessário para o empacotamento e montagem dos viriões. Foi demonstrado, que as moléculas de RNA antigenómico do HDV do genótipo III têm que sofrer um rearranjo na sua estrutura, perto do

local de *editing*, que envolve a formação de dois *hairpins*, para que a ADAR1 catalize a reacção de conversão da adenosina do codão stop UAG numa inosina (Linnstaedt *et al.*, 2006). Para além disso, nem todas as moléculas de RNA do HDV estão covalentemente fechadas, sendo frequente a detecção de moléculas na forma linear em células que replicam o genoma do vírus.

Outra conclusão importante, a retirar dos resultados obtidos por qRT-PCR é a de que, no sistema experimental utilizado, o RNA antigenómico apresenta uma distribuição núcleo-citoplasmática muito semelhante ao RNA genómico. Não se observaram diferenças significativas nas proporções de RNA genómico e antigenómico do HDV no citoplasma, em relação ao núcleo das células transfectadas com vectores que codificam exclusivamente uma das espécies de RNA do vírus. Estes resultados mostram que o RNA genómico e antigenómico do HDV, na ausência de replicação do genoma do vírus, são exportados com igual eficiência do núcleo para o citoplasma das células.

A observação de que as moléculas de RNA antigenómico do HDV são exportadas em quantidades semelhantes ao RNA genómico não suporta o modelo explicativo proposto por Macnaughton e Lai (2002), para a exclusão do RNA antigenómico das partículas virais. Segundo estes autores, o RNA genómico, após síntese no núcleo, é rapidamente exportado para o citoplasma das células, observando-se quantidades aproximadas de RNA nas fracções nucleares e citoplasmáticas. Já, a maioria das moléculas de RNA antigenómico apresenta uma distribuição exclusivamente nuclear. Como resultado da exportação diferencial dos RNAs do HDV, apenas o RNA genómico com localização citoplasmática seria incorporado na partículas virais em formação. Este modelo é apoiado pela evidência de que o RNA genómico é a única espécie de RNA presente nos viriões do HDV.

No entanto, face à presença de um sinal de exportação na sequência do RNA antigenómico parece pouco provável que este seja excluído das vias de exportação nuclear. Aliás, a presença de RNA antigenómico nas partículas semelhantes a vírus secretadas por células que expressam moléculas de RNA antigenómico, L-HDAg e HBsAgs, parece confirmar que o antigenoma do HDV possui propriedades intrínsecas que são reconhecidas pela maquinaria celular responsável pela exportação nuclear (Lazinski and Taylor, 1994).

Uma hipótese alternativa para explicar a exportação preferencial das moléculas de RNA genómico do HDV seria a existência de competição entre os RNAs do vírus por receptores de transporte comuns. Como o RNA genómico é cerca de 20 vezes mais abundante do que o seu complementar, a ligação do RNA antigenómico com o receptor de transporte específico para o RNA do HDV seria diminuída, na mesma proporção. Porém, esta hipótese apenas seria válida

no caso dos RNAs do HDV utilizarem a mesma via de exportação nuclear. Até à data desconhece-se se os RNAs do HDV utilizam a mesma ou, em alternativa, vias de exportação diferentes.

Há ainda a considerar, a hipótese dos RNAs do HDV, durante a replicação, poderem associar-se a complexos proteicos diferentes que, por sua vez, poderão influenciar a interacção dos RNAs com os receptores de transporte. A ideia da replicação do RNA do HDV poder ser levada a cabo por duas RNA polimerases celulares distintas explicaria a deposição de proteínas diferentes com as cadeias nascentes de RNA genómico e antigenómico do HDV. Porém, o significado biológico da descoberta de que o RNA antigenómico possui um sinal de exportação e que na ausência da replicação do genoma do vírus estes RNAs são exportados com a mesma eficiência do que os RNAs genómicos, permanece por averiguar.

A observação de que a proporção de RNA antigenómico do HDV, no citoplasma, em relação ao núcleo, é reduzida em 60% na ausência do sinal de exportação, sugere que as moléculas de RNA antigenómico do HDV, tal como foi descrito para os mRNAs com intrões codificados pelo genoma dos retrovírus simples e para os mRNAs desprovidos de sequências intrónicas dos vírus HBV e WHV, são exportadas por meio de um mecanismo independente da presença das proteínas codificadas pelo vírus. Este indício é ainda reforçado pelo facto do RNA antigenómico apresentar uma distribuição intracelular comparável com a do RNA genómico, para o qual foi demonstrada a localização no citoplasma na ausência dos antigénios delta (Tavanez *et al.*, 2002).

Estas conclusões contrastam, contudo com as hipóteses de Wang *et al.* (2005) que sugerem a participação do L-HDAg na exportação do RNA genómico do HDV. Um trabalho prévio havia sugerido a presença de um NES entre os aminoácidos 198 a 210 do L-HDAg (Lee *et al.*, 2001). Através das técnicas dois híbrido em levedura e de imunoprecipitação foi demonstrado que o L-HDAg estabelece interacção com a proteína NES1, e que a ligação entre as proteínas depende da presença do NES (Wang *et al.*, 2005). Estes resultados incentivaram os autores a investigar o papel desta proteína na exportação nuclear do L-HDAg e do RNA genómico do HDV e na formação de partículas virais. Foi observado que a redução da expressão da proteína NES1, por RNAi, causa uma inibição total do empacotamento do RNA genómico e uma redução de 60% do L-HDAg nas partículas virais. A ausência de RNA viral nas partículas virais foi relacionada com a diminuição acentuada da quantidade de RNA genómico no citoplasma das células tratadas com siRNAs dirigidos para o mRNA da proteína NES1 (Wang *et al.*, 2005).

No mesmo ano em que Lee *et al.* reportaram que o NES do L-HDAg é capaz de promover a exportação nuclear de uma proteína repórter, Lischka *et al.* (2001), utilizando ensaios de

heterocariontes, obtiveram resultados que indicam que o L-HDAg não possui sinais de exportação. Conclusões idênticas foram obtidas após análise da distribuição intracelular dos antígenos delta, em heterocariontes, na ausência ou presença do RNA do HDV (Tavanez *et al.*, 2002).

Neste trabalho foram obtidos resultados que sugerem o envolvimento da exportina CRM1 na exportação nuclear do RNA antígenico do HDV. A CRM1, tal como todas as exportinas pertencentes à família das carioferinas- $\beta$ , estabelece interação com os substratos apenas na presença da GTPase Ran na forma RanGTP. A CRM1 é responsável pela exportação de quase todas as proteínas que apresentam um NES rico em resíduos de leucina e de duas classes de RNAs celulares não codificantes, os RNAs ribossomais e os UnRNAs (Fornerod *et al.*, 1997). Para além disso, é ainda responsável pela exportação de alguns mRNAs virais e celulares.

A importância da exportina CRM1 na exportação nuclear de uma proteína ou RNA pode ser facilmente estudada através da análise do efeito da LMB na distribuição intracelular da proteína ou RNA em estudo. A LMB é um antibiótico, produzido por *Streptomyces spp*, que por ligação covalente a um resíduo de cisteína da região central da exportina CRM1, reduz, de um modo dependente da concentração, a ligação da exportina CRM1 aos NES (Kudo *et al.*, 1999).

O envolvimento da exportina CRM1 na exportação nuclear do RNA antígenico do HDV foi analisado recorrendo ao sistema repórter pDM138. O efeito da LMB na exportação nuclear mediada pelo sinal de exportação do RNA antígenico foi comparado com o PRE do HBV que é insensível à LMB, funcionando como controlo negativo.

Os resultados obtidos confirmaram, de acordo com o esperado, que a actividade do PRE do HBV não é inibida na presença de LMB, verificando-se mesmo um aumento nos níveis médios de expressão da proteína CAT na presença de LMB. O aumento registado na expressão da proteína CAT na presença de LMB poderá resultar da diminuição da competição entre receptores de transporte distintos pela ligação a locais comuns do NPC, nomeadamente os domínios FG das nucleoporinas. Sendo a exportina CRM1 responsável pela exportação de inúmeros substratos, a sua inibição pela LMB, poderia facilitar o transporte através do NPC mediado por receptores de transporte diferentes.

Contrariamente aos resultados obtidos com o PRE do HBV, verificou-se que a actividade do sinal de exportação do RNA antígenico do HDV é inibida na presença de LMB. Com efeito, registou-se uma redução de 50% nos valores de expressão médios da proteína CAT, comparáveis com os obtidos com o vector pDM138 parental. A observação de que a actividade do sinal de exportação do RNA antígenico do HDV é drasticamente inibida pela LMB sugere o envolvimento da exportina CRM1 no transporte do RNA do vírus do núcleo para

o citoplasma. Como a exportina CRM1 não forma complexos de exportação directamente com os RNAs, mas através da ligação de proteínas adaptadoras contendo um NES, a exportação do RNA antigenómico do HDV pela via da exportina CRM1 implica a participação de proteínas celulares capazes de fazer a ligação do RNA viral com a CRM1.

Note-se contudo, que não foi possível comprovar a interacção da exportina CRM1 com as RNPs do HDV. A ausência de RNA do HDV dos imunoprecipitados de células Huh7-D12 com um anticorpo anti-CRM1 não significa necessariamente que a exportina CRM1 não forme complexos de exportação com os RNAs do HDV. Tal como foi descrito para o sinal de exportação do RNA antigenómico, o RNA ribossomal e os mRNAs que codificam para a proteína TRA2 em *C. elegans* ficam retidos no núcleo das células na presença de LMB (Thomas and Kutay, 2003; Trotta *et al.*, 2003; Kuersten *et al.*, 2004). No caso das subunidades ribossómicas de 60S foi identificada uma proteína, a NMD3, que possui dois NES na sua sequência de aminoácidos, necessários para a exportação nuclear (Thomas and Kutay, 2003; Trotta *et al.*, 2003). Analogamente, o mRNA TRA2 encontra-se associado com o factor de transcrição TRA1, para o qual as ferramentas informáticas indicam a presença de dois NES (Kuersten *et al.*, 2004). Apesar destas proteínas possuírem as propriedades necessárias para medirem a interacção entre os respectivos substratos e a exportina CRM1, até hoje, em eucariotas superiores não foi possível reconstituir *in vitro* a formação de complexos de exportação entre as subunidades ribossomais de 60S contendo a proteína NMD3, e a exportina CRM1 na presença de RanGTP, nem comprovar a interacção do factor de transcrição TRA1 com a exportina CRM1 (Trotta *et al.*, 2003; Kuersten *et al.*, 2004). Diversos factores podem contribuir, isolada ou conjuntamente, para a incapacidade de isolar complexos de exportação nuclear associados à exportina CRM1. As interacções formadas entre os vários componentes de um complexo de exportação são transitórias e no caso da exportina CRM1 são regra geral de baixa afinidade (Engelsma *et al.*, 2004). Para além disso, as próprias condições experimentais, nomeadamente, os tampões usados na lise celular que contêm diversos detergentes e sais podem destabilizar os complexos de exportação e a dissociação da exportina CRM1.

Em conclusão, o trabalho descrito neste capítulo permitiu identificar uma região no antigenoma do HDV, compreendida entre os nucleótidos 1263 e 1466, capaz de promover a exportação nuclear de mRNAs heterólogos com um intrão produzidos a partir do vector repórter pDM138.

Nos eucariotas superiores, a associação de factores de exportação com as moléculas de mRNAs é um processo intimamente ligado com os processos de maturação do mRNA. Diversas

evidências têm mostrado a interacção de proteínas directamente envolvidas na exportação do mRNA com os componentes do spliceossoma, indicando que o *splicing* contribui para o recrutamento dos receptores de transporte do mRNA. A interacção dos receptores de transporte do mRNA com os componentes do spliceossoma sugere, ainda, que o *splicing* participa nos mecanismos de controlo utilizados pelas células para regular o fluxo da informação genética do núcleo para o citoplasma, local de síntese proteica. Assim, os mRNAs que não completam correctamente as etapas de processamento, nomeadamente a remoção das sequências intrónicas, são menos eficientes no recrutamento dos factores necessários para a exportação, ficando retidos no núcleo das células. Por outro lado, os retrovírus simples e complexos requerem a constante exportação nuclear de genomas virais e de mRNAs contendo intrões para completarem o seu ciclo de replicação nas células infectadas. A exportação nuclear destes RNAs depende da presença de sinais de exportação nuclear na sua sequência nucleotídica capazes de recrutar os receptores de transporte, directa ou por intermédio de proteínas codificadas pelos vírus. Note-se que a presença de elementos *cis* de exportação nuclear não é exclusiva dos mRNAs virais contendo intrões. Foram igualmente identificadas sequências que facilitam a exportação nuclear em mRNAs virais e celulares desprovidos de intrões. A actividade da maioria destas sequências na exportação nuclear foi avaliada utilizando a abordagem experimental descrita neste trabalho.

A descoberta de um elemento *cis* no RNA antigenómico do HDV capaz de promover a exportação nuclear de mRNAs heterólogos com um intrão pode sugerir que o antigenoma do vírus é capaz de se ligar a proteínas celulares que participam no transporte nuclear. Esta hipótese é sustentada pelos resultados obtidos nos ensaios de exportação em que se utilizou leptomicina B, inibidor específico da exportina CRM1.

Neste trabalho, foi ainda demonstrado por quantificação relativa do RNA viral nas fracções nucleares e citoplasmáticas, que na ausência de replicação do genoma do HDV e síntese dos HDAGs, os RNAs genómico e antigenómico são exportados para o citoplasma em quantidades comparáveis. No caso particular do RNA antigenómico, verificou-se que a distribuição intracelular é alterada para os RNAs virais sem o sinal de exportação identificado. Estes resultados, para além de mostrarem que a sequência identificada no RNA do HDV participa na exportação nuclear dos antigenomas do vírus, sugerem uma função biológica associada à localização citoplasmática do RNA antigenómico do HDV. Seria, portanto, interessante avaliar o efeito da remoção do sinal de exportação do antigenoma do HDV na replicação do vírus.

**CAPÍTULO III.**  
**IMPORTAÇÃO NUCLEAR DO HDAg**

---



## III.1 INTRODUÇÃO

---

### III.1.1 IMPORTAÇÃO NUCLEAR DE PROTEÍNAS

A presença do invólucro nuclear impõe uma barreira física à (livre) passagem de moléculas entre o núcleo e o citoplasma das células eucariotas, constituindo os complexos do poro nuclear (NPC) as únicas vias de trânsito entre os dois compartimentos celulares. Cerca de 30% das proteínas que formam os NPCs apresentam um domínio constituído por múltiplas repetições de motivos ricos em resíduos de fenilalanina e glicina (FG) (Cronshaw *et al.*, 2002). Os modelos propostos para o transporte bidireccional através do NPC sugerem que as nucleoporinas ricas em motivos FG desempenham um papel importante na permeabilidade selectiva do NPC, não oferecendo resistência à passagem de proteínas com massa molecular abaixo dos 40 kDa. Por outro lado, as proteínas com dimensões superiores são transportadas activamente através do NPC por proteínas que se caracterizam pela capacidade de interagir, em simultâneo, com sinais específicos presentes nos substratos a transportar e com os motivos FG das nucleoporinas residentes no NPC (Fahrenkrog and Aebi, 2003).

A importação nuclear de proteínas é efectuada por proteínas da família das carioferinas- $\beta$ . Nos eucariotas superiores foram identificadas mais de 20 carioferinas- $\beta$  diferentes, das quais 10 participam na importação nuclear, designando-se estas proteínas de importinas (Mosammaparast and Pemberton, 2004). As interacções entre as carioferinas- $\beta$  e os substratos, bem como a direcionalidade do transporte nuclear, são reguladas pela GTPase Ran (Chook and Blobel, 2001). As duas formas da proteína Ran, ligada a GTP ou a GDP, distribuem-se assimetricamente entre o núcleo e o citoplasma das células, encontrando-se a Ran ligada a GTP (RanGTP) predominantemente no núcleo e a RanGDP no citoplasma (Kalab and Heald, 2008). As importinas ligam-se aos substratos no citoplasma, local onde a concentração de RanGDP é alta. O complexo de importação é dissociado no núcleo, após interacção da importina com a proteína RanGTP. A associação das importinas aos substratos depende da presença de sequências peptídicas específicas denominadas de sinais de localização nuclear (NLS) nas proteínas a transportar.

### III.1.2 SINAIS DE LOCALIZAÇÃO NUCLEAR

A primeira evidência do transporte nuclear de proteínas ser mediado por sinais peptídicos específicos, proveio da observação de que a hidrólise proteolítica dos aminoácidos C-terminais da nucleoplasmina, uma proteína nuclear muito abundante nos oócitos de *Xenopus*, impede a sua migração para núcleos (Dingwall *et al.*, 1982). Contudo, verificou-se que os péptidos formados pelos 50 aminoácidos C-terminais da nucleoplasmina, eram capazes de atravessar os poros nucleares, acumulando-se nos núcleos dos oócitos de *Xenopus laevis* (Dingwall *et al.*, 1982). Estes resultados sugeriram que a importação nuclear de proteínas é um processo selectivo que, no caso da nucleoplasmina, depende da presença de um péptido sinal que se encontra na extremidade carboxílica da proteína. Apesar da descoberta da necessidade dos 50 aminoácidos da extremidade C-terminal para a importação nuclear da nucleoplasmina, o primeiro sinal de localização nuclear caracterizado a nível molecular foi o NLS do antigénio T grande do vírus SV40 (Kalderon *et al.*, 1984). Esta sequência formada por sete aminoácidos, <sup>126</sup>PKKKRKV<sup>132</sup>, rica em resíduos básicos, é necessária e suficiente para promover a importação nuclear de proteínas originariamente citoplasmáticas, tais como a β-galactosidase e a cinase do piruvato (Kalderon *et al.*, 1984). Mais tarde, analisando a distribuição intracelular da proteína cinase do piruvato fundida com sequências da extremidade C-terminal da nucleoplasmina, Dingwall *et al.* (1988) identificaram o NLS da nucleoplasmina. A sequência mínima necessária para a importação nuclear da nucleoplasmina é maior do que o NLS do antigénio T grande do vírus SV40, sendo constituída por dois motivos ricos em aminoácidos básicos, <sup>154</sup>KRPAATKKAGQAKKKKLD<sup>171</sup>. A análise da contribuição individual dos aminoácidos que formam o NLS da nucleoplasmina mostrou que os dois domínios, ricos em aminoácidos básicos, são essenciais para a actividade do NLS (Robbins *et al.*, 1991).

Os NLSs do antigénio T grande do vírus SV40 e da nucleoplasmina formam o protótipo dos NLSs, sendo designados de clássicos ou convencionais, podendo ser constituídos por uma sequência única ou bipartida de aminoácidos básicos. Seguindo abordagens experimentais que utilizam proteínas de fusão, foram identificados vários outros sinais de localização nuclear (Tabela III.1).

	PROTEÍNA	SINAL DE LOCALIZAÇÃO NUCLEAR	REFERÊNCIA
<b>Convencionais monopartidos</b>	Antígeno T grande do vírus SV40	PKKKRKV <sup>132</sup>	Kalderon <i>et al.</i> , 1984
	Antígeno T grande do vírus polioma	VSRKRPRP <sup>196</sup>	Richardson <i>et al.</i> , 1986
	p53	PPQP <del>KKK</del> PLDGE <sup>322</sup>	Shaulsky <i>et al.</i> , 1990
	NF-κB p50	QRKRQK <sup>372</sup>	Henkel <i>et al.</i> , 1992
	NF-κB p65	EEKRKR <sup>286</sup>	Zabel <i>et al.</i> , 1993
	c-myc	PAAKRVKLD <sup>328</sup> / RQRRNELKRSE <sup>374</sup>	Dang and Lee, 1988
<b>Convencionais bipartidos</b>	Nucleoplasmina	<u>K</u> RPAATKKAGQAK <u>KKK</u> KLD <sup>171</sup>	Dingwall <i>et al.</i> , 1988
	Receptor dos glucocorticóides	YR <u>K</u> CLQAGMNLEAR <u>KTKKKIK</u> GIIQQATA <sup>524</sup>	Picard and Yamamoto, 1987
	RCC1	MSP <u>KRIAKRR</u> SPPADAIPK <u>SKKVK</u> VSHR <sup>28</sup>	Nemergut and Macara, 2000
<b>Ricos em resíduos de arginina</b>	Rex do vírus HLTV-1	MPKTRRRPRRSQRKRPT <sup>18</sup>	Palmeri and Malim, 1999
	Rev do vírus HIV-1	RQARRNRRRRWR <sup>46</sup>	Truant and Cullen, 1999
<b>Atípicos</b>	Mata2	MNKIPIKDLLNPQ <sup>13</sup> /VRILESWFAKNI <sup>159</sup>	Hall <i>et al.</i> , 1984
	HBcAg	SKCLGWLWG <sup>29</sup>	Ou <i>et al.</i> , 1989
	rpl23a	VHSHKKKIRTPTFTTPKTLRLRRQPKYPR- KSAPRRNKLDHY <sup>74</sup>	Jakel and Gorlich, 1998
	hnRNP A1	NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQ- YFAKPRNQGGY <sup>305</sup>	Siomi and Dreyfuss, 1995
	SREBP2	RSSINDKIIELKDLVMGTDAMHKSGVLRK- AIDYIKYLQQVNHKLRQENMVLKLANQKNKL <sup>403</sup>	Nagoshi and Yoneda, 2001

**Tabela III.1.** Exemplos seleccionados de sinais de localização nuclear. Os dois motivos ricos em aminoácidos básicos dos NLS bipartidos encontram-se sublinhados.

Apesar de não existir uma sequência consenso entre os NLSs identificados, a maioria dos NLSs caracteriza-se pela presença de uma ou duas sequências ricas em aminoácidos básicos. De acordo com um estudo informático do proteoma de *S. cerevisiae*, 45% das proteínas celulares anotadas no GenBank<sup>TM</sup> e 57% das proteínas com localização nuclear possuem um NLS do tipo convencional, indicando que a importação nuclear da maioria das proteínas é sinalizada por pequenas sequências peptídicas ricas em aminoácidos básicos (Lange *et al.*, 2007).

Existem, porém, exceções, como é o caso do NLS da proteína oncogénica humana *c-myc*. O péptido sinal responsável pela importação nuclear da proteína *c-myc* é constituído por nove

aminoácidos, dos quais apenas três são básicos, <sup>320</sup>PAAKRVKLD<sup>328</sup> (Dang and Lee, 1988). Curiosamente, Makkerh *et al.* (1996) mostraram que a adição de um resíduo de prolina seguido de duas alaninas (PAA) altera a distribuição intracelular da proteína cinase do piruvato fundida com o segundo domínio do NLS da nucleoplasmina KKKKLD. O segundo domínio do NLS da nucleoplasmina, embora necessário, não é suficiente para a importação nuclear, conseqüentemente a proteína repórter fundida com os aminoácidos KKKKLD localiza-se no citoplasma. No entanto, a adição da sequência PAA a montante do segundo domínio do NLS da nucleoplasmina resulta na localização exclusivamente nuclear da proteína de fusão. Estes resultados evidenciaram, pela primeira vez, o papel dos aminoácidos acídicos e neutros na actividade dos sinais de localização nuclear.

Para além do NLS da proteína *c-myc* foram identificados outros motivos de importação que apresentam características distintas dos NLSs convencionais. Entre os NLSs atípicos o que se encontra melhor caracterizado é o NLS da ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1 (hnRNP A1). Este sinal, designado de M9, é constituído por 38 aminoácidos e tem a particularidade de participar tanto na importação como na exportação nuclear da proteína hnRNP A1 (Siomi and Dreyfuss, 1995).

Um outro exemplo de um sinal de localização nuclear com propriedades distintas dos sinais convencionais é a sequência responsável pela importação nuclear da proteína ribossomal rpL23a. O NLS da proteína rpL23a, também designado de domínio BIB, consiste numa sequência complexa de 42 aminoácidos, rica em resíduos básicos (Jakel and Gorlich, 1998). Mais recentemente, foi identificado um elemento estrutural com propriedades de sinal de localização nuclear nos homodímeros e heterodímeros formados pelos factores de transcrição STAT1/STAT1 e STAT1/STAT2. A importação nuclear dos dímeros STAT1/STAT1 e STAT1/STAT2 depende de dois elementos contendo alguns resíduos de arginina e lisina, localizados no interior do domínio de ligação ao DNA de cada uma das subunidades, que possuem actividade de NLS após dimerização das proteínas (Melén *et al.*, 2001, Fagerlund *et al.*, 2002). A formação de dímeros entre os factores de transcrição STAT é catalizada por fosforilação de um único resíduo de tirosina da extremidade carboxílica pelas cinases Janus, activadas em resposta a sinais extracelulares, como o interferon (Meyer and Vinkemeier, 2004). Em células não estimuladas, os factores de transcrição STAT, na forma não fosforilada, são predominantemente detectados no citoplasma das células. Contudo, verificou-se que algumas proteínas STAT não fosforiladas são capazes de atravessar o poro nuclear por um mecanismo independente de proteínas transportadoras, presumivelmente por interacção directa com as nucleoporinas contendo motivos FG (Meyer and Vinkemeier, 2004; Vinkemeier, 2004).

Existem ainda, evidências de que a importação nuclear de proteínas desprovidas de sinais de localização nuclear, logo incapazes de formar um complexo de importação com as proteínas transportadoras, pode ocorrer por interacção com proteínas que possuam um NLS funcional (Leslie *et al.*, 2004; Shiota *et al.*, 1999; Jans *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 1992). Este mecanismo de importação, designado de *piggyback*, parece contribuir para a localização nuclear de um mutante do antigénio delta defectivo na importação nuclear, em células que expressam igualmente a proteína do tipo selvagem. Como a forma mutante do HDAg defectiva na importação nuclear retém a capacidade de formar dímeros pode ser importada em associação com o antigénio delta do tipo selvagem (Xia *et al.*, 1992).

### III.1.3 VIAS DE IMPORTAÇÃO NUCLEAR DE PROTEÍNAS

As vias de importação nuclear mais estudadas e melhor caracterizadas são as que utilizam a importina- $\beta$  (imp- $\beta$ ). A imp- $\beta$  é responsável pela importação nuclear de todas as proteínas que contêm sinais de localização nuclear clássicos. Porém, a interacção entre a imp- $\beta$  e as sequências de aminoácidos que formam os NLSs clássicos não é directa, ocorrendo através de outras proteínas, membros da família das importinas- $\alpha$  (imp- $\alpha$ ; Gorlich *et al.*, 1995; Goldfarb *et al.*, 2004). As 10 repetições ARM da região central das imp- $\alpha$ , dispostas em tandem, formam um domínio de ligação a NLS (Conti *et al.*, 1998). A resolução das estruturas tridimensionais da imp- $\alpha$  ligada a NLSs do tipo monopartido e bipartido mostrou que o domínio central da imp- $\alpha$  apresenta dois locais específicos de ligação a NLS (Conti *et al.*, 1998; Fontes *et al.*, 2000). O primeiro local de ligação, situado entre os motivos ARM 1 a 4, estabelece contacto directo com os aminoácidos que formam os NLS monopartidos e com a sequência de aminoácidos maior dos NLS bipartidos. O segundo local de ligação da imp- $\alpha$ , motivos ARM 7 a 8, acomoda a sequência de aminoácidos menor dos NLS bipartidos (Chook and Blobel, 2001; Cook *et al.*, 2007). De acordo com os estudos cristalográficos, mutações nos aminoácidos do primeiro local de ligação a NLS, diminuem severamente a ligação da imp- $\alpha$  com os dois tipos de NLS clássicos (Leung *et al.*, 2003). Mutações no segundo local de ligação a NLS e em dois aminoácidos da região que separa os dois locais específicos de ligação a NLS, diminuem a afinidade entre a imp- $\alpha$  e os NLS bipartidos, sem contudo afectar a interacção com os NLS monopartidos (Leung *et al.*, 2003).

Enquanto o reconhecimento dos NLS presentes nas proteínas é feito directamente pela imp- $\alpha$ , a formação de um complexo de importação funcional requer que a imp- $\beta$  se associe à imp- $\alpha$ . A

interacção entre as duas importinas ocorre através do domínio IBB localizado na extremidade N-terminal da imp- $\alpha$  (Gorlich *et al.*, 1996b; Weis *et al.*, 1996). Moroianu *et al.* (1996) mostraram, pela primeira vez, que o domínio IBB contém uma sequência de aminoácidos básicos semelhante a um NLS com capacidade de ligação ao domínio central da imp- $\alpha$ . A análise da estrutura cristalizada da imp- $\alpha$  de murganho mostrou que a sequência de aminoácidos semelhante a um NLS do domínio IBB ocupa o primeiro local de ligação ao NLS do domínio central da imp- $\alpha$  (Kobe, 1999). Na sua forma livre, a ligação intramolecular do domínio IBB ao domínio central da imp- $\alpha$  exerce um efeito auto-inibitório, na interacção entre a imp- $\alpha$  e os NLS exógenos. Apesar do NLS do domínio IBB competir com os NLS exógenos pela ligação ao domínio central da imp- $\alpha$ , verificou-se que esta interacção intramolecular não é suficiente para impedir a ligação da imp- $\alpha$  às proteínas contendo NLS clássicos. Contudo, a ligação da imp- $\beta$  à imp- $\alpha$ , ao impedir que o domínio IBB ocupe o primeiro local de ligação a NLS, aumenta a afinidade da interacção entre a imp- $\alpha$  e o substrato. Consequentemente, sustenta-se um modelo em que as proteínas com NLS clássicos ligam-se preferencialmente à imp- $\alpha$  em associação com imp- $\beta$ , do que à imp- $\alpha$  na forma livre (Stewart, 2007). Os complexos de importação, formados no citoplasma, atravessam os poros nucleares por um mecanismo que envolve interacções entre a imp- $\beta$  e os domínios repetidos FG das nucleoporinas residentes no poro nuclear (Weis, 2003).

Uma vez na face nuclear do poro e devido à presença da proteína RanGTP no núcleo das células, os complexos de importação são dissociados, dando origem à libertação das proteínas transportadas e ao retorno das importinas ao citoplasma. A dissociação dos complexos de importação inicia-se com a ligação da proteína RanGTP a três locais diferentes da imp- $\beta$ . Esta ligação causa uma alteração na conformação da imp- $\beta$ , impedindo a sua interacção com o domínio IBB da imp- $\alpha$  (Lee *et al.*, 2005). A separação da imp- $\beta$  do complexo de importação resulta, por sua vez, na libertação do domínio IBB da imp- $\alpha$ , ficando este livre para competir com os NLS das proteínas transportadas pela ligação ao domínio central da imp- $\alpha$ . Para além do mecanismo auto-inibitório mediado pelo domínio IBB contribuir para a dissociação da imp- $\alpha$  das proteínas transportadas, existem outros factores que aceleram o processo. Com efeito, a taxa de dissociação, *in vitro*, dos complexos imp- $\alpha$ /NLS é bastante lenta, podendo ser acelerada na presença da exportina CAS ligada à proteína RanGTP (Gilchrist *et al.*, 2002). A exportina CAS é o receptor de transporte responsável pela exportação nuclear da imp- $\alpha$  (Kutay *et al.*, 1997). A ligação cooperativa da exportina CAS e da RanGTP com o domínio ácido próximo da extremidade carboxílica da imp- $\alpha$  ocorre somente após a dissociação do NLS do domínio central da imp- $\alpha$  (Herold *et al.*, 1998). A resolução da estrutura tridimensional do

complexo de exportação nuclear, formado pela exportina CAS ligada à proteína Ran-GTP e à imp- $\alpha$ , mostrou que para além do domínio ácido presente na extremidade C-terminal, o complexo CAS/Ran-GTP também estabelece interacção com o domínio IBB ligado à região central da imp- $\alpha$  (Stewart, 2007). A ligação exclusiva da exportina CAS à imp- $\alpha$ , na sua forma livre, impede a ocorrência de ciclos de importação fúteis, com o retorno das proteínas transportadas ao compartimento celular inicial, o citoplasma.

Existem ainda evidências que apontam para a participação de nucleoporinas, residentes na face nuclear do NPC, na dissociação dos complexos de importação (Gilchrist *et al.*, 2002, Matsuura *et al.*, 2003, Matsuura and Stewart, 2005). As nucleoporinas Nup2 e Nup50, localizadas predominantemente na face nuclear do NPC de *S. cerevisiae* e de murganho, respectivamente, promovem a dissociação dos complexos de importação através da interacção directa com a imp- $\alpha$  (Matsuura *et al.*, 2003, Matsuura and Stewart, 2005). Estudos estruturais e de mutagénese dirigida mostraram que as nucleoporinas Nup2 e Nup50 ligam-se a dois sítios específicos da imp- $\alpha$ , essenciais para a interacção da exportina CAS ligada à proteína Ran-GTP (Matsuura and Stewart, 2005). A ligação das nucleoporinas Nup2 e Nup50 ao complexo imp- $\alpha$ /NLS, causa uma diminuição da afinidade da imp- $\alpha$  pelo substrato, resultando na sua dissociação. Por fim, a ligação da exportina CAS, à extremidade C-terminal da imp- $\alpha$ , em combinação com o efeito auto-inibitório do domínio IBB, resultam na dissociação do complexo de exportação, formado pela exportina CAS ligada à proteína RanGTP e à imp- $\alpha$ , da face nuclear do poro nuclear. Este complexo é, então exportado para o citoplasma. A imp- $\beta$  é exportada para o citoplasma em associação com a proteína Ran-GTP, sem intervenção de outros receptores de transporte. O ciclo de importação nuclear termina com o retorno das importinas ao citoplasma, onde a actividade intrínseca de GTPase da Ran é estimulada por acção das proteínas RanGAP e RanBP1, culminando com a hidrólise de GTP e a libertação da Ran da imp- $\beta$  e da exportina CAS (Kutay *et al.*, 1997).

Todos os organismos analisados, têm em comum o facto de possuírem apenas um gene que codifica para a imp- $\beta$  (Quensel *et al.*, 2004). Ao contrário da imp- $\beta$ , a família das imp- $\alpha$ , nos humanos, possui seis proteínas classificadas em três sub-famílias, de acordo com a similaridade entre as sequências de aminoácidos (Goldfarb *et al.*, 2004). Com excepção da imp- $\alpha 6$ , apenas detectada nos testículos, as restantes imp- $\alpha$  são expressas, em simultâneo, na maioria dos tecidos analisados (Kohler *et al.*, 1997; 1999). Contudo, os níveis de expressão relativos de cada uma das imp- $\alpha$  variam entre os tecidos analisados, bem como, entre linhas celulares diferentes (Kohler *et al.*, 1997,1999; Kamei *et al.*, 1999). Todas as imp- $\alpha$  ligam-se eficientemente à imp- $\beta$  e à exportina CAS. Para além disso, verificou-se que todas as imp- $\alpha$  são

capazes de promover a importação nuclear da nucleoplasmina e da BSA conjugada com o NLS do antígeno T grande do vírus SV40, em células semi-permeabilizadas com digitonina (Kohler *et al.*, 1999). Mais recentemente, foi publicado um estudo que analisou *in vivo*, os efeitos causados pela inactivação dos genes que codificam para as imp- $\alpha$  na importação nuclear (Quensel *et al.*, 2004). De acordo com os ensaios de importação nuclear *in vitro*, a nucleoplasmina é importada, independentemente dos genes inactivados, indicando que, pelo menos em algumas vias de importação nuclear, as diferentes imp- $\alpha$  desempenham funções idênticas. Por outro lado, certas proteínas, como por exemplo a proteína RCC1, utilizam preferencialmente uma determinada imp- $\alpha$  para acederem ao núcleo das células (Miyamoto *et al.*, 1997, Talcott and Moorre, 2000). Estudos de ligação *in vitro* mostraram que a proteína RCC1 liga-se com maior afinidade à imp- $\alpha$ 3 (Kohler *et al.*, 1999; Talcott and Moore, 2000). A inactivação do gene que codifica para a imp- $\alpha$ 3, resulta numa inibição da importação nuclear da proteína RCC1 em 50% das células analisadas, sugerindo que a utilização preferencial de uma imp- $\alpha$  é determinada pela especificidade da interacção imp- $\alpha$ /substrato (Quensel *et al.*, 2004). Apesar dos mecanismos que determinam a especificidade da ligação da imp- $\alpha$  com os substratos não se encontrarem totalmente esclarecidos, sabe-se que os aminoácidos que formam os NLS contribuem para a interacção preferencial de uma imp- $\alpha$  com o substrato. Num estudo recente, Friedrich *et al.* (2006) mostraram que as sequências de aminoácidos que formam os NLS não são suficientes para explicar a especificidade imp- $\alpha$ /substrato. A fusão do NLS da proteína RCC1 com a nucleoplasmina, resulta num aumento da afinidade da proteína quimérica pela imp- $\alpha$ 3, quando comparada com a nucleoplasmina nativa (Friedrich *et al.*, 2006). Verificou-se, contudo que na presença da proteína RCC1 nativa, a nucleoplasmina fundida com o NLS da proteína RCC1 é incapaz de estabelecer interacção com a imp- $\alpha$ 3 (Friedrich *et al.*, 2006). Estes resultados indicam que a conformação da proteína onde o NLS está inserido contribui igualmente para a especificidade da ligação imp- $\alpha$ /substrato. Para além disso, os resultados sugerem que a capacidade de uma dada imp- $\alpha$  mediar a importação nuclear de proteínas é condicionada pela presença de mais substratos. Ensaios de importação nuclear realizados *in vitro*, mostraram que a proteína P/CAF, tal como a nucleoplasmina, quando testada isoladamente é eficientemente importada para o núcleo por todas as imp- $\alpha$  (Kohler *et al.*, 1999). No entanto, na presença da nucleoplasmina, a importação nuclear da proteína P/CAF é preferencialmente mediada pela imp- $\alpha$ 3. A maioria dos ensaios realizados *in vitro*, com o objectivo de avaliar a capacidade das imp- $\alpha$  estabelecerem interacção com substratos específicos, foi efectuada com proteínas recombinantes. Seguindo esta metodologia, Miyamoto *et al.* (1997) constataram que as imp- $\alpha$ 1 e imp- $\alpha$ 2 humanas são capazes de

reconhecer substratos diferentes, com afinidades idênticas, sugerindo que as duas imp- $\alpha$  desempenham funções equivalentes na importação nuclear. Registaram-se contudo, diferenças na ligação das duas imp- $\alpha$  com os substratos analisados, quando utilizados extractos proteicos de células HeLa. Apenas a imp- $\alpha$ 2 nativa mantém a capacidade de se ligar a todos os NLS testados, indicando que a ligação da imp- $\alpha$ 1 aos NLS é condicionada pela presença de proteínas celulares (Miyamoto *et al.*, 1997).

A imp- $\beta$ , para além de ser, conjuntamente com a imp- $\alpha$ , responsável pela importação nuclear de proteínas que possuem NLS clássicos, participa em vias de importação nuclear, que ocorrem de um modo independente da imp- $\alpha$ . É o caso das ribonucleoproteínas UsnRNP, componentes do spliceossoma, e da proteína de replicação A (RPA).

A maioria das pequenas ribonucleoproteínas nucleares ricas em uridina (UsnRNP) do spliceossoma passam por etapas de maturação, fundamentais para a sua função no processamento do mRNA, no citoplasma das células. A biogénese das ribonucleoproteínas UsnRNP, inicia-se no núcleo das células com a transcrição de UsnRNAs precursores. Tal como os mRNAs, os UsnRNAs são modificados nas terminações 5', pela adição de uma guanosina monometilada (m7GpppG), designada de estrutura *cap* (Kiss, 2004). De acordo com o que foi descrito na introdução do capítulo II desta tese, a estrutura *cap* e as proteínas CBP20 e CBP80, formam o sinal responsável pela exportação nuclear dos UsnRNAs. No citoplasma das células, após dissociação das proteínas PHAX e CRM1, formam-se complexos ribonucleoproteicos entre os UsnRNAs e sete proteínas Sm (Kiss, 2004). A componente de RNA das ribonucleoproteínas recém-formadas é novamente modificada por hipermetilação da estrutura *cap*, constituindo um dos sinais que contribui para a importação nuclear das ribonucleoproteínas UsnRNP (Rollenhagen and Panté, 2006). Para além da estrutura *cap* hipermetilada, as ribonucleoproteínas UsnRNP maduras, possuem um segundo sinal de localização nuclear, ainda não identificado, na sua componente proteica constituída pelas proteínas Sm (Rollenhagen and Panté, 2006).

A importância da estrutura *cap* hipermetilada na importação nuclear não é igual para todas as ribonucleoproteínas UsnRNP em oócitos de *Xenopus*, verificando-se que as ribonucleoproteínas U1/U2snRNP são mais dependentes da estrutura *cap* hipermetilada do que as ribonucleoproteínas U4/U5snRNP. Em células somáticas, a estrutura *cap* não tem um papel essencial na importação nuclear das ribonucleoproteínas UsnRNP (Marshallsay and Luhrmann, 1994). No entanto, a presença deste elemento torna o transporte nuclear das ribonucleoproteínas UsnRNP mais eficiente, sugerindo que a estrutura *cap* hipermetilada participa na importação nuclear (Fischer *et al.*, 1994).

A importação nuclear das ribonucleoproteínas UsnRNP é mediada pela imp- $\beta$  (Palacios *et al.*, 1997). Contudo, contrastando com as proteínas contendo NLS clássicos, o transporte nuclear das ribonucleoproteínas UsnRNP é independente da presença da imp- $\alpha$  (Palacios *et al.*, 1997). Estes resultados pressupõem que a importação nuclear das ribonucleoproteínas UsnRNP pode ocorrer por um mecanismo que envolve a ligação directa da imp- $\beta$  às ribonucleoproteínas UsnRNP, ou em alternativa, por intermédio de uma proteína adaptadora diferente da imp- $\alpha$ . O facto da importação nuclear das ribonucleoproteínas UsnRNP, ser inibida na presença de quantidades saturáveis de análogos da estrutura *cap*, bem como, na presença do domínio central das ribonucleoproteínas UsnRNP, sugere a participação de dois receptores de transporte (Fischer *et al.*, 1993). Dado que a importação nuclear das ribonucleoproteínas UsnRNP menos dependentes da estrutura *cap* hipermetilada, é igualmente bloqueada por inactivação da imp- $\beta$ , o modelo hipotético para a importação nuclear das ribonucleoproteínas UsnRNP envolve duas proteínas adaptadoras que estabelecem interacção com a imp- $\beta$  (Palacios *et al.*, 1997). A ligação da imp- $\beta$  à estrutura *cap* hipermetilada da componente de RNA das ribonucleoproteínas UsnRNP ocorre por intermédio da proteína snurportina (Huber *et al.*, 1998). O domínio de ligação à imp- $\beta$ , situado na extremidade N-terminal da snurportina possui uma sequência de 40 aminoácidos com elevada homologia com o domínio IBB da imp- $\alpha$  (Huber *et al.*, 1998). Tal como se verifica para a imp- $\alpha$ , os resíduos básicos do domínio IBB da snurportina são essenciais para a ligação com a imp- $\beta$  (Huber *et al.*, 1998). A inibição quase total da importação nuclear das ribonucleoproteínas UsnRNP, após microinjecção de uma forma mutante da snurportina, sem o domínio IBB, em oócitos de *Xenopus*, realça a importância da ligação da imp- $\beta$  à snurportina na importação nuclear (Huber *et al.*, 1998). O domínio IBB da snurportina possui um segundo local de ligação à imp- $\beta$ , com elevada homologia com uma região da nucleoporina Nup153 (Mitrousis *et al.*, 2008). A nucleoporina Nup153, residente na face nuclear do NPC, estabelece interacção com vários receptores de transporte, entre eles a imp- $\beta$  (Walther *et al.*, 2001). Uma vez que a imp- $\beta$  apresenta maior afinidade de ligação para a nucleoporina Nup153 do que para a região homóloga da snurportina, a interacção da imp- $\beta$  com a nucleoporina Nup153, poderá contribuir, à semelhança da ligação da imp- $\alpha$  com a Nup2/Nup50, para a dissociação da snurportina da imp- $\beta$  (Mitrousis *et al.*, 2008). O retorno da snurportina ao citoplasma é mediado pela exportina CRM1 associada à proteína RanGTP (Paraskeva *et al.*, 1999).

De acordo com Huber *et al.* (2002), a snurportina juntamente com a imp- $\beta$ , é capaz de promover a importação nuclear de ribonucleoproteínas UsnRNP *in vitro*, sendo este mecanismo dependente da presença da estrutura *cap* hipermetilada. Pelo contrário, as

ribonucleoproteínas UsnRNP sem a estrutura *cap* hipermetilada, ficam retidas no citoplasma das células, na ausência de outros factores celulares. Estes resultados sustentam a hipótese da importação nuclear das ribonucleoproteínas UsnRNP envolver duas proteínas adaptadoras. Mostrando ainda, que pelo menos *in vitro*, a via de importação nuclear mediada pela snurportina e imp- $\beta$  funciona de um modo autónomo da que é sinalizada pela componente proteica das ribonucleoproteínas UsnRNP (Huber *et al.*, 2002). Presentemente, desconhece-se a natureza do(s) factor(es) envolvidos na via de importação de nuclear sinalizada pelo NLS do domínio central das ribonucleoproteínas UsRNP. Existem porém, evidências que apontam para a participação do complexo SMN e a proteína *zinc finger* ZPR1 (Narayanan *et al.*, 2002). A proteína *zinc finger* ZPR1 foi implicada no transporte nuclear do complexo SMN. Uma das funções do complexo SMN é coordenar a associação das proteínas Sm aos UsnRNAs. Este complexo permanece associado às ribonucleoproteínas UsRNP após ligação da snurportina à estrutura *cap* hipermetilada. Curiosamente, verificou-se que o complexo SMN interage directamente com a imp- $\beta$  *in vitro*, e que a proteína *zinc finger* ZPR1 é capaz de interagir com a snurportina, sendo esta interacção dependente da presença de RNA. O facto do complexo SMN permanecer associado às ribonucleoproteínas UsnRNP durante as etapas citoplasmáticas da biogénese das ribonucleoproteínas UsnRNP (Massenet *et al.*, 2002) e estabelecer ligação directa com a imp- $\beta$  indica uma possível participação deste complexo no transporte nuclear. Com efeito, foi demonstrado que o complexo SMN e a imp- $\beta$ , são capazes de reverter o efeito inibitório da depleção da snurportina na importação nuclear das ribonucleoproteínas UsnRNP em células semi-permeabilizadas com digitonina (Narayanan *et al.*, 2004). Compatível com a ideia do complexo SMN funcionar como adaptador entre o domínio central das ribonucleoproteínas UsnRNP e a imp- $\beta$ , a depleção dos complexos SMN intracelulares causa uma inibição na importação nuclear da ribonucleoproteína U1snRNP. Porém, o transporte nuclear só é normalizado após adição de complexos SMN funcionais purificados a partir de extractos celulares. O complexo SMN formado por proteínas recombinantes é incapaz de reverter o efeito inibitório na importação nuclear da ribonucleoproteína U1snRNP, apontando para o envolvimento de outros factores celulares neste processo. De acordo com esta hipótese, constatou-se que *in vivo* a interacção da imp- $\beta$  com o complexo SMN é indirecta e dependente de RNA (Narayanan *et al.*, 2004).

Tal como acontece com as ribonucleoproteínas UsRNP do spliceossoma, a importação nuclear da proteína de replicação A (RPA) ocorre via imp- $\beta$ , por um mecanismo independente da imp- $\alpha$ . Neste caso, a proteína adaptadora entre a proteína RPA e a imp- $\beta$  é a XRIP $\alpha$  (Jullien *et al.*, 1999). O domínio de ligação da proteína XRIP $\alpha$  à imp- $\beta$  situa-se na extremidade N-terminal da

proteína, sendo constituído por uma sequência de aminoácidos básicos, rica em resíduos de arginina. A proteína RPA parece constituir o único substrato da proteína XRIP $\alpha$ , uma vez que, a depleção da proteína RPA resulta na remoção, quase total, da proteína XRIP $\alpha$  dos extractos proteicos (Jullien *et al.*, 1999).

A imp- $\beta$  é o único receptor de transporte da família das carioferinas- $\beta$  que utiliza proteínas adaptadoras para estabelecer interacção com os seus substratos. No entanto, a imp- $\beta$ , à semelhança dos restantes membros da família, participa em vias de importação nuclear sem o intermédio de proteínas adaptadoras. A proteína Rex, codificada pelo vírus HTLV-1, é importada por um mecanismo que envolve a ligação directa da imp- $\beta$  a um péptido sinal rico em resíduos de arginina (Palmeri and Malim, 1999). As histonas e as proteínas ribossomais são exemplos de proteínas celulares que possuem sinais de localização nuclear, reconhecidos directamente pela imp- $\beta$ , sem o envolvimento de proteínas adaptadoras. Contrastando, com a proteína Rex, as histonas e as proteínas ribossomais não dependem exclusivamente da imp- $\beta$  para entrarem no núcleo das células (Jakel and Gorlich, 1998; Muhlhauser *et al.*, 2001). Várias proteínas da família das carioferinas- $\beta$  foram implicadas no transporte nuclear destas proteínas, incluindo a transportina, proteína responsável pela importação nuclear de mais de 20 proteínas envolvidas no processamento do mRNA, tais como a hnRNP A1 e a TAP (Lee *et al.*, 2006). A par das suas funções na importação nuclear, as importinas funcionam como chaperonas de proteínas muito básicas impedindo que estas formem agregados insolúveis no citoplasma das células (Jakel *et al.*, 2002).

### III.1.4 A IMPORTAÇÃO NUCLEAR DO ANTIGÉNIO DELTA

O genoma do HDV possui uma única grelha de leitura da qual derivam duas formas de uma única proteína, o antigénio delta. Os antigénios delta, tal como o RNA do HDV localizam-se predominantemente no núcleo das células (Cunha *et al.*, 1998). Não obstante, as suas pequenas dimensões, 24 kDa para o S-HDAg e 27 kDa para o L-HDAg, compatíveis com o movimento passivo através do poro nuclear, as evidências sugerem que o transporte nuclear dos HDAgs é dirigido por péptidos sinais específicos. Utilizando abordagens experimentais similares, embora com o recurso a proteínas repórter diferentes, foram identificados dois motivos na sequência de aminoácidos do HDAg com propriedades de sinais de localização nuclear (Chang *et al.*, 1992; Xia *et al.*, 1992). Um dos motivos identificados, localizado entre os aminoácidos 67 a 88 do HDAg (<sup>67</sup>GAPPAK $\underline{\text{KLRMDQMEIDAGPRKR}}$ <sup>88</sup>), consiste numa

sequência bipartida de aminoácidos básicos. De acordo com Xia *et al.* (1992), as sequências <sup>69</sup>PPAKKLR<sup>75</sup> e <sup>85</sup>PRKR<sup>88</sup> do HDAG, são necessárias e suficientes para a importação nuclear da proteína repórter  $\alpha$ -globina. A análise dos dois domínios separadamente, evidenciou a necessidade das duas sequências com aminoácidos básicos para a actividade do NLS do HDAG. A proteína  $\alpha$ -globina fundida com os aminoácidos 67 a 77 do HDAG apresenta uma localização intracelular mista, distribuindo-se no núcleo e citoplasma. Por outro lado, a  $\alpha$ -globina fundida com os aminoácidos 85 a 88 do HDAG, localiza-se somente no citoplasma, indicando que o segundo domínio do NLS do HDAG é defectivo na importação nuclear (Xia *et al.*, 1992). Utilizando a  $\beta$ -galactosidase como proteína repórter, Chang *et al.* (1992), identificaram um segundo NLS no HDAG capaz de promover a importação nuclear de proteínas heterólogas. Este NLS, situado entre os aminoácidos 35 a 44 do HDAG, apresenta elevada homologia com o NLS NL1 do receptor de glucocorticóides (Picard and Yamamoto, 1987). No que diz respeito ao NLS bipartido do HDAG, situado entre os aminoácidos 67 a 88, Chang *et al.* (1992) mostrou que o segundo domínio do NLS é capaz de promover a importação nuclear da proteína repórter. Para além das discrepâncias encontradas nos dois estudos, quanto ao número de NLS presentes e sua composição aminoacídica, há a referir que nenhum dos estudos procurou averiguar o papel dos NLS identificados na importação do HDAG nativo.

Um estudo posterior mostrou que o NLS bipartido do HDAG é essencial para a importação nuclear do HDAG fundido com a proteína GST, em células HeLa semi-permeabilizadas com digitonina. Para além disso, verificou-se que a importação nuclear do RNA do HDV, depende da presença do HDAG com um NLS funcional. O facto do NLS do HDAG ser determinante para a importação nuclear do RNA do vírus, sugere que o RNA do HDV é transportado para o núcleo, em associação com o HDAG (Chou *et al.*, 1998). Com efeito, demonstrou-se que a ligação do HDAG ao RNA, é condição necessária para que o RNA viral seja transportado para o núcleo. Na tentativa de identificar quais as vias de importação nuclear utilizadas pelas RNPs do HDV, foi testada a capacidade do antigénio delta interagir com duas proteínas da família das imp- $\alpha$ . Estudos de ligação *in vitro* mostraram que o HDAG liga-se especificamente à imp- $\alpha$ 2, sendo esta ligação dependente da presença da sequência de aminoácidos que constitui o NLS bipartido do HDAG (Chou *et al.*, 1998). O papel da imp- $\alpha$ 2 na importação nuclear do HDAG não foi ainda esclarecido.



## III.2 OBJECTIVOS

---

O trabalho descrito neste capítulo teve como objectivos:

- (1) Identificar o(s) sinais de localização nuclear presentes na sequência de aminoácidos do antígeno delta capazes de promover a importação nuclear de uma proteína repórter.
- (2) Averiguar o papel do(s) sinais de localização nuclear do HDAg identificados na distribuição intracelular da proteína nativa.
- (3) Identificar eventuais proteínas celulares que interagem com o(s) NLS do HDAg.



## III.3 MATERIAIS E MÉTODOS

---

### III.3.1 VECTORES

#### III.3.1.1 VECTOR pcDNA1-*c-myc*-PK

Com o objectivo de identificar o sinal de localização nuclear (NLS) do HDAg recorreu-se ao vector repórter pcDNA1-*c-myc*-PK (Michael *et al.*, 1997). Este vector codifica a proteína cinase de piruvato de galinha (aminoácidos 12 a 443) fundida na extremidade N-terminal com o epítipo 9E10 da proteína *c-myc*.

Os vectores pcDNA1-*c-myc*-PK foram amplificados na estirpe MC1061/P3 (Invitrogen) de *E. coli*, específica para a propagação de vectores que codificam o supressor do tRNA tirosina (*supF*). Estas bactérias são portadoras de um plasmídeo *low copy*, o P3, que contém os genes que codificam marcadores de resistência à ampicilina, tetraciclina e canamicina. Porém, devido à presença de um codão amber nas suas sequências, os genes que codificam os factores de resistência à ampicilina e tetraciclina só se tornam activos após a transformação das bactérias com um plasmídeo que possua o gene *supF* de *E. coli*. Este gene codifica um tRNA que reconhece os codões amber dos mRNAs como codões tirosina, permitindo assim a tradução completa das proteínas envolvidas na resistência aos antibióticos ampicilina e tetraciclina.

### III.3.1.2 CLONAGEM DE SEQUÊNCIAS DE cDNA DO HDAg NO VECTOR pcDNA1-c-myc-PK

Os fragmentos de cDNA, que codificam sequências de aminoácidos do antígeno delta, com dimensões superiores a 100 bp, foram obtidos por PCR, utilizando pares de *primers* específicos, cujas sequências são apresentadas na tabela III.3.1. Os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa de computador Primer Express<sup>TM</sup>1.5 (Applied Biosystems). Todos os *primers forward* e *reverse*, com exceção do *primer reverse* do primeiro par e o *primer forward* do segundo par de *primers* utilizados para amplificar as sequências que codificam os aminoácidos 92 a 195 e 13 a 67 do HDAg, possuem uma sequência extra com um local de restrição para as enzimas *MunI* e *Sall*, nas extremidades 5', respectivamente. Os *primers forward* e *reverse* sintetizados para amplificação dos fragmentos que codificam os aminoácidos 92 a 195 e 13 a 67 do HDAg, possuem um local de restrição *XbaI*. Os locais de restrição *MunI* e *Sall* foram adicionados para criar nos fragmentos amplificados por PCR extremidades coesivas, compatíveis com as resultantes da hidrólise enzimática do vector pcDNA1-c-myc-PK com as enzimas *EcoRI* e *XhoI*. Da ligação de duas extremidades coesivas originadas por digestão com as endonucleases *EcoRI* e *MunI* resulta uma sequência de seis nucleótidos GAATTG incapaz de ser hidrolisada pela enzimas que lhe deram origem. O mesmo se verifica para a sequência resultante da ligação de duas extremidades coesivas geradas por hidrólise enzimática com as enzimas *XhoI* e *Sall*.

AMINOÁCIDOS DO HDAg	<i>Forward primer</i> 5' → 3'	<i>Reverse primer</i> 5' → 3'
13-a-112	TTTC↓AATTGAGAGAAGAGATCCTCGAGCAGTG	TTTG↓TCGACCTTGCTGAGGTTCTTGCCCTC
34-a-116	TTTC↓AATTGACCTCCGGAAGACAAAGAAG	TTTG↓TCGACGCCGATAGCTGCTTCTTCTTG
58-a-116	TTTC↓AATTGCTCGGAAAGAAGGATAAGGATGG	TTTG↓TCGACGCCGATAGCTGCTTCTTCTTG
58-a-88	TTTC↓AATTGCTCGGAAAGAAGGATAAGGATGG	TTTG↓TCGACCCTCTCCGAGGTCCGGAGT
13-a-55	TTTC↓AATTGAGAGAAGAGATCCTCGAGCAGTG	TTTG↓TCGACCCAGGGATTTTCGTCTCTATC
13-a-67	TTTC↓AATTGAGAGAAGAGATCCTCGAGCAGTG	TTTT↓CTAGACCCCTCTCCATCCCTTATCCTTC
92-a-195	TTTT↓CTAGAGGAGGATTCACCGACAAGGA	TTTG↓TCGACGGAAATCCCTGGTTTCCCT
88-a-116	TTTC↓AATTGCCTCTCAGGGGAGGATTCAC	TTTG↓TCGACGCCGATAGCTGCTTCTTCTTG
61-a-88	TTTC↓AATTGAAGGATGGAGAGGGG	TTTG↓TCGACCCTCTCCGAGGTCCGGAGT

Legenda: C↓AATTG- local de restrição da enzima *MunI*; T↓CTAGA- local de restrição da enzima *XbaI*; G↓TCGAC- local de restrição da enzima *Sall*

**Tabela III.3.1.** Sequências dos *primers* sintéticos utilizados na amplificação por PCR de sequências específicas de cDNA do HDAg.

As reacções de PCR foram efectuadas num volume total de 50 µl, contendo 50 ng de DNA molde, tampão de PCR (75 mM Tris-HCl, pH 8.8 a 25°C, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% Tween-20), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP, 0.5 pmol/µl de cada *primer* e 2.5 U polimerase de DNA *Taq* (Fermentas). Após desnaturação inicial a 95°C, durante 3 minutos, as amostras foram sujeitas a 25-30 ciclos de amplificação (30 segundos a 94°C, 45 segundos a temperatura variável, consoante a temperatura de fusão dos *primers*, 60 segundos a 72°C). A extensão final decorreu a 72°C, durante 10 minutos. Uma vez finalizadas as reacções de amplificação, os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose e purificados com o kit GFX PCR DNA and gel band purification (GE Healthcare). De seguida, procedeu-se à hidrólise enzimática com as enzimas *MunI* e *Sall*, para posterior inserção dos produtos de PCR entre os locais *EcoRI* e *XhoI* do vector pcDNA1-*c-myc*-PK. As reacções de restrição foram, regra geral, efectuadas entre 3 a 16 horas, a 37°C, num volume final de 20 µl contendo 1 µg, tampão de reacção da enzima, e 10 U de endonuclease.

Para a construção do vector pcDNA1-*c-myc*-PK-HDAgΔ68-a-91, os cDNAs que codificam os aminoácidos 13 a 67 e 92 a 195 do HDAg, foram digeridos com as enzimas de restrição *MunI* e *XbaI* e *XbaI* e *Sall*, respectivamente. De seguida, as extremidades coesivas resultantes da digestão dos dois cDNAs com a enzima *XbaI* foram ligadas, obtendo-se um fragmento único que codifica para o HDAg sem os aminoácidos 68 a 91. A reacção de ligação foi efectuada por incubação dos dois fragmentos durante 4 horas, a 22°C, na presença de 5U de T4 DNA ligase (Fermentas).

As sequências de cDNA do HDV com tamanhos inferiores a 100 bp foram obtidas por emparelhamento *in vitro* de oligonucleótidos sintéticos de cadeia simples, complementares (Tabela III.3.2).

AMINOÁCIDOS DO HDAg	SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS 5' → 3'	
58-a-67	Forward	<b>AATT</b> GCTCGGAAAGAAGGATAAGGATGGAGAGGGGG
	Reverse	<b>TCGA</b> CCCCCTCTCCATCCTTATCCTTCTTTCCGAGC
64-a-88	Forward	<b>AATT</b> GGATGGAGAGGGGGCTCCCCCGGAAGAGGGCCCGAACGGACCAGATGGAGGTA GACTCCGGACCTCGGAAGAGGG
	Reverse	<b>TCGA</b> CCCTCTTCCGAGGTCCGGAGTCTACCTCCATCTGGTCCGTTCCGGGCCCTTTTCGC GGGGGAGCCCCCTCTCCATCC
65-a-88	Forward	<b>AATT</b> GGGAGAGGGGGCTCCCCCGGAAGAGGGCCCGAACGGACCAGATGGAGGTAGAC TCCGGACCTCGGAAGAGGG
	Reverse	<b>TCGA</b> CCCTCTTCCGAGGTCCGGAGTCTACCTCCATCTGGTCCGTTCCGGGCCCTTTTCGC GGGGGAGCCCCCTCTCCC
66-a-88	Forward	<b>AATT</b> GGAGGGGGCTCCCCCGGAAGAGGGCCCGAACGGACCAGATGGAGGTAGACTCC GGACCTCGGAAGAGGG
	Reverse	<b>TCGA</b> CCCTCTTCCGAGGTCCGGAGTCTACCTCCATCTGGTCCGTTCCGGGCCCTTTTCGC GGGGGAGCCCCCTCC
67-a-88	Forward	<b>AATT</b> CGGGGCTCCCCCGGAAGAGGGCCCGAACGGACCAGATGGAGGTAGACTCCGGA CCTCGGAAGAGGC
	Reverse	<b>TCGA</b> GCCTCTTCCGAGGTCCGGAGTCTACCTCCATCTGGTCCGTTCCGGGCCCTTTTCGC GGGGGAGCCCCG
A <sup>86</sup> A <sup>87</sup> A <sup>88</sup>	Forward	<b>AATT</b> GGATGGAGAGGGGGCTCCCCCGGAAGAGGGCCCGAACGGACCAGATGGAGGTA GACTCCGGACCTGCGGCAGCAG
	Reverse	<b>TCGA</b> TGCTGCCGAGGTCCGGAGTCTACCTCCATCTGGTCCGTTCCGGGCCCTTTTCGC GGGGGAGCCCCCTCTCCATCC
A <sup>86</sup> K <sup>87</sup> A <sup>88</sup>	Forward	<b>AATT</b> GGATGGAGAGGGGGCTCCCCCGGAAGAGGGCCCGAACGGACCAGATGGAGGTA GACTCCGGACCTGCGAAGGCAG
	Reverse	<b>TCGA</b> TGCCTTCCGAGGTCCGGAGTCTACCTCCATCTGGTCCGTTCCGGGCCCTTTTCGC GGGGGAGCCCCCTCTCCATCC
R <sup>86</sup> A <sup>87</sup> R <sup>88</sup>	Forward	<b>AATT</b> GGATGGAGAGGGGGCTCCCCCGGAAGAGGGCCCGAACGGACCAGATGGAGGTA GACTCCGGACCTGCGAAGGCAG
	Reverse	<b>TCGA</b> CCCTTCCCGAGGTCCGGAGTCTACCTCCATCTGGTCCGTTCCGGGCCCTTTTCGC GGGGGAGCCCCCTCTCCATCC
66-a-75	Forward	<b>AATT</b> GGAGGGGGCTCCCCCGGAAGAGGGCCGAG
	Reverse	<b>TCGA</b> CTCGGGCCCTCTTCGCGGGGGGAGCCCCCTCC
E <sup>66</sup> A-a-75	Forward	<b>AATT</b> GGCAGGGGCTCCCCCGGAAGAGGGCCGAG
	Reverse	<b>TCGA</b> CTCGGGCCCTCTTCGCGGGGGGAGCCCCTGCC
76-a-88	Forward	<b>AATT</b> GACGGACCAGATGGAGGTAGACTCCGGACCTCGGAAGAGGG
	Reverse	<b>TCGA</b> CCCTCTTCCGAAGTCCGGAGTCTACCTCCATCTGGTCCGTC
66-a-74	Forward	<b>AATT</b> GGAGGGGGCTCCCCCGGAAGAGGGCCG
	Reverse	<b>TCGA</b> CGGCCCTCTTCGCGGGGGGAGCCCCCTCC
3X-HDAg NLS	Forward	<b>AATT</b> GGAGGGGGCTCCCCCGGAAGAGGGCCGAGAGGGGGCTCCCCCGGAAGAGG GCCCCGAGAGGGGGCTCCCCCGGAAGAGGGCCGAC
	Reverse	<b>TCGA</b> TCTCGGGCCCTCTTCGCGGGGGGAGCCCCCTCTCGGGCCCTCTTCGCGGGGGGAGC CCCCCTCTCGGGCCCTCTTCGCGGGGGGAGCCCCCTCC

**Tabela III.3.2.** Sequências dos oligonucleótidos sintéticos utilizados para gerar sequências específicas de cDNA do HDAg. Os nucleótidos que formam as extremidades coesivas compatíveis com as resultantes da digestão com *EcoRI* e *XhoI* são apresentados a vermelho e a azul, respectivamente.

A ligação dos oligonucleótidos de cadeia simples e complementares foi efectuada por diluição das duas moléculas de DNA na razão molar de 1:1 em tampão de emparelhamento (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA). A mistura contendo 10  $\mu$ M de cada oligonucleótido foi incubada a 95°C, durante 5 minutos num banho seco, para eliminar todas as estruturas secundárias existentes. O emparelhamento das sequências complementares, após a desnaturação inicial, foi efectuada por arrefecimento gradual das amostras, à temperatura ambiente. Como os oligonucleótidos sintéticos de cadeia dupla possuem extremidades coesivas compatíveis com as que resultam da digestão do vector pcDNA1-*c-myc*-PK com as enzimas *Eco*RI e *Xho*I, estes foram directamente clonados no vector linearizado. A clonagem dos fragmentos de cDNA, obtidos por PCR ou por ligação de oligonucleótidos sintéticos de cadeia simples e complementares, no vector pcDNA1-*c-myc*-PK, foi levada a cabo por incubação a 22°C, durante quatro horas, com 5U de T4 DNA ligase (Fermentas).

As clonagens no vector pcDNA1-*c-myc*-PK foram efectuadas de modo a manter a continuidade da grelha de leitura entre a proteína *c-myc*-PK e as sequências de aminoácidos do HDAg. Após inserção dos fragmentos de cDNA que codificam para diferentes porções do antigénio delta no vector pcDNA1-*c-myc*-PK, as misturas de ligação foram usadas para transformar bactérias *E. coli*, MC1061/P3, de acordo com o método do cloreto de cálcio (Sambrook *et al.*, 1989). Os plasmídeos recombinantes resultantes foram analisados em gel de agarose após digestão com endonucleases de restrição apropriadas. Note-se que todos os vectores construídos foram sequenciados recorrendo aos serviços de sequenciação da empresa STAB VIDA.

Nas tabelas III.3.3, III.3.4 e III.3.5 são apresentados os padrões de restrição dos vectores construídos, após digestão com as enzimas *Apo*I e *Ban*II.

Fragmentos resultantes da digestão dos vectores pcDNA1- <i>c-myc</i> -PK com <i>Ban</i> II					
parental	67-88	13-112	34-116	58-116	HDAg $\Delta$ 68-91
					1436
1402	1402	1402	1402	1402	1402
1236	1236	1236	1236	1236	1236
1220	1220	1220	1220	1220	1220
		1099			
			1039		
1005					
				964	
	937				
480	480	480	480	480	480
			151	151	
		137			
	65				
	18	18	18	18	

**Tabela III.3.3.** Dimensões dos fragmentos de DNA, em bp, originados por hidrólise enzimática do vector pcDNA1-*c-myc*-PK e dos vectores que codificam a proteína *c-myc*-PK fundida com as aminoácidos 67 a 88, 13 a 112, 34 a 116, 58 a 116 do HDAg e com o HDAg $\Delta$ 68-91, com a enzima de restrição *Ban*II.

Fragmentos resultantes da digestão dos vectores pcDNA1- <i>c-myc</i> -PK com <i>ApoI</i>								
parental	13-55	58-88	88-116	61-88	64-88	65-88	66-88	58-67
1458	1458	1458	1458	1458	1458	1458	1458	1458
1259	1259	1259	1259	1259	1259	1259	1259	1259
	897							
		876						
			869					
				867				
					858			
						855		
							852	
								814
794	794	794	794	794	794	794	794	794
639								
528	528	528	528	528	528	528	528	528
459	459	459	459	459	459	459	459	459
195								
11	11	11	11	11	11	11	11	11

**Tabela III.3.4.** Dimensões dos fragmentos de DNA, em bp, originados por hidrólise enzimática do vector pcDNA1-*c-myc*-PK e dos vectores que codificam a proteína *c-myc*-PK fundida com os aminoácidos 13 a 55, 58 a 88, 88 a 116, 61 a 88, 64 a 88, 65 a 88, 66 a 88 e 58 a 67 do HDAg, com a enzima de restrição *ApoI*.

Fragmentos resultantes da digestão dos vectores pcDNA1- <i>c-myc</i> -PK com <i>ApoI</i>								
parental	66-74	66-75	E66A-75	A <sup>86</sup> A <sup>87</sup> A <sup>88</sup>	A <sup>86</sup> A <sup>88</sup>	K <sup>87</sup> A	76-88	3X-NLS
1458	1458	1458	1458	1458	1458	1458	1458	1458
1259	1259	1259	1259	1259	1259	1259	1259	1259
								873
				858	858	858		
							823	
		813	813					
	810							
794	794	794	794	794	794	794	794	794
639								
528	528	528	528	528	528	528	528	528
459	459	459	459	459	459	459	459	459
195								
11	11	11	11	11	11	11	11	11

**Tabela III.3.5.** Dimensões dos fragmentos de DNA, em bp, originados por hidrólise enzimática do vector pcDNA1-*c-myc*-PK e dos vectores que codificam a proteína *c-myc*-PK fundida com os aminoácidos 66 a 74, 66 a 75, E66A-75, A<sup>86</sup>A<sup>87</sup>A<sup>88</sup>, A<sup>86</sup>A<sup>88</sup>, K<sup>87</sup>A, 76 a 88 e 3X-NLS do HDAg, com a enzima de restrição *ApoI*.

### III.3.1.3 CONSTRUÇÃO DO VECTOR pGFP-C1-S-HDAgΔNLS

Para a construção do vector pGFP-C1-S-HDAgΔNLS iniciou-se por digerir o vector de expressão eucariota pGFP-C1-S-HDAg (Tavanez *et al.*, 2001) com as endonucleases *HindIII* e *SalI* (Fermentas). As enzimas de restrição *HindIII* e *SalI* reconhecem dois locais de corte no vector pGFP-C1-S-HDAg e originam, após hidrólise enzimática, dois fragmentos, um com 4714 bp e outro com 651 bp. O fragmento maior que corresponde ao vector pGFP-C1 linearizado, sem o cDNA que codifica para o S-HDAg, foi separado por electroforese em gel de agarose

*low melting point* 2% e purificado com o kit GFX PCR DNA and gel band purification (GEHealthcare).

O cDNA que codifica para o S-HDAg, sem os aminoácidos que formam o NLS, foi sintetizado por amplificação, por PCR, de duas sequências que codificam os aminoácidos 1 a 65 e 75 a 195 do S-HDAg. Os *primers forward* e *reverse* utilizados nas reacções de amplificação (Tabela III.3.6) possuem nas suas extremidades 5' uma sequência extra que contém locais de restrição específicos. Foi introduzido um local de restrição da enzima *Xba*I no *primer reverse* do primeiro par de *primers* e no *forward* do segundo par para posterior ligação dos dois fragmentos amplificados por PCR, e sítios de restrição para as enzimas *Hind*III e *Sal*I no *primer forward* do primeiro par e no *reverse* do segundo par de *primers*, respectivamente, para posterior inserção do fragmento ligado no vector pGFP-C1.

Aminoácidos do HDAg	Forward primer 5'→3'	Reverse primer 5'→3'
1 a 65 <sup>1</sup>	TTATA↓AGCTTCGATGAGCCGGTCCGAGTCG	TTT↓CTAGATCCATCCTTATCCTTCTTTCCG
75 a 195 <sup>1</sup>	TTT↓CTAGACGAACGGACCAGATGGAGG	TTATG↓TCGACCTATGGAAATCCCTGGTTTCCC
HDAg completo	TTT↓CTAGAATGAGCCGGTCCGAGTCG	TTT↓CTAGACTATGGAAATCCCTGGTTTCCC
1 a 65 <sup>2</sup>	TTT↓CTAGAATGAGCCGGTCCGAGTCG	TTTG↓TCGACTCCATCCTTATCCTTCTTTCCG
75 a 195 <sup>2</sup>	TTTG↓TCGACCGAACGGACCAGATGGAGG	TTT↓CTAGACTATGGAAATCCCTGGTTTCCC

Legenda: <sup>1</sup>- fragmentos clonados no vector pEGFP-C1; <sup>2</sup>-fragmentos clonados no vector pCI-neo; T↓CTAGA - local de restrição da enzima *Xba*I; G↓TCGAC - local de restrição da enzima *Sal*I; A↓AGCTT - local de restrição da enzima *Hind*III

**Tabela III.3.6.** Sequência dos *primers* sintéticos utilizados na amplificação por PCR de sequências específicas de cDNA para construção dos vectores pEGFP-C1-S-HDAgΔNLS, pCI-neo-S-HDAg, pCI-neo-S-HDAgΔNLS e pCI-neo-S-HDAgE66A.

As reacções de ligação foram efectuadas durante 4 horas a 22°C, na presença de 5U de T4 DNA ligase (Fermentas). As misturas de ligação foram utilizadas para transformar bactérias *E. coli* JM109 competentes e a selecção dos vectores recombinantes foi feita por comparação do padrão de restrição dos vectores isolados com o padrão de restrição do vector parental pGFP-C1-SHDAg após digestão com a enzima de restrição *Ap*I (Invitrogen).

### III.3.1.4.1 CONSTRUÇÃO DO VECTOR pCI-neo-S-HDAg

A sequência de cDNA que codifica o S-HDAg completo foi obtida por PCR, utilizando, para o efeito, um par de *primers* sintéticos que possui um sítio de restrição *Xba*I nas extremidades 5'

(Tabela III.3.6). O produto resultante da digestão com *Xba*I foi clonado no vector pCI-neo (Promega) previamente digerido com a mesma enzima de restrição e tratado com fosfatase alcalina de camarão (Fermentas).

#### III.3.1.4.2 CONSTRUÇÃO DO VECTOR pCI-neo-S-HDAg $\Delta$ NLS

A estratégia utilizada para clonar o fragmento de cDNA que codifica o HDAg $\Delta$ NLS no vector pCI-neo (Promega) foi idêntica à utilizada na construção do vector pGFP-C1-S-HDAg $\Delta$ NLS. As sequências de cDNA que codificam os aminoácidos de 1 a 65 e 75 a 195 do HDAg foram amplificadas por PCR, utilizando os pares de *primers* sintéticos indicados na tabela III.3.6. Após as reacções de amplificação, os produtos de PCR foram digeridos com a enzima de restrição *Sal*I e ligados. A sequência de cDNA resultante da reacção de ligação, foi sujeita a nova hidrólise enzimática com a endonuclease *Xba*I, sendo por fim, clonada no vector pCI-neo. O vector resultante codifica o antígeno delta sem os aminoácidos que formam o sinal de localização nuclear.

#### III.3.1.4.3 CONSTRUÇÃO DO VECTOR pCI-neo-S-HDAgE66A

Para a construção do vector pCI-neo-S-HDAgE66A, que codifica o antígeno delta com uma mutação pontual no aminoácido 66, procedeu-se, inicialmente, à hidrólise enzimática do cDNA do HDAg amplificado por PCR com as endonucleases *Eco*RI (Fermentas) e *Apa*I (Invitrogen). As enzimas de restrição *Eco*RI e *Apa*I reconhecem dois locais de clivagem, nas posições 370 e 417, no cDNA do HDAg e, após hidrólise enzimática, geram 3 fragmentos com as seguintes dimensões: 47, 171 e 370 bp. Os fragmentos com 171 e 370 bp que codificam para os aminoácidos 1 a 56 e 76 a 195 do HDAg, respectivamente, foram separados por electroforese em gel de agarose low melting point a 2% e purificados com o kit GFX DNA PCR and gel band purification (GE Healthcare). O fragmento com 47 bp que codifica os aminoácidos 57 a 75 do HDAg do tipo selvagem foi substituído por um oligonucleótido sintético no qual o codão GAG foi substituído GCA, pelo que codifica para os aminoácidos 57 a 75 do HDAg, com um resíduo de alanina na posição 66 (Tabela III.3.7).

Os oligonucleótidos de cadeia simples foram desenhados de modo a criar no produto resultante da hibridação extremidades coesivas compatíveis com as extremidades geradas pela

hidrólise enzimática do cDNA do HDAG com as enzimas *EcoRI* e *Apal*. Após ligação dos dois fragmentos de cDNA com o oligonucleótido de cadeia dupla, procedeu-se à digestão do fragmento ligado com a enzima *XbaI*. Por fim, o cDNA que codifica o S-HDAG<sub>E66A</sub> foi clonado no vector pCl-neo.

Aminoácidos do HDAG	SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS 5' → 3'	
57-a-75	Forward	AATTC <sup>azul</sup> TCGGAAAGAAGGATAAGGATGGAG <sup>vermelho</sup> CA <sup>verde</sup> GGGGCTCCCCCGCGAAGAGGGCC
	Reverse	CTCTTCGCGGGGGAGCCCC <sup>vermelho</sup> TGCTCCATCCTTATCCTTCTTCCGAG

**Tabela III.3.7.** Sequência dos oligonucleótidos sintéticos utilizados na construção do vector pCl-neo-HDAG<sub>E66A</sub>. Os nucleótidos que formam as extremidades coesivas compatíveis com as resultantes da digestão com *EcoRI* e *Apal* são apresentados a azul e a verde, respectivamente. A vermelho está assinalada a sequência que codifica o aminoácido 66.

### III.3.2 CULTURA E TRANSFECCÃO TRANSITÓRIA DE CÉLULAS EUCARIOTAS

A linha celular de fibroblastos de murganho NIH 3T3 foi cultivada em monocamada em meio Dulbecco's Modified Eagle's suplementado com 10% de FBS. As condições de crescimento utilizadas para as células de hepatoma humano Huh7 foram descritas anteriormente. As duas culturas foram mantidas a 37°C, numa atmosfera húmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Para transfecção, as células foram cultivadas sobre lamelas de vidro de 12 x 12 mm, estéreis, até atingirem cerca de 50 a 60% de confluência. Na transfecção foi utilizada a mistura de lípidos comercial FuGENE 6 (Roche) de acordo com as instruções do fabricante e cerca de 1 µg de DNA plasmídico. As células foram analisadas por imunofluorescência, cerca de 24 horas após a transfecção.

### III.3.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRECTA

A distribuição intracelular das proteínas de fusão *c-myc*-PK e do HDAG foi analisada por imunofluorescência indirecta e microscopia confocal. Para imunofluorescência, as células Huh7 ou NIH 3T3 cultivadas em lamelas de 12 x 12 mm, foram lavadas rapidamente em PBS

1X e fixadas com uma solução de formaldeído a 3.7% em PBS 1X à temperatura ambiente, durante 10 minutos. De seguida, as células foram permeabilizadas com 0.5% Triton X-100 em PBS 1X, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Seguiram-se três lavagens de cinco minutos com PBS 1X contendo com 0.05% de Tween-20 (PBS-T). Imediatamente a seguir à última lavagem, as células foram incubadas durante uma hora com os anticorpos primários diluídos 1:100 em PBS-T. Após incubação realizaram-se três lavagens de cinco minutos com PBS-T e efectuou-se nova incubação com os anticorpos secundários. As incubações com os anticorpos primários e secundários foram realizadas à temperatura ambiente, em câmara escura húmida.

Posteriormente às incubações com os anticorpos realizaram-se 3 lavagens de 5 min. com PBS 1X, procedendo-se de seguida à pós-fixação das células com 3.7% PFA em PBS, à temperatura ambiente, durante cinco minutos. Após novas lavagens com PBS 1X, procedeu-se, por fim, à montagem das lamelas em lâminas de vidro com meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories).

Os anticorpos primários utilizados nos ensaios de imunofluorescência foram o monoclonal de murganho anti-*c-myc* 9E10, policlonal de coelho anti-lamina A/C (BD Biosciences) e policlonal de coelho anti-HDAg (B3; Saldanha e tal., 1990). Os anticorpos secundários utilizados foram o monoclonal anti-imunoglobulinas de murganho conjugado com FITC e o monoclonal anti-imunoglobulinas de coelho conjugado com FITC ou Texas Red (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA).

### III.3.4 MICROSCOPIA

A análise das amostras marcadas com fluorocromos foi efectuada num microscópio confocal Zeiss LSM 510, equipado com um laser de árgon (488 nm) para excitar FITC e um laser de hélio-néon (543 nm) para excitar Texas Red. Em experiências de marcação dupla (dois fluorocromos), as imagens do mesmo plano focal foram primeiro captadas em canais diferentes e depois sobrepostas. Com o objectivo de obter um alinhamento preciso das imagens sobrepostas, o equipamento foi calibrado com o auxílio de microesferas fluorescentes (Molecular Probes, USA) e de um filtro de banda dupla que permite a visualização simultânea de fluorescência verde e vermelha.

### III.3.5 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM *E. coli*

As proteínas GST, GST-S-HDAg, bem como a proteína GST fundida com os aminoácidos responsáveis pela importação nuclear do antígeno delta foram produzidas em bactérias *E. coli* BL21, utilizando o vector pGEX-6p-2 (GE Healthcare). As proteínas de fusão GST, expressas sob controlo do promotor indutível *tac*, possuem um local de clivagem específico para a protease PreScission, permitindo a separação das proteínas de interesse do domínio GST.

#### III.3.5.1 CONSTRUÇÃO DO VECTOR pGEX-6p-2-3X-HDAg-NLS

O vector pGEX-6p-2-3X-HDAg-NLS, que codifica a proteína GST fundida com três cópias em tandem do NLS do HDAg, foi construído através da inserção de um oligonucleótido sintético de cadeia dupla entre os locais *EcoRI* e *XhoI* do pGEX-6p-2. Os oligonucleótidos sintetizados, após ligação, apresentam extremidades coesivas compatíveis com as originadas por clivagem do vector pGEX-6p-2 com as enzimas *EcoRI* e *XhoI* (Tabela III.3.8). Para além disso, os oligonucleótidos utilizados na construção do vector pGEX-6p-2-3X-HDAg-NLS possuem dois nucleótidos adicionais, assinalados a negrito, por comparação com os oligonucleótidos usados na expressão da proteína *c-myc*-PK-3X-HDAg-NLS (Tabela III.3.2). A adição de dois nucleótidos adicionais foi efectuada com o objectivo de manter a continuidade da grelha de leitura entre a proteína GST e o NLS do HDAg.

Aminoácidos do HDAg	SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS (5'→3')	
3X-NLS	<i>forward</i>	<b>AATT</b> GCCGAGGGGGCTCCCCCGCAAGAGGGCCCGAGAGGGGGCTCCCCCGCAAGAGGGCCCGAGAGGGG GCTCCCCCGCAAGAGGGCCCGAC
	<i>reverse</i>	<b>TCGA</b> GTCGGGCCCTCTTCGCGGGGGGAGCCCCCTCTCGGGCCCTCTTCGCGGGGGGAGCCCCCTCTCGGGCCC TCTTCGCGGGGGGAGCCCCCTCGGC

**Tabela III.3.8.** Sequência dos oligonucleótidos sintéticos utilizados na construção do vector pGEX-6p-2-3xHDAg-NLS. Os nucleótidos que formam as extremidades coesivas compatíveis com as resultantes da digestão com *EcoRI* e *XhoI* são apresentadas a vermelho e a azul, respectivamente. A negrito assinalam-se os dois nucleótidos adicionais.

Os vectores recombinantes isolados foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1% após digestão com a enzima de restrição *HincII*.

### III.3.5.2 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO GST

Os vectores pGEX-6p-2, pGEX-6p-2-3X-HDAg-NLS e pGEX-6p-2-S-HDAg foram utilizados para transformar uma estirpe de *E. coli* deficiente na produção de duas proteases, a Lon e a OmpF. De modo a potenciar a tradução das proteínas de fusão, as bactérias *E. coli* BL21 foram simultaneamente transformadas com um plasmídeo, pACYC-RP, que codifica dois tRNAs raros em *E. coli*, nomeadamente os que transportam os aminoácidos arginina e prolina. As colónias individualizadas de *E. coli* BL21, co-transformadas com os vectores pGEX-6p-2 e pACYC-RP, foram em seguida inoculadas em meio 2X YTA (16 g/L triptona, 10 g/L extracto de levedura, 5 g/L de NaCl) e incubadas a 37°C, com agitação a 250 rpm. Após 12 a 16 horas de incubação, as culturas líquidas saturadas foram usadas para inocular cinco volumes de meio 2X YTA e incubadas por mais duas horas a 37°C, com agitação a 100 rpm. A indução da expressão das proteínas de fusão GST foi efectuada por adição de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG), numa concentração final de 1 mM. Após duas horas de incubação, a 37°C, com agitação, as culturas líquidas foram transferidas para tubos de propileno de 50 ml, e centrifugadas a 2280xg a 4°C, durante 10 minutos. De seguida, procedeu-se à lise da parede bacteriana por adição de uma solução de lisozima (Sigma), numa concentração final 0.1 mg/ml. Após uma incubação de 5 minutos à temperatura ambiente, a suspensão celular sofreu 5 ciclos de congelação, em azoto líquido e descongelação por aquecimento a 37°C, num banho maria. No final, adicionaram-se 324 U de Benzonase (Sigma) ou 10  $\mu$ g/ml de DNase I para digestão do DNA genómico libertado durante a lise celular. Após cerca de 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, os lisados foram centrifugadas a 14000xg durante 10 minutos, a 4°C e os sobrenadantes foram guardados a -80°C.

Antes da purificação das proteínas de fusão GST, os extractos proteicos bacterianos foram analisados por electroforese em géis de poliacrilamida e Western Blot.

### III.3.5.3 PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

A purificação das proteínas de fusão GST, a partir dos lisados bacterianos, foi efectuada por cromatografia de afinidade, utilizando colunas de purificação preenchidas com uma matriz de glutationa conjugada com agarose (colunas GSTrap FF, GE Healthcare). Apenas as proteínas com afinidade para a glutationa, isto é, as proteínas de fusão GST, ficam retidas na coluna, enquanto que as restantes proteínas bacterianas são eliminadas durante o processo de

cromatografia de afinidade. A purificação decorreu de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Antes da adição dos extractos proteicos bacterianos, as colunas de purificação foram equilibradas com cinco volumes de PBS 1X filtrado (filtros de 0.45  $\mu\text{m}$ ), à temperatura ambiente. Para aumentar a quantidade de proteína de fusão GST purificada, a adição dos extractos proteicos foi efectuada lentamente, cerca de 0.1 ml de lisado bacteriano por minuto. Após lavagem com 5 a 10 volumes de PBS 1X, para remover as proteínas que não se encontram ligadas à matriz de glutathiona, as proteínas de fusão GST foram eluídas com 1.4 ml de 10 mM glutathiona reduzida em 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. As proteínas GST purificadas foram separadas por SDS-PAGE e analisadas por coloração com azul de Coomassie ou Western blot.

Por fim, as fracções que apresentavam maior concentração proteica foram dializadas contra 2000 volumes de PBS 1X a 4°C, durante 16 horas. Para a diálise utilizaram-se cassetes de diálise Slide-A-lyzer com capacidade máxima de 3 ml (Pierce).

A determinação da concentração das proteínas de fusão GST foi realizada pelo método colorimétrico de Bradford, utilizando o kit comercial Bio-Rad Protein assay (BioRad). O princípio do método baseia-se no facto do corante azul brilhante de Coomassie G-250, em meio ácido, reagir com as proteínas presentes nas amostras a quantificar, ocorrendo uma visível mudança de coloração, inicialmente acastanhada para tons de azul, de acordo com a concentração da proteína. A absorvância das amostras foi medida num espectrofotómetro ou num leitor de placas de ELISA a 595 nm. Após a leitura, os valores de absorvância das amostras foram comparados com os valores de cinco soluções padrão de albumina sérica bovina (BSA fracção V; Sigma) com concentração conhecida: 100, 300, 500, 700 e 900  $\mu\text{g/ml}$ .

#### **III.3.5.4 SDS-PAGE E WESTERN BLOT**

A separação de proteínas por SDS-PAGE seguiu o procedimento descrito nos materiais e métodos do capítulo II, ponto II.3.9. Após transferência para membranas de nitrocelulose as proteínas de fusão GST foram detectadas por incubação com os anticorpos monoclonal de cabra anti-GST (GE Healthcare) diluído 1:5000 em PBS 1X-5% leite magro e monoclonal anti-imunoglobulinas de cabra conjugado com peroxidase (BioRad) diluído 1:5000 em PBS 1X com 2% leite magro e 0.05% Tween-20.

### **III.3.6 PREPARAÇÃO DE EXTRACTOS PROTEICOS DE CÉLULAS Huh7 PARA ENSAIOS DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE**

As células Huh7 cultivadas em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> foram lavadas com PBS 1X, incubadas com uma solução de tripsina e recolhidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS. Após uma breve centrifugação a 800 rpm, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e ressuspensas em tampão hipotónico (20 mM HEPES-KOH, pH 7.9), seguida de uma incubação durante cinco a 10 minutos no gelo. De seguida, a suspensão celular foi submetida a três ciclos de 20 segundos de sonicação, intercalados com incubações de dois minutos em gelo. Finalmente, os lisados celulares foram centrifugados a 12.000xg a 4°C, durante 10 minutos, e os sobrenadantes foram guardados a -80°C, até utilização. Antes da utilização dos extractos celulares nos ensaios de cromatografia de afinidade, estes foram dialisados contra 50 volumes de tampão de cromatografia com elevada concentração salina (1 M KCl, 20 mM HEPES-KOH, pH 7.9; 0.2 mM EDTA, pH 8.0; 0.1 mM DTT; 20% (p/v) glicerol) ou contra 50 volumes do mesmo tampão mas com baixa concentração salina (100 mM KCl, 20 mM HEPES-KOH, pH 7.9; 0.2 mM EDTA, pH 8.0; 0.1 mM DTT; 20% (p/v) glicerol).

### **III.3.7 SELECÇÃO DE PROTEÍNAS COM AFINIDADE PARA O NLS DO HDAg**

Para os ensaios de cromatografia de afinidade, procedeu-se, inicialmente, à imobilização de 20 µg de cada uma das proteínas de fusão GST a 20 µl de uma matriz constituída por glutathione ligada covalentemente a partículas magnéticas (MagneGST™ Protein Purification System; Promega). Para isso, as partículas magnéticas foram lavadas três vezes com PBS 1X e incubadas com 20 µg de proteína, à temperatura ambiente, durante 30 minutos. Após imobilização das proteínas GST, juntaram-se cerca de 5 mg de extractos proteicos de células Huh7 em tampão de baixa ou elevada salinidade. A ligação das proteínas celulares às proteínas GST imobilizadas decorreu a 4°C, durante duas horas, com agitação. Após incubação, as partículas magnéticas foram lavadas seis vezes com tampão de ligação (200 mM KCl, 20 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 0.2 mM EDTA, pH 8.0, 0.1 mM DTT e 20% glicerol), pré-arrefecido em gelo. Os complexos proteicos associados às proteínas GST foram eluídos com 30 µl de tampão de amostra, contendo SDS (composição, ponto II.3.9 dos materiais e métodos do capítulo II), e desnaturados por aquecimento a 100°C durante cinco minutos.

Com vista a isolar os complexos proteicos associados ao NLS do HDAg, das proteínas que interagem com o domínio GST da proteína de fusão, procedeu-se à digestão enzimática da proteína de fusão GST-3X-HDAg-NLS com uma protease PreScission que cliva entre os resíduos Gln e Gly da sequência LeuGluValLeuPheGln↓GlyPro, que separa a proteína GST do NLS do HDAg. Para isso, após as lavagens com tampão de ligação, as partículas magnéticas foram ressuspensas em 100 µl de tampão de clivagem (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.0 a 5°C) contendo 16 unidades de protease PreScission (GE Healthcare). Após 72 horas de incubação a 4°C, o sobrenadante contendo as proteínas celulares com afinidade para o NLS do HDAg foi recolhido e as proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético. As proteínas celulares que permaneceram ligadas ao domínio GST foram eluídas com 30 µl de tampão de amostra, contendo SDS.

### **III.3.8 PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM TCA**

As proteínas celulares com afinidade para o NLS do HDAg foram concentradas por precipitação com 0.1 volumes de ácido tricloroacético (TCA). Após uma incubação de 30 minutos em gelo, as proteínas precipitadas foram centrifugadas a 12000xg a 4°C, durante 5 minutos. O sedimento resultante foi lavado com 3 volumes de acetona pré-arrefecida e incubado durante duas horas, a -20°C. Por fim, as proteínas foram de novo centrifugadas e os sedimentos, após secagem, foram ressuspensos em 30 µl de tampão de amostra com SDS.

### **III.3.9 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS COM AFINIDADE PARA O NLS DO HDAg**

#### **III.3.9.1 SDS-PAGE E COLORAÇÃO COM BRILLIANT BLUE G-250**

Os complexos proteicos isolados por cromatografia de afinidade foram separados por electroforese em géis de 18 x 16 cm de SDS-poliacrilamida a 7.5% ou de gradiente (5-20%).

As soluções utilizadas para a preparação dos géis de SDS-poliacrilamida estão sumariadas na tabela III.3.9. A electroforese decorreu a uma corrente constante de 25 mA, até o azul de bromofenol presente no tampão de amostra migrar até a base do gel de separação, aproximadamente 5 horas.

Soluções stock	Gel de separação		Gel de separação 7.5%	Gel de concentração 4%
	Solução <i>Heavy</i> (20%)	Solução <i>Light</i> (5%)		
30% (p/v) (29% acrilamida, 1% bisacrilamida)	10 ml	2.5 ml	3.75 ml	2.0 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	3.75 ml	3.75 ml	3.75 ml	0
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	0	0	0	3.75 ml
10% SDS	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl
100% glicerol	1.0 ml	0	0	150 µl
H <sub>2</sub> O	100 µl	8.6 ml	2.2 ml	8.950 ml
10% APS	22.5 µl	45 µl	150 µl	100 µl
TEMED	5.4 µl	5.4 µl	10 µl	10 µl
Volume final	15 ml	15 ml	15 ml	15 ml

**Tabela III.3.9.** Soluções utilizadas na preparação de géis de 18 x 16 cm de SDS-poliacrilamida a 7.5% ou de gradiente 5 a 20%.

Após a separação electroforética, as proteínas foram fixadas durante 15 minutos com TCA a 12% e incubadas com uma solução de azul brilhante G-250 (0.12% azul brilhante G-250, 10% ácido fosfórico, 10% sulfato de amónia e 20% metanol) durante 48 horas, à temperatura ambiente, com agitação suave. Após a coloração, os géis foram lavados três vezes com água à temperatura ambiente, sendo que a primeira lavagem decorreu durante cinco minutos e as restantes durante uma hora. Finalmente os géis foram incubados durante 15 minutos com uma solução de 3% glicerol (p/v) e guardados a 4°C.

### III.3.9.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ESPECTROMETRIA DE MASSA

Após separação electroforética e coloração com azul brilhante G-250, as proteínas seleccionadas para identificação, foram, primeiro, removidas dos géis com o auxílio de um bisturi e lavadas com água, com agitação, durante 20 minutos. As bandas contendo as proteínas a identificar, foram descoradas por incubação a 37°C, com agitação, com uma solução de acetonitrilo (ACN) a 50%. Seguiram-se os processos de redução e alquilação das proteínas no gel. Para redução das proteínas, as bandas foram incubadas com 10 mM DTT a 56°C, durante 15 minutos. Para a alquilação adicionou-se 55 mM iodoacetamida durante 30 minutos, na ausência de luz. A solução de iodoacetamida bloqueia os resíduos de cisteína

reactivos, evitando a reformação das pontes dissulfito. Finalizado o processo de alquilação, removeu-se o sobrenadante e adicionou-se uma solução de ACN a 100%. Após uma incubação de cinco minutos, à temperatura ambiente, adicionou-se uma nova solução de ACN a 100%, incubando-se a mistura por mais 30 minutos, com agitação. Removida a solução de ACN, as bandas foram desidratadas por centrifugação, em vácuo. Procedeu-se, em seguida, à digestão das proteínas com tripsina. Para isso, as bandas de gel foram rehidratadas com tampão de digestão contendo 6.7 ng/ $\mu$ l de tripsina diluída em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Após uma incubação de 30 minutos, à temperatura ambiente, o tampão de digestão foi substituído por uma solução de 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , incubando-se as bandas nesta solução a 37°C, durante a noite. No final, os sobrenadantes contendo os péptidos foram recolhidos e acidificados por adição de uma solução de 5% ácido fórmico. Antes da aplicação na placa de MALDI, as amostras foram dessalinizadas e concentradas em microcolunas com resina Poros R2 (Applied Biosystems). Os péptidos nas colunas, foram lavados duas vezes com uma solução de 2% ácido trifluoroacético (TFA) e finalmente eluídos com uma matriz de 10 mg/ml de CHCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico em 0.1% TFA e 50% ACN) directamente para a placa.

### III.3.9.3 ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF-TOF

O espectrómetro de massa utilizado para identificação das proteínas seleccionadas foi o 4700 Proteomics Analyser with TOF/TOF optics (Applied Biosystems), recorrendo aos programas 4000 series Explorer Software, versão 3.0 e GPS Workstation, versão 3.5.

Os espectros foram calibrados utilizando uma mistura de calibração (Calibration mixture 3, Sequazyme peptide mass standard kit, Applied Biosystems) constituída por cinco péptidos, angiotensina I, hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (1-17), ACTH (18-39), ACTH (7-38) e insulina bovina.

Os espectros obtidos foram comparados com os valores teóricos disponíveis numa base de dados. Deste modo, os resultados foram submetidos à base de dados MSDB2004010 e comparados com os valores teóricos para Homo sapiens com uma tolerância de 100 ppm. A identificação foi considerada válida para valores de identificação (score) iguais ou superiores a 64.



## III.4 RESULTADOS

---

### III.4.1 CARACTERIZAÇÃO DO SINAL DE LOCALIZAÇÃO NUCLEAR DO ANTIGÊNIO DELTA

#### III.4.1.1 O NLS BIPARTIDO DO HDAg, COMPREENDIDO ENTRE OS AMINOÁCIDOS 67 A 88, NÃO É SUFICIENTE PARA PROMOVER A IMPORTAÇÃO NUCLEAR DA PROTEÍNA *c-myc*-PK

Com o objectivo de identificar as sequências de aminoácidos necessárias e suficientes para a importação nuclear do HDAg, numa primeira abordagem, procurou-se verificar se os aminoácidos 67 a 88 do HDAg são capazes de promover a importação nuclear da proteína repórter cinase do piruvato de galinha (PK) fundida com o epítipo 9E10 da proteína *c-myc* (*c-myc*-PK). Esta proteína apresenta uma distribuição exclusivamente citoplasmática, podendo localizar-se no núcleo quando fundida com um NLS funcional.

Para analisar o efeito do NLS bipartido do HDAg na distribuição intracelular da proteína repórter, foi clonado o fragmento de cDNA que codifica para os aminoácidos 67 a 88 do HDAg entre os locais *EcoRI* e *XhoI* do vector de expressão eucariota pcDNA1-*c-myc*-PK (Michael *et al.*, 1997).

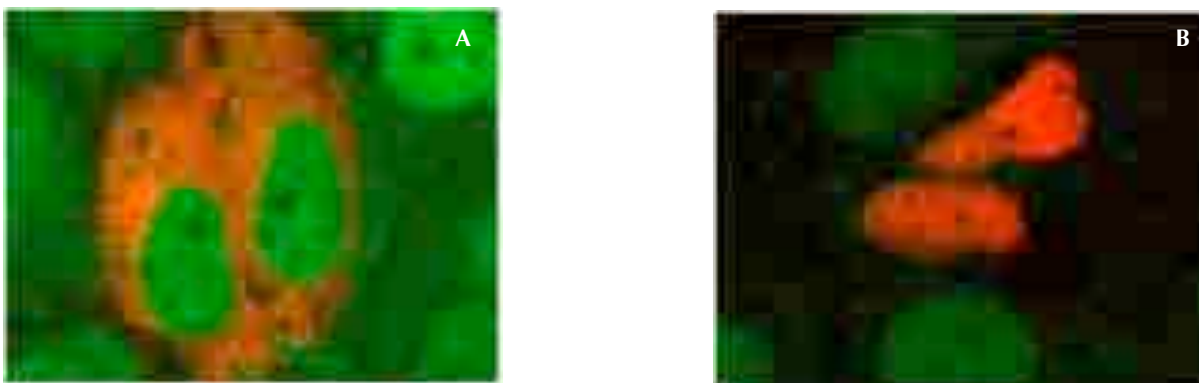
A sequência de cDNA do HDV que codifica para os aminoácidos <sup>67</sup>GAPPAKRARTDQMEVDSGPRKR<sup>88</sup> foi obtida por síntese de oligonucleótidos de cadeia simples complementares. Estes foram emparelhados *in vitro*, e introduzidos no vector pcDNA1-*c-myc*-PK, na mesma grelha de leitura da proteína de fusão *c-myc*-PK. Para ligação do cDNA de cadeia dupla que codifica para os aminoácidos 67 a 88 do HDAg, com o vector pcDNA1-*c-myc*-PK, os oligonucleótidos sintéticos foram desenhados de modo que, após o emparelhamento das cadeias complementares, são criadas extremidades coesivas compatíveis com as originadas por clivagem do vector com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*.

A selecção dos vectores recombinantes foi efectuada por hidrólise enzimática com a enzima de restrição *BanII*, que após clivagem, gera padrões de restrição distintos nos vectores pcDNA1-*c-myc*-PK-67-a-88-HDAg e vector parental. Note-se, que todos os vectores construídos para identificação dos NLS do HDAg foram sequenciados, para garantir que os cDNAs que codificam para as sequências parciais do HDAg, introduzidas no vector pcDNA1-*c-myc*-PK se encontram em grelha com a proteína de fusão *c-myc*-PK.

O vector pcDNA1-*c-myc*-PK-67-88HDAg foi utilizado, subsequentemente, para transfectar células Huh7. A análise da distribuição núcleo-citoplasmática da proteína de fusão *c-myc*-PK-67-88 foi efectuada por imunofluorescência, após incubação com o anticorpo monoclonal de murganho anti-myc (BD Biosciences), seguida de um anticorpo secundário apropriado. Com o propósito de facilitar a visualização do núcleo das células, procedeu-se, também, à detecção das laminas A/C, proteínas integrantes da lamina nuclear, com um anticorpo policlonal de coelho anti-laminas A/C (BD Biosciences).

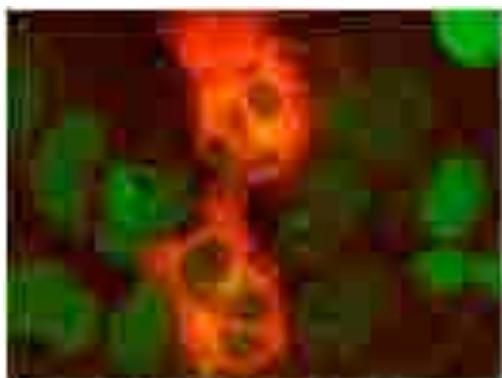
Como controlos positivo e negativo utilizaram-se os vectores pcDNA1-*c-myc*-PK-NLS-hnRNP K e pcDNA1-*c-myc*-PK, respectivamente. O primeiro codifica para a proteína *c-myc*-PK fundida com o NLS bipartido da extremidade N-terminal da proteína hnRNP K humana, que se mostrou funcional neste sistema repórter (Michael *et al.*, 1997). Por outro lado, a proteína de fusão *c-myc*-PK produzida a partir do vector parental, na ausência de um NLS funcional, localiza-se somente no citoplasma.

A figura III.4.1.1 A e B ilustra a localização celular das proteínas de fusão *c-myc*-PK e *c-myc*-PK-NLS-hnRNP K, respectivamente. De acordo com o esperado, a fusão da sequência aminoacídica que comporta o NLS da proteína hnRNP K à extremidade C-terminal da proteína *c-myc*-PK resulta na localização nuclear da proteína de fusão *c-myc*-PK-NLS hnRNP K (Figura III.4.1.1 B), contrastando com a distribuição exclusivamente citoplasmática da proteína *c-myc*-PK (Figura III.4.1.1 A).



**Figura III.4.1.1.** Distribuição intracelular das proteínas de fusão *c-myc-PK* e *c-myc-PK-NLS hnRNP K*. Células Huh7 foram transfectadas com os vectores pcDNA1-*c-myc-PK* (A) e pcDNA1-*c-myc-PK-NLS hnRNP K* (B). 16 a 24 horas após transfecção as células foram fixadas e permeabilizadas. A detecção das proteínas de fusão *c-myc-PK* (a vermelho) foi efectuada por incubação com o anticorpo monoclonal anti-*c-myc*, 9E10. Para marcação dos núcleos (a verde) as células Huh7 foram incubadas com um anticorpo policlonal anti-laminas A/C.

Finalmente, a análise da distribuição intracelular da proteína *c-myc-PK* fundida com aminoácidos 67 a 88 do HDAG, mostrou que a proteína de fusão localiza-se somente no citoplasma das células (Figura III.4.1.2).



**Figura III.4.1.2.** Distribuição intracelular da proteínas de fusão *c-myc-PK-67-88HDAG*. Células Huh7 foram transfectadas com o vector pcDNA1-*c-myc-PK-67-88HDAG*. A marcação da proteína de fusão (vermelho) e dos núcleos (verde) foi efectuada por incubação das células fixadas e permeabilizadas com os anticorpos monoclonal anti-*c-myc* e policlonal anti-lamina A/C, respectivamente.

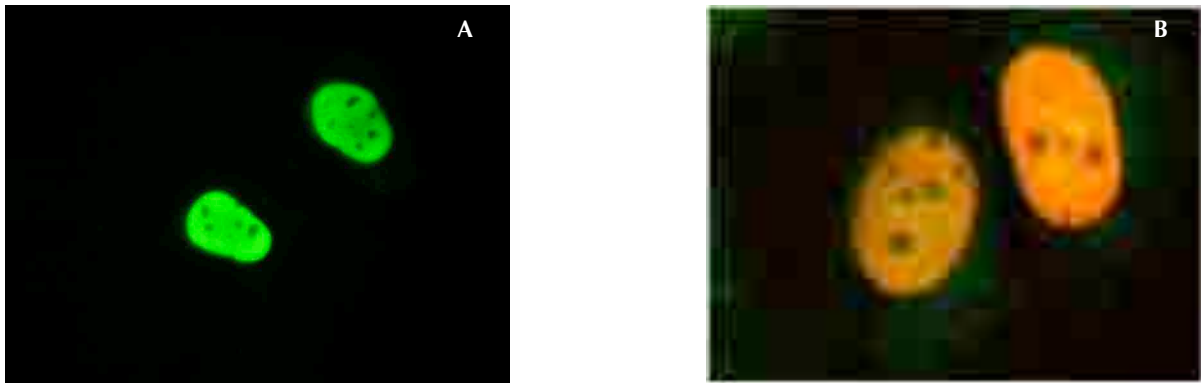
Estes resultados evidenciam que, ao contrário do NLS da proteína hnRNP K, o NLS bipartido do HDAG, situado entre os aminoácido 67 a 88, não é funcional no sistema repórter *c-myc-PK*. A localização citoplasmática da proteína *c-myc-PK-67-a-88HDAG* não confirma os resultados de Xia *et al.* (1992), que levaram à conclusão de que os aminoácidos <sup>67</sup>GAPPAKRARTDQMEVDSGPRKR<sup>88</sup> formam o sinal responsável pela importação nuclear do HDAG. Será de salientar, que existem diferenças nas abordagens utilizadas para analisar o papel dos aminoácidos 67 a 88 do HDAG na importação nuclear. Os aminoácidos vizinhos do local de fusão entre as proteína repórter ( $\alpha$ -globina e *c-myc-PK*) e os aminoácidos do HDAG são distintos, o que poderá explicar as diferenças registadas.

### III.4.1.2 OS AMINOÁCIDOS DA EXTREMIDADE N-TERMINAL DO HDAg NÃO SÃO NECESSÁRIOS PARA A LOCALIZAÇÃO NUCLEAR DA PROTEÍNA

Face aos resultados obtidos, decidiu-se proceder a uma análise mais detalhada dos aminoácidos do HDAg necessários e suficientes para promover a importação nuclear da proteína *c-myc*-PK. Para isso, introduziram-se várias sequências de cDNA do HDAg, na mesma grelha de leitura do último codão da cinase do piruvato, no vector pcDNA1-*c-myc*-PK. Após transfecção de células eucariotas Huh7 com os vectores construídos, seguiu-se a análise da distribuição intracelular das proteínas de fusão por imunofluorescência indirecta seguida de microscopia confocal.

Estudos mutacionais do HDAg mostraram que os primeiros 88 aminoácidos do antigénio delta apresentam uma distribuição intracelular idêntica à da proteína do tipo selvagem, sugerindo que os aminoácidos 89 a 195 do HDAg são dispensáveis para a localização nuclear da proteína. Utilizando abordagens experimentais baseada na expressão de proteínas repórter fundidas com sequências do HDAg, demonstrou-se que os primeiros 30 aminoácidos não contribuem para a localização nuclear da proteína (Xia *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1992). No entanto, a utilização de ferramentas informáticas como o PROSITE (Hofmann *et al.*, 1999), o PredictNLS (Cokol *et al.*, 2000) e o Motif Scan apontam para a existência provável de um NLS entre os aminoácidos 25 a 39 do HDAg (<sup>25</sup>KKLEELERDLRKTKK<sup>39</sup>). Com vista a averiguar a presença de um NLS na extremidade N-terminal do HDAg, construíram-se os vectores pcDNA1-*c-myc*-PK-13-112HDAg, pcDNA1-*c-myc*-PK-34-116HDAg e pcDNA1-*c-myc*-PK-58-116HDAg que codificam para a proteína *c-myc*-PK fundida com os aminoácidos 13 a 112, 34 a 116 e 58 a 116 do HDAg. Os fragmentos de cDNA do HDV de 300 bp, 262 bp e 213 bp, que codificam para os aminoácidos 13 a 112, 34 a 116 e 58 a 116 do HDAg, respectivamente, foram obtidos por amplificação por PCR e introduzidos no vector pcDNA1-*c-myc*-PK.

Após transfecção e de acordo com o esperado, a proteína de fusão *c-myc*-PK-13-112HDAg distribuiu-se exclusivamente no núcleo das células (Figura III.4.1.3 A), sugerindo que os aminoácidos responsáveis pela localização do HDAg situam-se entre os 100 aminoácidos da extremidade N-terminal. Obtiveram-se resultados idênticos quando se analisou a distribuição intracelular da proteína repórter *c-myc*-PK fundida com os aminoácidos 34 a 116 do HDAg (*c-myc*-PK-34-116HDAg; Figura III.4.1.3 B). À semelhança do que se verificou para os aminoácidos da extremidade carboxílica, a localização nuclear da proteína *c-myc*-PK-34-116 indica que os primeiros 33 aminoácidos da extremidade N-terminal do HDAg não são necessários para a importação nuclear da proteína repórter.



**Figura III.4.1.3.** Distribuição intracelular das proteínas de fusão *c-myc*-PK-13-112HDAg e *c-myc*-PK-34-116HDAg. Células Huh7 foram transfectadas com os vectores pcDNA1-*c-myc*-PK-13-112HDAg (A) e pcDNA1-*c-myc*-PK-34-116HDAg (B). 16 a 24 horas após transfecção as células foram fixadas e permeabilizadas. A detecção das proteínas de fusão *c-myc*-PK (a verde em A e a vermelho em B) foi efectuada por incubação com o anticorpo monoclonal anti-*c-myc*, 9E10. Em B, para marcação dos núcleos (a verde) as células Huh7 foram incubadas com um anticorpo policlonal anti-laminas A/C.

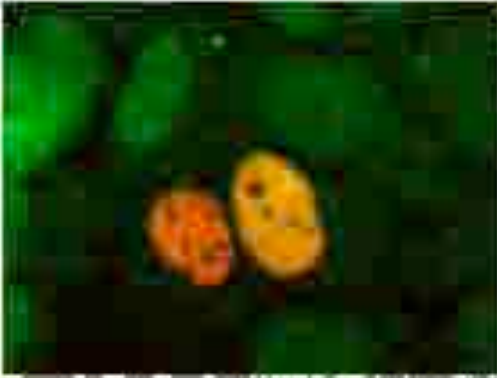
Tendo-se verificado que a remoção dos primeiros 33 do HDAg não condiciona o transporte nuclear da proteína repórter, analisou-se o resultado da remoção dos 57 aminoácidos da extremidade N-terminal do HDAg, na importação nuclear da proteína *c-myc*-PK. O HDAg possui uma sequência de aminoácidos com elevada homologia com o NLS NL1 dos glucocorticóides, situado entre os aminoácidos 35 a 44. Segundo Chang *et al.* (1992) os aminoácidos 35 a 44 do HDAg são capazes de promover a importação nuclear de uma proteína repórter.

Os resultados obtidos (Figura III.4.1.4) mostram que a remoção dos primeiros 57 aminoácidos do HDAg não diminui a capacidade da proteína *c-myc*-PK ser importada do citoplasma para o núcleo das células Huh7 transfectadas, uma vez que a proteína de fusão *c-myc*-PK-58-116HDAg apresenta uma distribuição exclusivamente nuclear.

A localização nuclear das proteínas de fusão *c-myc*-PK-13-112HDAg, *c-myc*-PK-34-116HDAg, e *c-myc*-PK-58-116HDAg mostra que as sequências aminoacídicas do HDAg que comportam o NLS anotado por três programas de computador de busca de domínios funcionais proteicos (aminoácidos 25 a 39) e o NLS identificado por Chang *et al.* (1992) não são essenciais para a importação nuclear da proteína repórter *c-myc*-PK.

Atendendo à distribuição intracelular das proteínas de fusão estudadas pode-se concluir que o HDAg apresenta pelo menos um NLS funcional no sistema repórter *c-myc*-PK, entre os aminoácidos 58 a 116. O facto da remoção dos primeiros 57 aminoácidos da extremidade N-

terminal não interferir com a importação nuclear da proteína *c-myc*-PK não prova, contudo, a ausência de NLS nas sequências removidas. Com efeito, o HDAG pode conter mais do que um NLS funcional na sua sequência, funcionando de um modo independente.



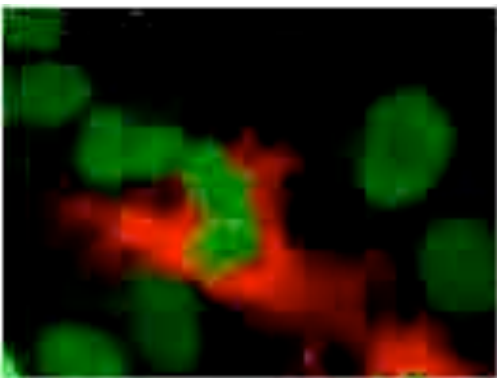
**Figura III.4.1.4.** Distribuição intracelular da proteína de fusão *c-myc*-PK-58-116HDAG. Células Huh7 foram transfectadas com o vector pcDNA1-*c-myc*-PK-58-116HDAG. A marcação da proteína de fusão (vermelho) e dos núcleos (verde) foi efectuada por incubação das células fixadas e permeabilizadas com os anticorpos monoclonal anti-*c-myc* e policlonal anti-lamina A/C, respectivamente.

### III.4.1.3 OS AMINOÁCIDOS 34 A 44 DO HDAG NÃO SÃO CAPAZES DE PROMOVER A IMPORTAÇÃO DA PROTEÍNA *c-myc*-PK

Com o objectivo de determinar a presença de sinais de importação nuclear na extremidade N-terminal do HDAG construiu-se o vector pcDNA1-*c-myc*-PK-13-55HDAG que codifica a proteína de fusão *c-myc*-PK fundida com os aminoácidos 13 a 55 do HDAG.

Para a construção do vector pcDNA1-*c-myc*-PK-13-55HDAG, amplificou-se por PCR um fragmento de DNA com 147 bp que codifica para os aminoácidos 13 a 55 do HDAG, que após hidrólise enzimática, foi introduzido entre os locais *EcoRI* e *XhoI* do plasmídeo pcDNA1-*c-myc*-PK.

Tal como descrito anteriormente, a localização intracelular da proteína de fusão *c-myc*-PK-13-55HDAG foi examinada por imunofluorescência indirecta, seguida de microscopia confocal. A figura III.4.1.5 ilustra os resultados da distribuição intracelular da proteína de fusão *c-myc*-PK-13-55HDAG.



**Figura III.4.1.5.** Distribuição intracelular da proteína de fusão *c-myc*-PK-13-55HDAG. Células Huh7 foram transfectadas com o vector pcDNA1-*c-myc*-PK-13-55HDAG. A marcação da proteína de fusão (vermelho) e dos núcleos (verde) foi efectuada por incubação das células fixadas e permeabilizadas com os anticorpos monoclonal anti-*c-myc* e policlonal anti-lamina A/C, respectivamente.

Tal como se pode observar, a proteína *c-myc*-PK-13-55HDAg localiza-se unicamente no citoplasma das células transfectadas. A localização citoplasmática da proteína repórter mostra claramente que os aminoácidos 13 a 55 do HDAg não possuem nenhum NLS funcional capaz de promover a importação nuclear da proteína *c-myc*-PK, contrariando a hipótese do NLS (aa 35 a 44) identificado por Chang *et al.* (1992) contribuir para a localização nuclear da proteína. No entanto, os resultados obtidos com a proteína de fusão *c-myc*-PK fundida com os aminoácidos 13 a 55 HDAg corroboram os resultados de Xia *et al.* (1992), que demonstrou que os aminoácidos 1 a 57 do HDAg, apesar de conterem uma sequência com 70% de homologia com o NLS dos glucocorticóides, são incapazes de deslocar uma proteína repórter do citoplasma para o núcleo.

Levando em linha de conta a distribuição citoplasmática da proteína de fusão *c-myc*-PK-13-55HDAg e a localização restrita ao nucleoplasma da proteína *c-myc*-PK-58-116, pode-se concluir que o HDAg possui apenas um NLS funcional situado, muito provavelmente, entre os aminoácidos 58 e 116 da proteína.

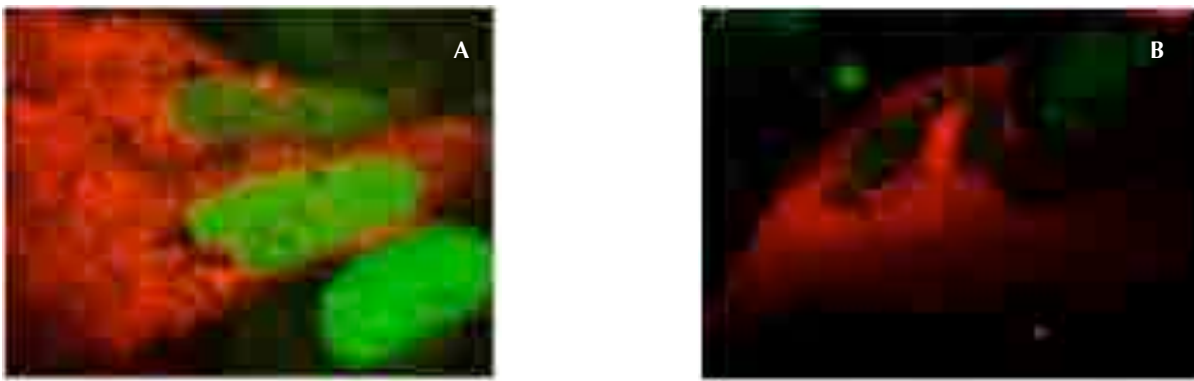
#### **III.4.1.4 Os aminoácidos 67 a 88 do HDAg, embora insuficientes, são necessários para a localização nuclear da proteína repórter**

Os resultados anteriores mostram que, a sequência que comporta o NLS do HDAg (aminoácidos 58 a 116) inclui o NLS previamente identificado por Xia *et al.* (1992). Para averiguar se os aminoácidos 67 a 88 fazem parte do NLS do HDAg, analisou-se a distribuição intracelular da proteína *c-myc*-PK fundida com os aminoácidos 13 a 195 do HDAg sem os aminoácidos 68 a 91 (*c-myc*-PK-HDAg $\Delta$ 68-91). Para a construção do vector pcDNA1-*c-myc*-PK-HDAg $\Delta$ 68-91, as sequências de DNA com 183 e 330 bp, que codificam os aminoácidos 13 a 67 e 92 a 195 do HDAg foram amplificadas por PCR, ligadas e introduzidas entre os locais *EcoRI* e *XhoI* do vector pcDNA1-*c-myc*-PK. O vector resultante pcDNA1-*c-myc*-PK-HDAg $\Delta$ 68-91 foi utilizado para transfectar células Huh7 e a localização intracelular da proteína de fusão foi analisada por imunofluorescência e microscopia confocal.

Como se pode observar na figura III.4.1.6 (A) a proteína de fusão *c-myc*-PK-HDAg $\Delta$ 68-91 localiza-se somente no citoplasma das células transfectadas, indicando que, pelo menos, alguns dos aminoácidos da sequência 68 a 91 do HDAg são necessários para a função do NLS. De modo a aferir se os aminoácidos localizados a jusante da extremidade carboxílica do NLS identificado por Xia e Chang (1992), presentes na sequência 58 a 116 do HDAg, possuem

propriedades de NLS, analisou-se a distribuição intracelular da proteína *c-myc*-PK fundida com os aminoácidos 88 a 116 do HDAg. A construção do vector pcDNA1-*c-myc*-PK-88-116 seguiu os passos anteriormente descritos. Sucintamente, iniciou-se por amplificar por PCR um fragmento de DNA com 105 bp que codifica para os aminoácidos a analisar, seguindo-se a inserção do fragmento entre os locais *EcoRI* e *XhoI* do vector pcDNA1-*c-myc*-PK.

De acordo com a localização intracelular da proteína de fusão *c-myc*-PK-88-116HDAg, que apresenta uma distribuição exclusivamente citoplasmática (Figura III.4.1.6 B), pode-se concluir que os aminoácidos 88 a 116 do HDAg não funcionam como NLS.



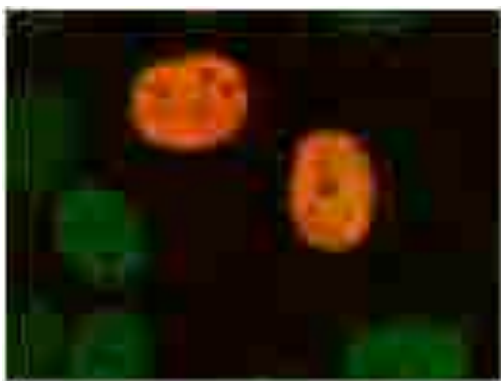
**Figura III.4.1.6.** Distribuição intracelular das proteínas de fusão *c-myc*-PK-HDAg $\Delta$ 68-91 e *c-myc*-PK-88-116HDAg. Células Huh7 foram transfectadas com os vectores pcDNA1-*c-myc*-HDAg $\Delta$ 68-91 (A) e pcDNA1-*c-myc*-PK-88-116HDAg(B). 16 a 24 horas após transfecção as células foram fixadas e permeabilizadas. A detecção das proteínas de fusão *c-myc*-PK (a vermelho) foi efectuada por incubação com o anticorpo monoclonal anti-*c-myc*, 9E10. Para marcação dos núcleos (a verde) as células Huh7 foram incubadas com um anticorpo policlonal anti-laminas A/C.

A análise da distribuição intracelular das proteínas de fusão *c-myc*-PK-58-116HDAg, *c-myc*-PK-HDAg $\Delta$ 68-91 e *c-myc*-PK-88-116HDAg, sugere que o HDAg possui apenas um NLS funcional, situado entre os aminoácidos 58 a 88 do HDAg.

### III.4.1.5 O NLS DO HDAg LOCALIZA-SE ENTRE OS AMINOÁCIDOS 58 A 88

A hipótese do motivo proteico responsável pela localização nuclear do HDAg se encontrar entre os aminoácidos 58 a 88, foi avaliada através da análise da localização celular da proteína de fusão *c-myc*-PK-58-88HDAg.

Para isso, clonou-se uma sequência de DNA com 120 bp, que codifica para os aminoácidos 58 a 88 do HDAG no vector pcDNA1-*c-myc*-PK. A análise da distribuição intracelular da proteína de fusão *c-myc*-PK-58-88HDAG (Figura III.4.1.7) mostrou que os aminoácidos 58 a 88 do HDAG são suficientes para a importação nuclear da proteína *c-myc*-PK, comprovando-se a hipótese do NLS do HDAG se encontrar nesta região da proteína.



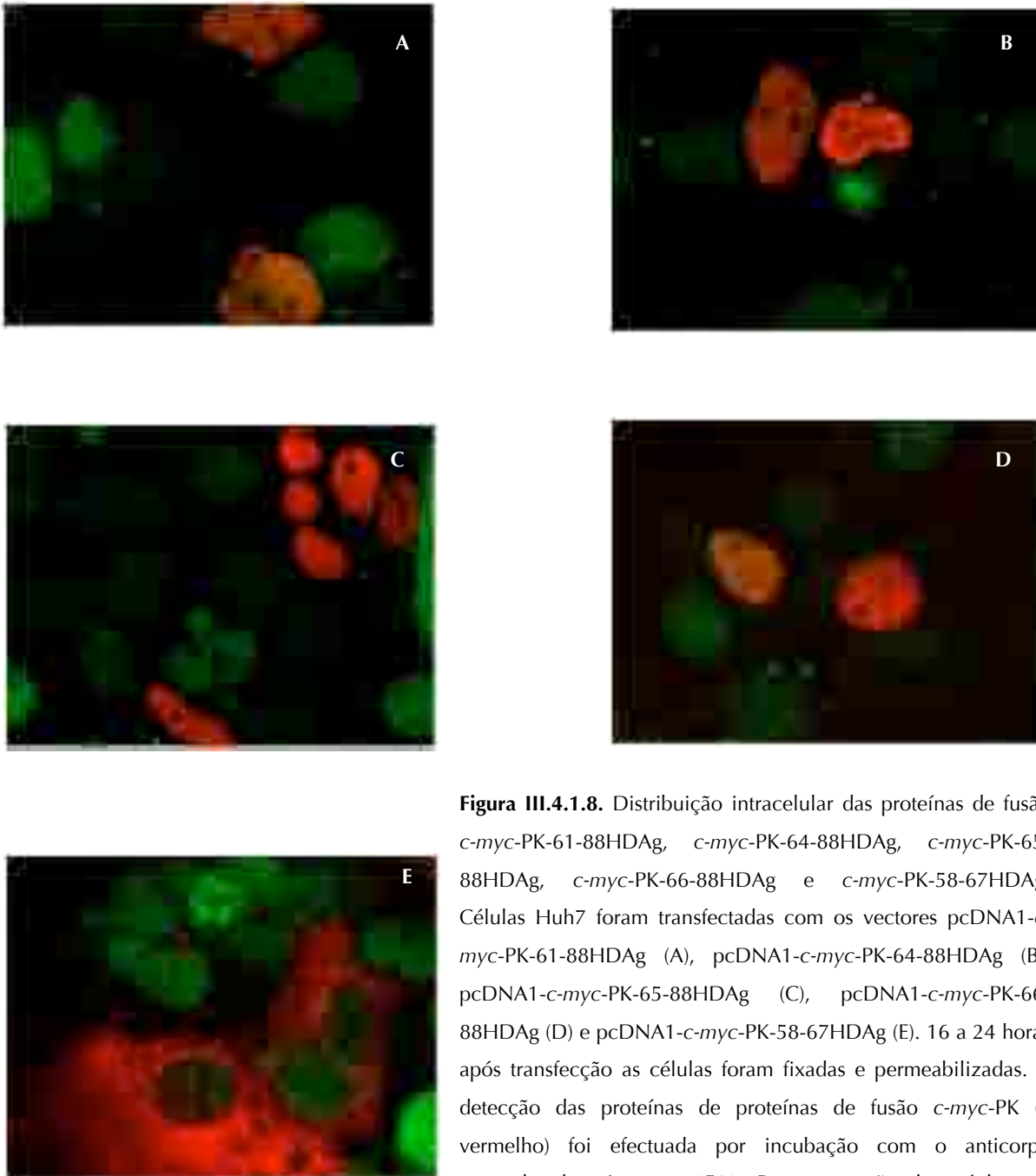
**Figura III.4.1.7.** Distribuição intracelular da proteína de fusão *c-myc*-PK-58-88HDAG. Células Huh7 foram transfectadas com o vector pcDNA1-*c-myc*-PK-58-88HDAG. A marcação da proteína de fusão (vermelho) e dos núcleos (verde) foi efectuada por incubação das células fixadas e permeabilizadas com os anticorpos monoclonal anti-*c-myc* e policlonal anti-lamina A/C, respectivamente.

#### III.4.1.6 O AMINOÁCIDO 66 É ESSENCIAL PARA A ACTIVIDADE DO NLS DO HDAG

As experiências anteriores evidenciam que o NLS do HDAG está contido na sequência de aminoácido de 58 a 88 da proteína e que os aminoácidos 67 a 88 do HDAG são necessários para a importação da proteína *c-myc*-PK, concluindo-se que os aminoácidos 58 a 67 são importantes para a actividade do NLS do HDAG.

Para identificar quais os aminoácidos da sequência de 58 a 67 do HDAG necessários para a actividade do NLS, construíram-se 5 vectores de expressão que codificam para a proteína *c-myc*-PK fundida com os seguintes aminoácidos do HDAG: 61 a 88, 64 a 88, 65 a 88 e 66 a 88. Foi também construído, o vector pcDNA1-*c-myc*-PK-58-a-67HDAG, para examinar a capacidade dos aminoácidos 58 a 67 do HDAG promoverem a importação nuclear da proteína repórter. Com excepção do fragmento de DNA que codifica para os aminoácidos 61 a 88 do HDAG, obtido por amplificação por PCR, as sequências de cDNA que codificam para os aminoácidos 64 a 88, 65 a 88, 66 a 88 e 58 a 67 foram obtidas por emparelhamento de oligonucleótidos sintéticos de cadeia simples complementares.

A análise da localização intracelular das proteínas de fusão mostrou que todas as proteínas estudadas, exceptuando a proteína *c-myc*-PK-58-67HDAG, localizam-se no núcleo das células transfectadas (Figura III.4.1.8).



**Figura III.4.1.8.** Distribuição intracelular das proteínas de fusão *c-myc*-PK-61-88HDAg, *c-myc*-PK-64-88HDAg, *c-myc*-PK-65-88HDAg, *c-myc*-PK-66-88HDAg e *c-myc*-PK-58-67HDAg. Células Huh7 foram transfectadas com os vectores pcDNA1-*c-myc*-PK-61-88HDAg (A), pcDNA1-*c-myc*-PK-64-88HDAg (B), pcDNA1-*c-myc*-PK-65-88HDAg (C), pcDNA1-*c-myc*-PK-66-88HDAg (D) e pcDNA1-*c-myc*-PK-58-67HDAg (E). 16 a 24 horas após transfecção as células foram fixadas e permeabilizadas. A detecção das proteínas de fusão *c-myc*-PK (a vermelho) foi efectuada por incubação com o anticorpo monoclonal anti-*c-myc*, 9E10. Para marcação dos núcleos (a verde) as células Huh7 foram incubadas com um anticorpo policlonal anti-laminas A/C.

Atendendo ao facto de a proteína de fusão *c-myc*-PK-66-88HDAg, com localização nuclear, apresentar apenas mais um aminoácido do que a proteína *c-myc*-PK-67-88HDAg, com distribuição citoplasmática, pode-se concluir que o aminoácido 66 do antígeno delta é necessário para a importação nuclear da proteína *c-myc*-PK. Verificou-se, também, a ausência de motivos de transporte funcionais entre os aminoácidos 58 a 67 do HDAg.

### III.4.1.7 O NLS DO HDAg NÃO É BIPARTIDO

De acordo com os resultados obtidos, os aminoácidos <sup>66</sup>EGAPPAKRAR<sup>75</sup>TDQMEVDSG<sup>85</sup>PRKR<sup>88</sup> do HDAg são suficientes para promover a importação nuclear da proteína repórter *c-myc-PK*. Esta sequência é constituída por dois domínios ricos em aminoácidos básicos, nomeadamente resíduos de arginina e lisina, característica típica dos NLS clássicos bipartidos. De acordo com os resultados apresentados por Xia *et al.* (1992), são necessárias as duas sequências ricas em aminoácidos básicos para a importação nuclear de uma proteína repórter. Da análise dos dois domínios separadamente, verificou-se que apenas o primeiro, ainda que de modo reduzido, é capaz de promover a importação nuclear da  $\alpha$ -globina.

De modo a averiguar se as duas sequências ricas em aminoácidos básicos são necessárias para a função do NLS do HDV, investigou-se a importância dos aminoácidos básicos <sup>85</sup>RKR<sup>88</sup> do HDAg na importação nuclear da proteína *c-myc-PK*, recorrendo a técnicas de mutagénese dirigida. A substituição de um, dois ou todos os aminoácidos da sequência <sup>85</sup>RKR<sup>88</sup> do HDAg por resíduos de alanina foi efectuada recorrendo a oligonucleótidos sintéticos que codificam para os aminoácidos 64 a 88 do HDAg. Construíram-se três vectores pcDNA1-*c-myc-PK* que codificam para a proteína *c-myc-PK* fundida com as sequências de aminoácidos do HDAg apresentadas na tabela III.4.1.

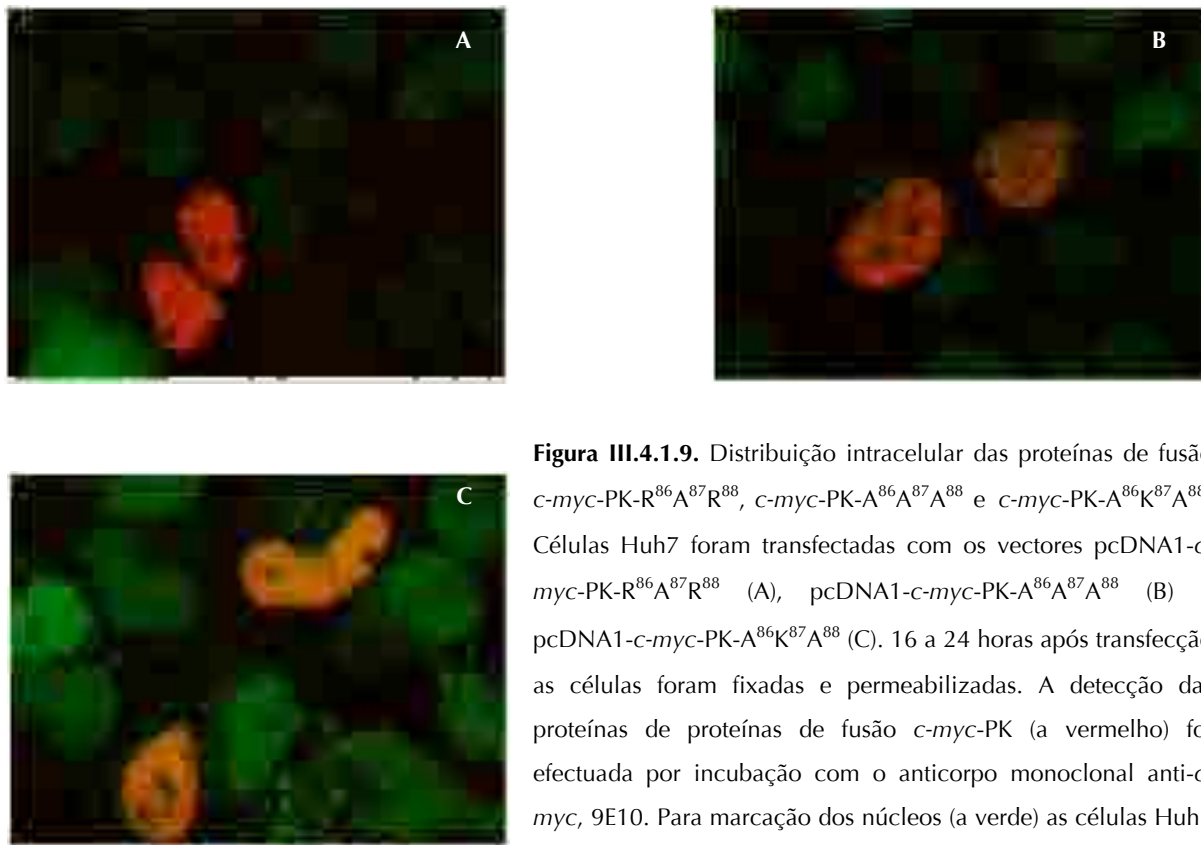
	SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO HDAg FUNDIDA COM A PROTEÍNA <i>c-myc-PK</i>
<b>R<sup>86</sup>K<sup>87</sup>R<sup>88</sup></b>	<sup>64</sup> DGE <u>GAPPAKRARTDQMEVDSG</u> <u>PRKR</u> <sup>88</sup>
<b>A<sup>86</sup>A<sup>87</sup>A<sup>88</sup></b>	<sup>64</sup> DGE <u>GAPPAKRARTDQMEVDSG</u> <u>PAAA</u> <sup>88</sup>
<b>A<sup>86</sup>K<sup>87</sup>A<sup>88</sup></b>	<sup>64</sup> DGE <u>GAPPAKRARTDQMEVDSG</u> <u>AKA</u> <sup>88</sup>
<b>R<sup>86</sup>A<sup>87</sup>R<sup>88</sup></b>	<sup>64</sup> DGE <u>GAPPAKRARTDQMEVDSG</u> <u>PRAR</u> <sup>88</sup>

**Tabela III.4.1.** Sequências aminoacídicas do HDAg modificadas por mutagénese dirigida. A primeira sequência corresponde à sequência de aminoácidos de 64 a 88 HDAg do tipo selvagem. Os dois domínios ricos em resíduos básicos do NLS identificado por Xia *et al.* (1992) encontram-se a sublinhado. Os aminoácidos básicos do HDAg substituídos por resíduos de alanina encontram-se a vermelho.

O efeito da substituição dos resíduos básicos do segundo domínio do NLS do HDAg foi efectuada por análise da distribuição intracelular das proteínas de fusão fundidas com as sequências do HDAg mutadas.

A análise da localização celular das proteínas mutantes mostrou que os aminoácidos básicos do segundo domínio do NLS putativo do HDAg não são necessários para a importação nuclear

da proteína *c-myc*-PK. Todas as proteínas de fusão contendo mutações pontuais nos aminoácidos das posições 85 a 88 do HDAg (R<sup>86</sup>K<sup>87</sup>R<sup>88</sup>) localizam-se no núcleo das células (Figura III.4.1.9).

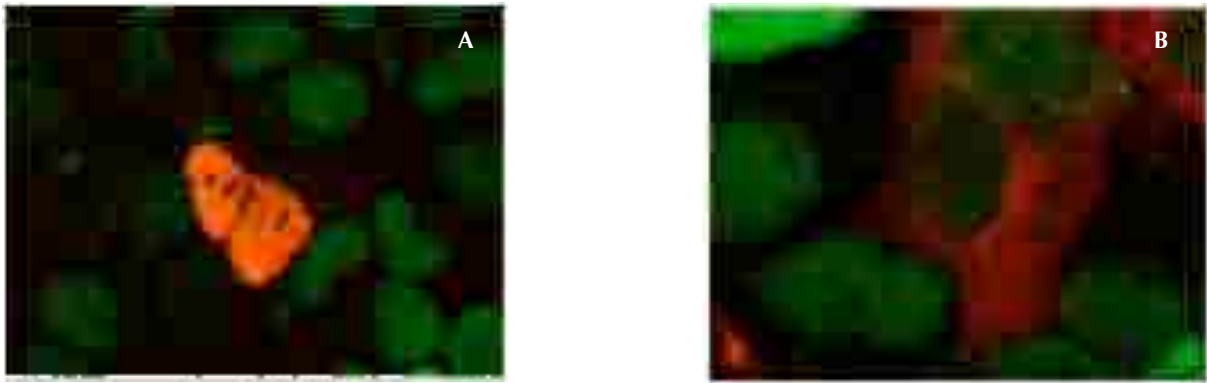


**Figura III.4.1.9.** Distribuição intracelular das proteínas de fusão *c-myc*-PK-R<sup>86</sup>A<sup>87</sup>R<sup>88</sup>, *c-myc*-PK-A<sup>86</sup>A<sup>87</sup>A<sup>88</sup> e *c-myc*-PK-A<sup>86</sup>K<sup>87</sup>A<sup>88</sup>. Células Huh7 foram transfectadas com os vectores pcDNA1-*c-myc*-PK-R<sup>86</sup>A<sup>87</sup>R<sup>88</sup> (A), pcDNA1-*c-myc*-PK-A<sup>86</sup>A<sup>87</sup>A<sup>88</sup> (B) e pcDNA1-*c-myc*-PK-A<sup>86</sup>K<sup>87</sup>A<sup>88</sup> (C). 16 a 24 horas após transfecção as células foram fixadas e permeabilizadas. A detecção das proteínas de fusão *c-myc*-PK (a vermelho) foi efectuada por incubação com o anticorpo monoclonal anti-*c-myc*, 9E10. Para marcação dos núcleos (a verde) as células Huh7 foram incubadas com um anticorpo policlonal anti-laminas A/C.

Os resultados apresentados sugerem que o NLS do HDAg, ao contrário das evidências anteriores, é do tipo monopartido, ou seja, constituído por uma sequência de aminoácidos contínua. Se esta previsão estiver correcta os aminoácidos 66 a 75 do HDAg devem ser suficientes para a importação nuclear da proteína *c-myc*-PK. Para averiguar esta hipótese construiu-se o vector pcDNA1-*c-myc*-PK-66-75HDAg que codifica para a proteína *c-myc*-PK fundida com os aminoácidos 66 a 75 do HDAg. Construiu-se, também, o vector pcDNA1-*c-myc*-PK-76-88HDAg com o intuito de testar a capacidade dos aminoácidos 76 a 88 HDAg promoverem a importação nuclear da proteína *c-myc*-PK. Recorde-se que, segundo Chang *et al.* (1992), os aminoácidos 75 a 88 do HDAg, fundidos com os 34 aminoácidos da extremidade N-terminal são capazes de deslocar uma proteína repórter do citoplasma para o núcleo das células.

Tal como se pode observar na figura III.4.1.10 (A) a proteína de fusão *c-myc*-PK-76-88HDAg localiza-se no citoplasma das células, enquanto que a proteína *c-myc*-PK-66-75HDAg

apresenta uma distribuição nuclear (Figura III.4.1.10 B), indicando que os aminoácidos 66 a 75 do HDAg são suficientes para a importação nuclear da proteína *c-myc*-PK. A distribuição citoplasmática da proteína *c-myc*-PK-76-88HDAg indica que os aminoácidos 76 a 88 do HDAg não possuem propriedades de sinal de importação nuclear.



**Figura III.4.1.10.** Distribuição intracelular das proteínas de fusão *c-myc*-PK-66-75HDAg e *c-myc*-PK-76-88HDAg. Células Huh7 foram transfectadas com os vectores pcDNA1-*c-myc*-PK-66-75HDAg (A) e pcDNA1-*c-myc*-PK-76-88 (B). 16 a 24 horas após transfecção as células foram fixadas e permeabilizadas. A detecção das proteínas de fusão *c-myc*-PK (a vermelho) foi efectuada por incubação com o anticorpo monoclonal anti-*c-myc*, 9E10. Para marcação dos núcleos (a verde) as células Huh7 foram incubadas com um anticorpo policlonal anti-laminas A/C.

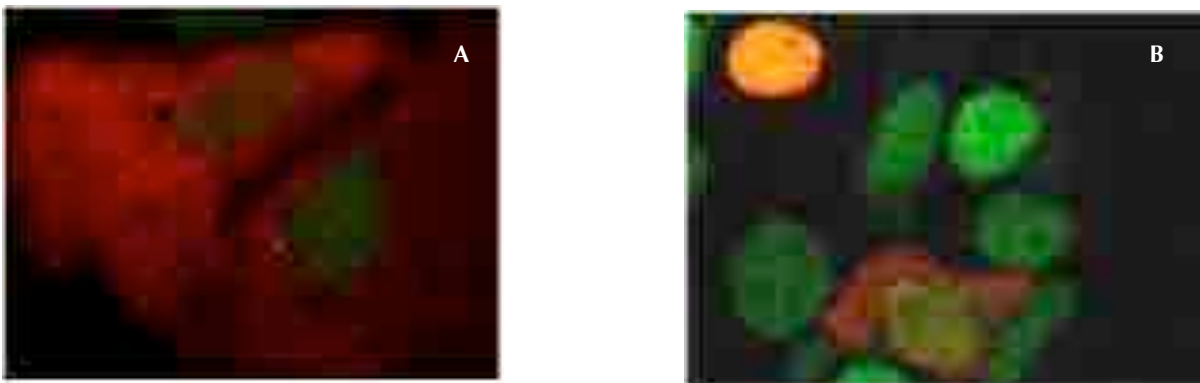
### III.4.1.8 OS AMINOÁCIDOS 66 A 75 DO HDAg SÃO SUFICIENTES PARA A LOCALIZAÇÃO NUCLEAR DA PROTEÍNA *c-myc*-PK

Os resultados das experiências anteriores em conjunto com a observação de que o aminoácido 66 do HDAg é crucial para a importação nuclear da proteína *c-myc*-PK mostram que o NLS do HDAg se situa entre os aminoácidos 66 e 75 do antigénio delta. Para verificar se estes aminoácidos correspondem à sequência mínima capaz de garantir a importação nuclear da proteína *c-myc*-PK, construiu-se o vector pcDNA1-*c-myc*-PK-66-74HDAg que codifica para a proteína *c-myc*-PK fundida com os aminoácidos 66 a 74 do HDAg. A localização citoplasmática desta proteína (Figura III.4.1.11 A), mostra que a remoção do último aminoácido básico, resíduo de arginina (R), da sequência <sup>66</sup>EGAPPAKRAR<sup>75</sup> resulta na perda de função do NLS do HDAg.

Verificou-se anteriormente que a adição do aminoácido 66 do HDAg, um resíduo de ácido glutâmico (E), à proteína *c-myc*-PK fundida com os aminoácidos de 67 a 88 do HDAg causa alteração na localização intracelular da proteína repórter. Se a proteína *c-myc*-PK-67-88HDAg se localiza apenas no citoplasma, a proteína de fusão *c-myc*-PK, contendo o resíduo de ácido

glutâmico (*c-myc*-PK-66-88HDAg), apresenta uma distribuição nuclear, sugerindo que o aminoácido 66 do HDAg desempenha um papel importante na actividade do NLS da proteína. Para aferir a importância deste resíduo na actividade do NLS do HDAg investigou-se o efeito da substituição do aminoácido ácido glutâmico por um resíduo de alanina, aminoácido neutro, na importação nuclear da proteína *c-myc*-PK fundida com os aminoácidos 66 a 75 do HDAg. O vector pcDNA1-*c-myc*-PK-E66A-75HDAg, que codifica a proteína de fusão com uma mutação no aminoácido 66, foi construído através da inserção de um oligonucleótido de cadeia dupla que no lugar do codão GAG, que codifica o aminoácido ácido glutâmico (E), possui um codão GCA codificante para um resíduo de alanina (A).

O estudo da distribuição intracelular da proteína de fusão *c-myc*-PK-E66A-75HDAg, tal como se pode observar na figura III.4.1.11 (B), mostra que a mutação do resíduo 66 HDAg diminui a eficiência da importação nuclear da proteína *c-myc*-PK. A proteína de fusão é detectada nos dois compartimentos celulares, núcleo e citoplasma, contrastando com a localização exclusivamente nuclear da proteína *c-myc*-PK fundida com o NLS do HDAg do tipo selvagem.



**Figura III.4.1.11.** Distribuição intracelular das proteínas de fusão *c-myc*-PK-66-74HDAg e *c-myc*-PK-E66A-75HDAg. Células Huh7 foram transfectadas com os vectores pcDNA1-*c-myc*-PK-66-74HDAg (A) e pcDNA1-*c-myc*-PK-E66A-75HDAg (B). 16 a 24 horas após transfecção as células foram fixadas e permeabilizadas. A detecção das proteínas de fusão *c-myc*-PK (a vermelho) foi efectuada por incubação com o anticorpo monoclonal anti-*c-myc*, 9E10. Para marcação dos núcleos (a verde) as células Huh7 foram incubadas com um anticorpo policlonal anti-laminas A/C.

A análise da distribuição intracelular das proteínas de fusão *c-myc*-PK-66-75HDAg, *c-myc*-PK-66-74HDAg e *c-myc*-PK-E66A-75HDAg, em conjunto com os resultados anteriores, permite concluir que os aminoácidos <sup>66</sup>EGAPPKRAR<sup>75</sup> formam a sequência mínima do HDAg capaz de causar a redistribuição da proteína de fusão *c-myc*-PK do citoplasma para o núcleo de células de hepatoma humano.

Em conclusão, utilizando uma abordagem que consistiu na análise da distribuição intracelular da proteína *c-myc*-PK fundida com várias sequências de aminoácidos do HDAg, mostrou-se

que o antígeno delta possui um único NLS na sua sequência. O NLS identificado situa-se entre os aminoácidos 66 e 75 do HDAg, que se comprovou terem um resíduo de ácido glutâmico e de arginina, respectivamente, cruciais para a sua função.

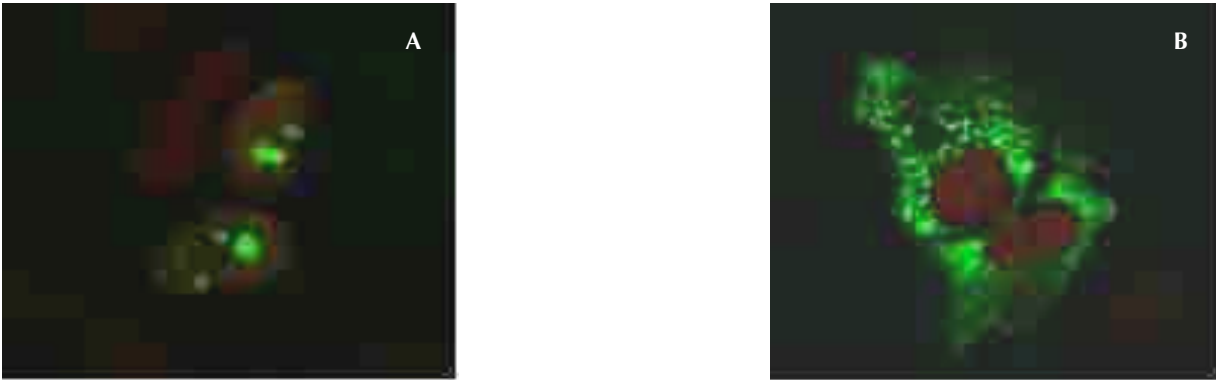
### **III.4.2 Os AMINOÁCIDOS DE 66 A 75 SÃO ESSENCIAIS PARA A IMPORTAÇÃO NUCLEAR DO HDAg**

Tendo-se verificado que os aminoácidos 66 a 75 do HDAg correspondem à sequência mínima do HDAg capaz de promover a importação nuclear da proteína *c-myc-PK*, pretendeu-se investigar o papel da sequência na importação nuclear do antígeno delta.

O primeiro passo dado neste sentido consistiu na análise da localização intracelular de proteínas de fusão, a EGFP (enhanced green fluorescent protein) fundida com a sequência completa do antígeno pequeno do HDV (EGFP-S-HDAg) e a proteína de fusão idêntica, contudo, sem os aminoácidos 66 a 75 do HDAg (EGFP-S-HDAg $\Delta$ NLS). A escolha da proteína EGFP para os ensaios de importação prende-se com o facto desta não possuir nenhum sinal específico que a dirija para o compartimento nuclear e dadas as suas pequenas dimensões, cerca de 27 kDa, ser detectada em ambos os compartimentos celulares. Contudo, a proteína de EGFP fundida com o S-HDAg é detectada exclusivamente nos núcleos das células transfectadas, uma distribuição intracelular em tudo semelhante à observada para a proteína S-HDAg nativa (Tavanez *et al.*, 2001).

A análise da distribuição intracelular das proteínas de fusão foi efectuada por microscopia confocal, após transfecção de células de hepatoma humano com os vectores pEGFP-C1-S-HDAg (Tavanez *et al.* 2001) e pEGFP-C1-S-HDAg $\Delta$ NLS. O último vector foi construído por inserção no vector pEGFP-C1 de duas sequências de DNA com 213 e 381 bp, previamente ligadas, que codificam para os aminoácidos 1 a 65 e 75 a 195 do HDAg, respectivamente.

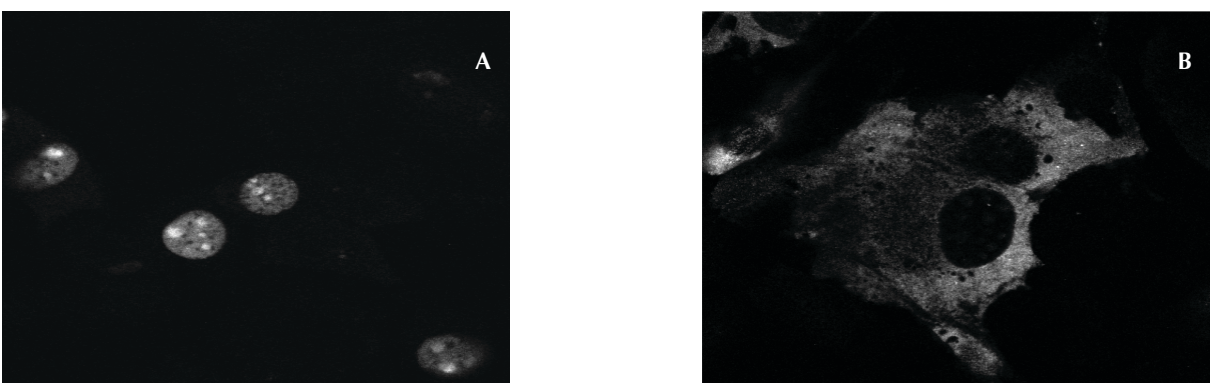
As figuras III.4.2.1 A e B ilustram os resultados obtidos para a localização intracelular das proteínas de fusão analisadas. A proteína EGFP fundida com a sequência completa do S-HDAg é detectada exclusivamente no núcleo das células Huh7 (Figura III.4.2.1 A). Já a proteína EGFP fundida com o HDAg sem a sequência de aminoácidos de 66 a 75, apresenta uma distribuição, unicamente, citoplasmática (Figura III.4.2.1 B). O facto da proteína de fusão EGFP-S-HDAg $\Delta$ NLS ser observada apenas no citoplasma demonstra que os aminoácidos 66 a 75 são necessários para a importação nuclear dos antígenos delta.



**Figura III.4.2.1.** Localização intracelular das proteínas de fusão EGFP-HDAg e EGFP-HDAgΔNLS em células de hepatoma humano. Células Huh7 foram transfectadas com as construções pEGFP-C1-HDAg e pEGFP-C1-SHAgΔNLS (A e B a verde, respectivamente). 16 horas após a transfecção as células foram fixadas e permeabilizadas com Triton-X-100 e incubadas com um anticorpo de coelho anti-lamina A/C para marcação dos núcleos (vermelho).

Simultaneamente, utilizaram-se os vectores pEGFP-C1-S-HDAg e pEGFP-C1-S-HDAgΔNLS para transfectar fibroblastos de murganho NIH 3T3, com o objectivo de averiguar se o NLS do HDAg é específico para células hepáticas. Como se pode observar na figura III.4.2.2, não foram detectadas diferenças na distribuição intracelular das proteínas de fusão EGFP-SHDAg e EGFP-S-HDAgΔNLS entre os fibroblastos de murganho e as células de hepatoma humano. A proteína de fusão EGFP-S-HDAg localiza-se no núcleo (Figura III.4.2.2 A) enquanto que a proteína EGFP-S-HDAgΔNLS, tal como foi observado nas células Huh7, encontra-se somente no citoplasma (Figura III.4.2.2 B).

A localização nuclear da proteína de fusão EGFP-S-HDAg, contrastando com a distribuição citoplasmática da proteína EGFP-S-HDAgΔNLS, em diferentes linhas celulares mostra que o NLS do HDAg não é específico para células de fígado humano.



**Figura III.4.2.2.** Localização intracelular das proteínas de fusão EGFP-S-HDAg e EGFP-S-HDAgΔNLS em fibroblastos de murganho NIH 3T3. Células NIH 3T3 foram transfectadas com as construções pEGFP-C1-HDAg e pEGFP-C1-SHAgΔNLS (A e B, respectivamente). 16 horas após a transfecção as células foram fixadas e permeabilizadas com Triton-X-100 e incubadas com um anticorpo de coelho anti-lamina A/C para marcação dos núcleos.

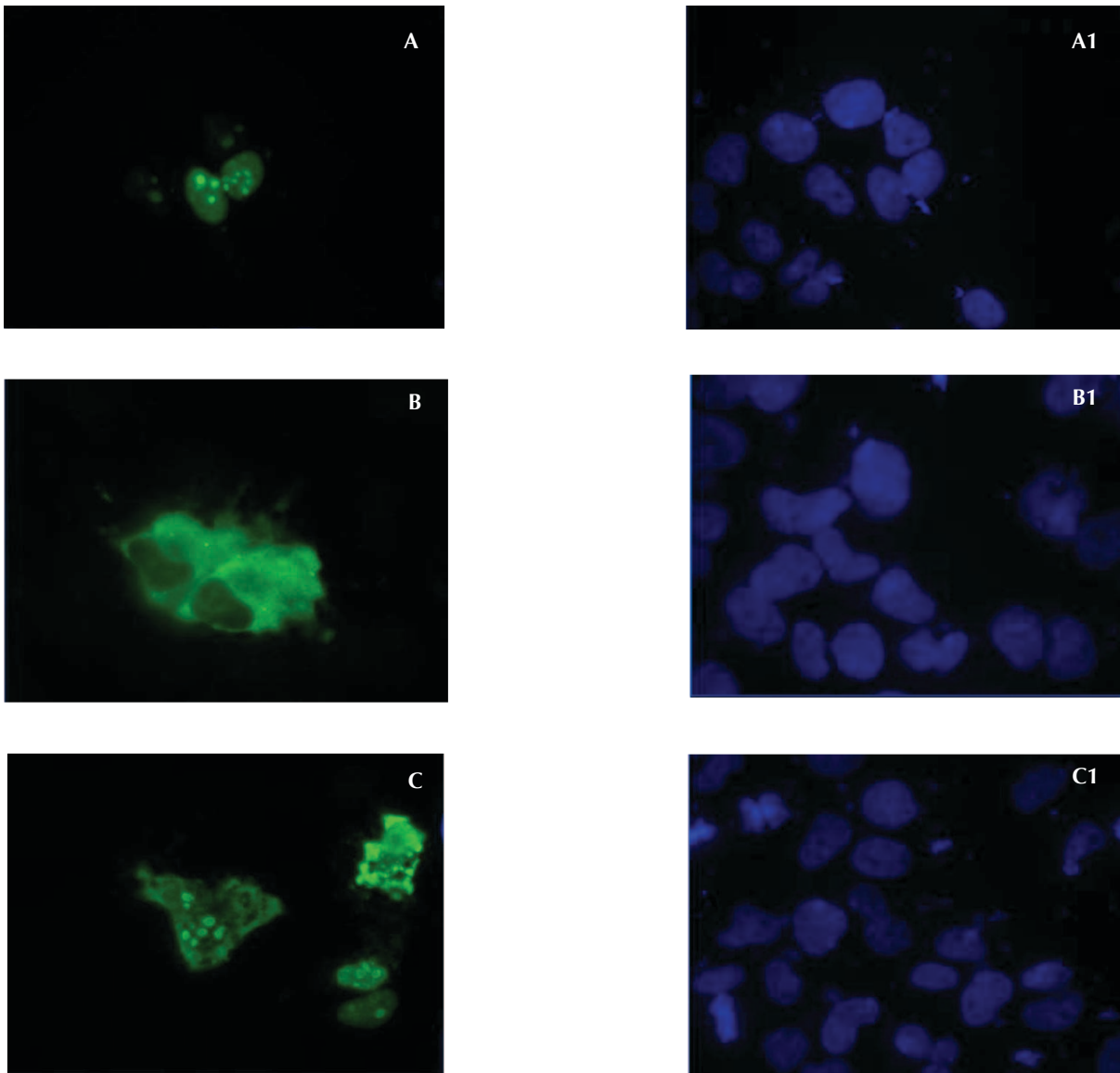
Os resultados obtidos nas experiências anteriores mostram que os aminoácidos 66 a 75 são necessários para promover a importação nuclear do HDAg quando fundido com a proteína de fusão EGFP. A análise da função de um domínio proteico com o recurso a proteínas de fusão requer certos cuidados na interpretação dos resultados, uma vez que a sequência de aminoácidos vizinha do local de ligação das duas proteínas pode contribuir para os resultados observados.

De modo a testar a hipótese dos aminoácidos do local de ligação da proteína EGFP com o antígeno delta poderem interferir na localização intracelular das proteínas de fusão EGFP-S-HDAg e EGFP-S-HDAg $\Delta$ NLS, analisou-se o papel do NLS identificado na distribuição intracelular do HDAg nativo. Para expressão da proteína nativa, construíram-se 3 vectores: pCI-neo-HDAg, pCI-neo-HDAg $\Delta$ NLS e pCI-neo-HDAgE66A. A diferença entre os vectores pCI-neo-HDAgE66A e pCI-neo-HDAg está no facto do primeiro possuir um codão alterado na sequência de cDNA do HDAg e codificar para o antígeno delta com uma mutação no aminoácido 66. No lugar do ácido glutâmico na posição 66, a proteína HDAgE66A possui um resíduo de alanina. No vector pCI-neo-HDAg $\Delta$ NLS removeu-se a sequência que codifica os aminoácidos 66 a 75 do HDAg.

A distribuição intracelular das proteínas, após transfecção, foi analisada por imunofluorescência indirecta, empregando o anticorpo policlonal anti-HDAg, seguida de microscopia confocal. Nestes ensaios, a demarcação dos núcleos das células foi efectuada por incubação com DAPI.

Tal como esperado o HDAg localiza-se no núcleo das células (Figura III.4.2.3 A1) e o HDAg sem a sequência de aminoácidos de 66 a 75 é detectado unicamente no citoplasma (Figura III.4.2.3 B1). A localização citoplasmática observada para a proteína HDAg $\Delta$ NLS indica, claramente, que os aminoácidos 66 a 75 são cruciais para a localização nuclear do HDAg, concluindo-se que a sequência identificada corresponde, de facto, ao NLS responsável pela importação nuclear do antígeno delta.

No que diz respeito ao HDAg com o aminoácido ácido glutâmico da posição 66 substituído por um resíduo de alanina, verificou-se que a proteína mutada distribui-se pelo núcleo e citoplasma das células transfectadas (Figura III.4.2.3 C1). Estes resultados corroboram as evidências anteriores de que o aminoácido da posição 66 do HDAg desempenha um papel importante na função do NLS do HDAg. Em conclusão, estes resultados provam que a sequência de aminoácidos <sup>66</sup>EGAPPAKRAR<sup>75</sup> do HDAg funciona como NLS e é a sequência de aminoácidos responsável pela importação nuclear do antígeno delta.



**Figura III.4.2.3.** Localização intracelular das proteínas HDAG, HDAG $\Delta$ NLS e HDAG E66A em células Huh7. As células foram transfectadas com os vectores pCI-neo-HDAG (A1 e A2), pCI-neo-HDAG $\Delta$ NLS (B1 e B2) e pCI-neo-HDAG E66EA (C1 e C2), respectivamente. Após fixação e permeabilização os HDAGs foram detectado por incubação com soro policlonal de coelho anti-antígenios delta, B3 (verde) e o DNA total foi marcado com DAPI (azul).

### III.4.3 SELECÇÃO DE PROTEÍNAS CELULARES COM AFINIDADE PARA O NLS DO HDAG

O HDAG, apesar das suas pequenas dimensões, 24 kDa, depende totalmente da presença do sinal de importação nuclear localizado entre os aminoácidos 66 a 75 para aceder ao núcleo das células. Esta observação sugere que o mecanismo molecular através do qual o HDAG é transportado para o núcleo envolve a participação de proteínas membros da superfamília da

carioferinas- $\beta$  que se caracterizam pela capacidade de interacção simultânea com os NLS presentes nas proteínas a transportar e as nucleoporinas, unidades estruturais e funcionais do NPC.

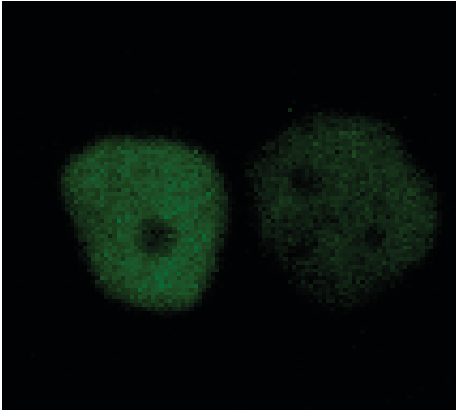
Com o objectivo de identificar as proteínas intervenientes na importação nuclear do HDAg procedeu-se, inicialmente, à purificação das proteínas de extractos proteicos de células Huh7 com afinidade para o NLS do HDAg. Para isso, realizaram-se ensaios de cromatografia de afinidade com a proteína GST fundida com o NLS do HDAg. As proteínas celulares com afinidade para o NLS do HDAg foram analisadas por electroforese em géis de SDS-poliacrilamida e identificadas por espectrometria de massa (MALDI-TOF-TOF).

### **III.4.3.1 O PÉPTIDO FORMADO POR TRÊS CÓPIAS, DISPOSTAS *EM TANDEM*, DO NLS DO HDAg É CAPAZ DE PROMOVER A IMPORTAÇÃO NUCLEAR DA PROTEÍNA *c-myc*-PK**

Dado que a sequência responsável pela importação nuclear do HDAg é formada, apenas, por 10 aminoácidos, optou-se por produzir uma proteína de fusão GST com três repetições do NLS do HDAg, dispostos em *tandem*.

Antes da utilização da proteína de fusão GST-3X-HDAg-NLS nos ensaios de cromatografia de afinidade, avaliou-se a capacidade do NLS do HDAg em triplicado mediar a importação nuclear da proteína *c-myc*-PK. A sequência que codifica para as três cópias, em *tandem*, do NLS do HDAg foi obtida por síntese de dois oligonucleótidos de cadeia simples complementares. Após emparelhamento *in vitro*, o oligonucleótido foi introduzido no vector pcDNA1-*c-myc*-PK. Após transfecção, a distribuição intracelular da proteína de fusão foi analisada por imunofluorescência indirecta e microscopia confocal.

A proteína de fusão *c-myc*-PK-3X-HDAg-NLS localiza-se, exclusivamente, no núcleo das células transfectadas, evidenciando que o NLS do HDAg em triplicado retém a capacidade de promover a importação nuclear da proteína repórter *c-myc*-PK (Figura III.4.3.1). Os resultados obtidos mostram que a repetição da sequência de aminoácidos que forma o NLS do HDAg não compromete o mecanismo através do qual o HDAg é transportado para o núcleo, sugerindo que as interacções entre o antígeno delta e os receptores de transporte não são afectadas.



**Figura III.4.3.1.** Distribuição intracelular da proteína de fusão *c-myc*-PK-3X-HDAg-NLS. Células Huh7 transfectadas com o vector pcDNA1-*c-myc*-PK-3X-HDAg-NLS foram incubadas o anticorpo monoclonal anti-*c-myc*, 9E10 para detecção da proteína de fusão (verde).

### III.4.3.2 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

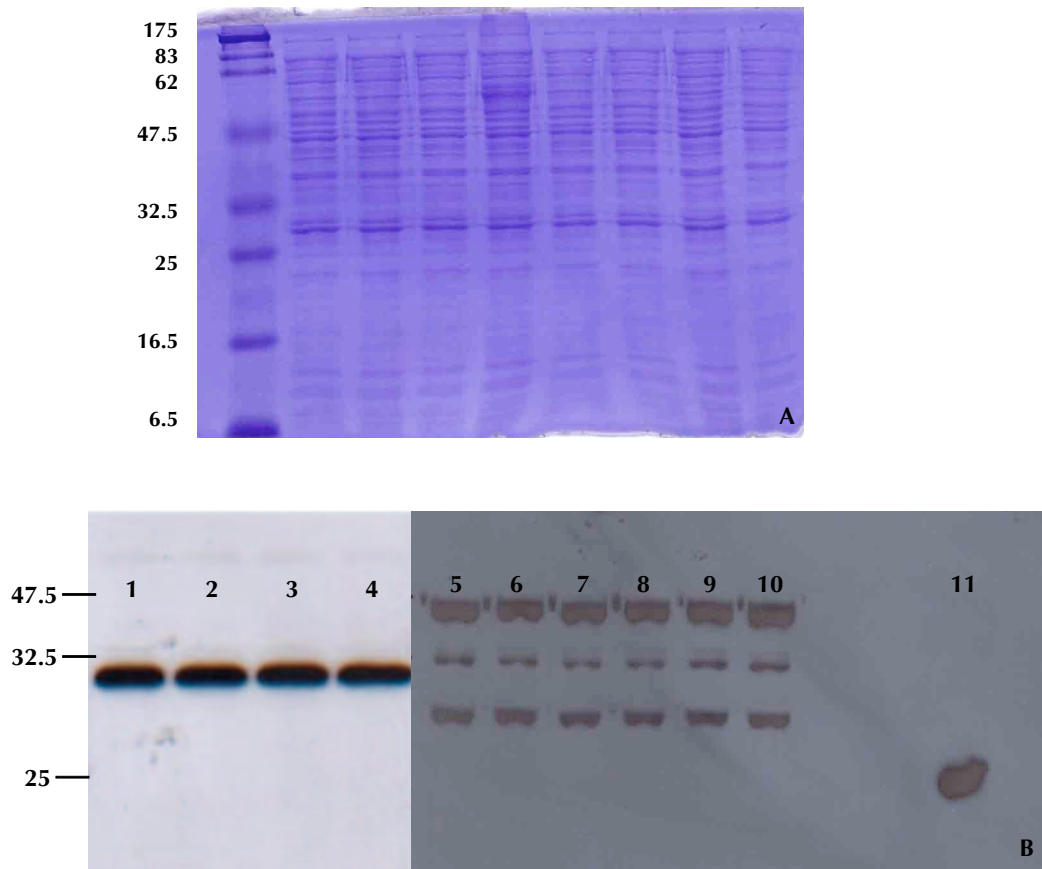
As proteínas de fusão GST utilizadas nos ensaios de cromatografia de afinidade foram produzidas em bactérias *E. coli* BL21, co-transformadas com os plasmídeos pGEX-6p-2 e pACYC-RP. Este último foi utilizado para aumentar a síntese de tRNAs raros em *E. coli* e permitir a tradução correcta de proteínas a partir de sequências ricas em G e C.

Para a expressão das proteínas recombinantes foram utilizados os plasmídeos pGEX-6p-2, pGEX-6p-2-3X-HDAg-NLS e pGEX-6p-2-S-HDAg que codificam para as proteínas GST, GST fundida com três cópias do NLS do HDAg, em tandem, e GST fundida com o S-HDAg do tipo selvagem. A estratégia de clonagem utilizada para construção do vector pGEX-6p-2-3X-HDAg-NLS foi em tudo semelhante à utilizada na construção do plasmídeo pcDNA1-*c-myc*-PK-3X-HDAg-NLS, ou seja, foi clonado um oligonucleótido de cadeia dupla que codifica três cópias do NLS do HDAg entre os locais *EcoRI* e *XhoI* do vector pGEX-6p-2.

A expressão das proteínas de fusão GST foi analisada por SDS-PAGE seguida da técnica de *Western blot*, empregando-se um anticorpo que reconhece especificamente a proteína GST.

Na figura III.4.3.2 são apresentados os resultados da análise por SDS-PAGE (A) e *Western blot* (B) das proteínas totais de *E. coli* BL21 transformadas com o vector pGEX-6p-2 ou derivados. A análise por *Western blot* mostrou que os extractos proteicos de *E. coli* BL21, transformadas com os vectores pGEX-6p-2 e pGEX-6p-2-3X-HDAg-NLS, apresentam um produto único, com as dimensões esperadas, para as proteínas GST (25 kDa; Figura III.4.3.2 B) e GST fundida com três cópias do NLS do HDAg (30 kDa; Figura III.4.3.2 B), respectivamente. Nos extractos proteicos totais de *E. coli* BL21 transformadas com o vector pGEX-6p-2-S-HDAg, para além de uma banda com cerca de 50 kDa, correspondente à proteína de fusão GST-S-HDAg, foram detectadas bandas adicionais com tamanhos inferiores (Figura III.4.3.2 B). Estas bandas

poderão corresponder a produtos de degradação proteica ou a formas truncadas da proteína GST-S-HDAg.



**Figura III.4.3.2.** Análise por SDS-PAGE e *Western Blot* dos extractos proteicos totais obtidos a partir de culturas líquidas de bactérias *E. coli* BL21 transformadas com os vectores pGEX-6p-2, pGEX-6p-2-3X-HDAg-NLS e pGEX-6p-2-SHDAg. Colónias de *E. coli* BL21 co-transformadas com os vectores pACYC-RP e pGEX-6p-2 ou derivados, foram inoculadas em meio 2X YTA e a expressão das proteínas de fusão GST, GST-3X-HDAg-NLS e GST-S-HDAg foi induzida na presença de IPTG. Por último, as bactérias foram lisadas e as proteínas totais foram separadas por electroforese em géis de poliacrilamida-SDS a 12%. Em (A) apresenta-se os extractos totais de *E. coli* BL21 separados por electroforese e corados com azul brilhante de Coomassie. Em B, os extractos totais de *E. coli* BL21 foram transferidos para membranas nitrocelulose e a detecção das proteínas GST-3X-HDAg-NLS (colunas 1 a 4), GST-S-HDAg (colunas 5 a 10) e GST (coluna 11), foi efectuada por quimioluminescência, após incubação das membranas com o anticorpo anti-GST. Na primeira coluna de A e à esquerda de B são apresentados os tamanhos em kDa de uma mistura comercial de proteínas com dimensões entre os 16.5 e 175 kDa.

Tendo-se verificado que as bactérias *E. coli* BL21 transformadas com as três construções pGEX-6p-2 expressam as proteínas de fusão com as dimensões correctas, procedeu-se à sua purificação por cromatografia de afinidade, utilizando colunas comerciais preenchidas com uma matriz de glutationa. Após purificação, as proteínas de fusão foram de novo analisadas por

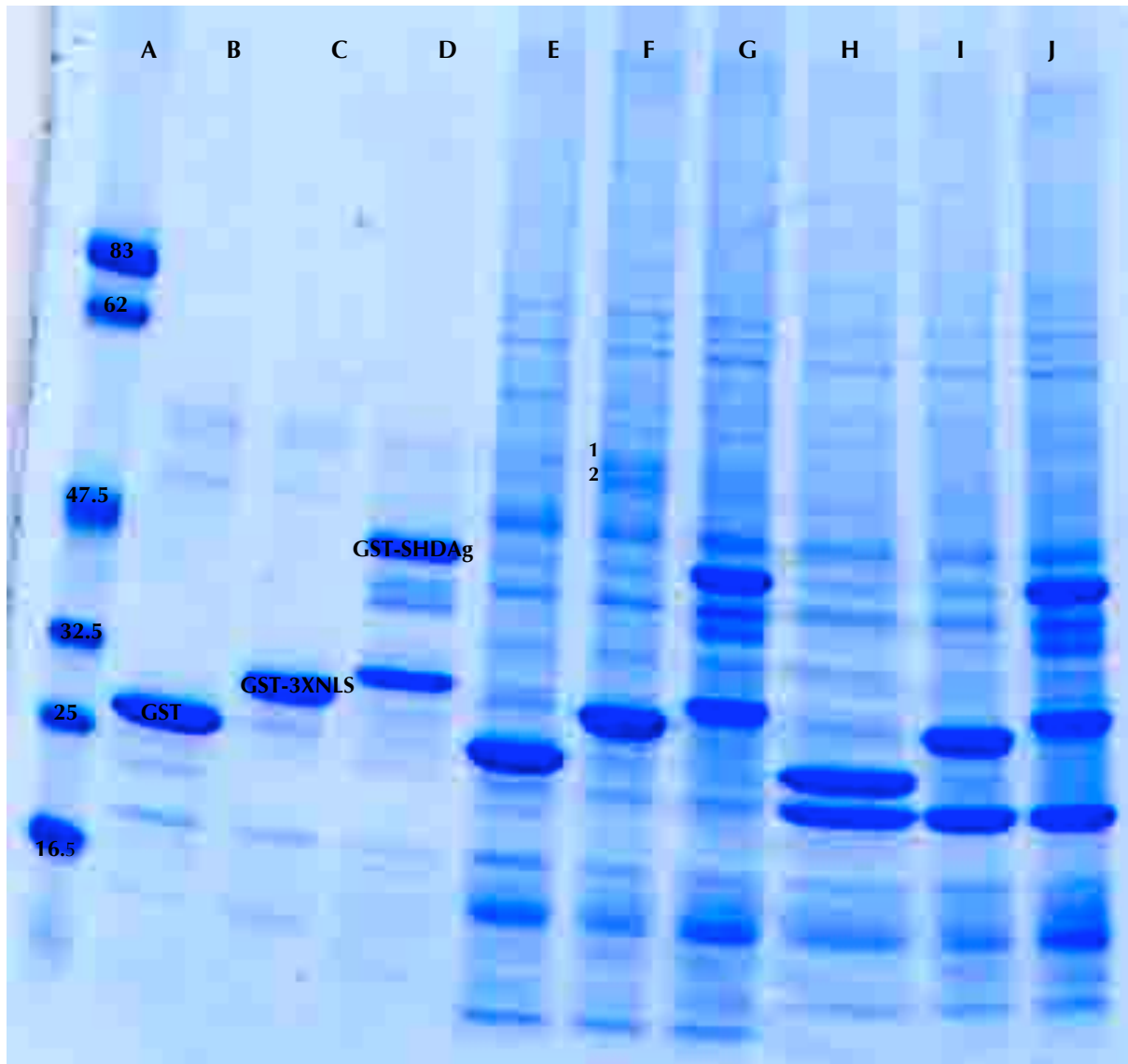
SDS-PAGE, sujeitas a diálise e a sua concentração determinada pelo método de Bradford, com o corante *Dye reagent concentrate* (BioRad Protein Assay).

### **III.4.3.3 SELECÇÃO DE PROTEÍNAS CELULARES COM AFINIDADE PARA O NLS DO HDAg**

A selecção de proteínas celulares com afinidade para as proteínas GST foi efectuada por incubação de 20 µg de proteína recombinante (Figura III.4.3.3, colunas B, C e D), imobilizada em partículas magnéticas, com cerca de 5 mg de lisados de células Huh7, em tampão de baixa ou elevada salinidade.

As proteínas de células Huh7 com afinidade para as proteínas de fusão GST foram separadas por electroforese em gel SDS-poliacrilamida de gradiente 5 a 20% e analisadas por coloração com Brilliant blue G-250. As proteínas dos lisados de células Huh7 que interagem com a proteína GST-3X-HDAg-NLS foram comparadas com as fracções proteicas isoladas por cromatografia de afinidade, utilizando as proteínas GST e GST-S-HDAg (Figura III.4.3.3).

A comparação dos padrões electroforéticos das proteínas obtidas por cromatografia de afinidade com as proteínas GST mostrou a existência de inúmeras proteínas nas fracções isoladas por cromatografia de afinidade que se encontram ausentes nas colunas correspondentes às proteínas GST que não foram incubadas com lisados de células Huh7. No que diz respeito aos resultados obtidos nos ensaios de cromatografia com as três proteínas GST, registaram-se poucas diferenças no número de proteínas com afinidade diferencial para as proteínas GST-3X-HDAg-NLS e GST-S-HDAg quando comparadas com as proteínas dos extractos proteicos de células Huh7 isoladas com a proteína GST. Estes resultados sugerem que a maioria das proteínas isoladas em associação com as proteínas recombinantes apresenta afinidade preferencial para a sequência de aminoácidos que forma a proteína GST, em relação aos aminoácidos que constituem o NLS do HDAg ou o antígeno delta. Contudo, verificou-se a existência de duas bandas (assinaladas na coluna F da figura III.4.3.3 com os números 1 e 2) nas fracções proteicas de células Huh7 isoladas com a proteína GST-3X-HDAg-NLS que não estão presentes entre as proteínas isoladas com a proteína GST. Estas bandas são detectadas apenas nos eluídos dos ensaios de ligação realizados em condições de baixa salinidade. A ausência das bandas nos eluídos dos ensaios de ligação em condições de elevada salinidade pode significar que as interacções identificadas são de baixa afinidade. No entanto, as bandas assinaladas foram removidas do gel para posterior identificação das proteínas, por espectrometria de massa.

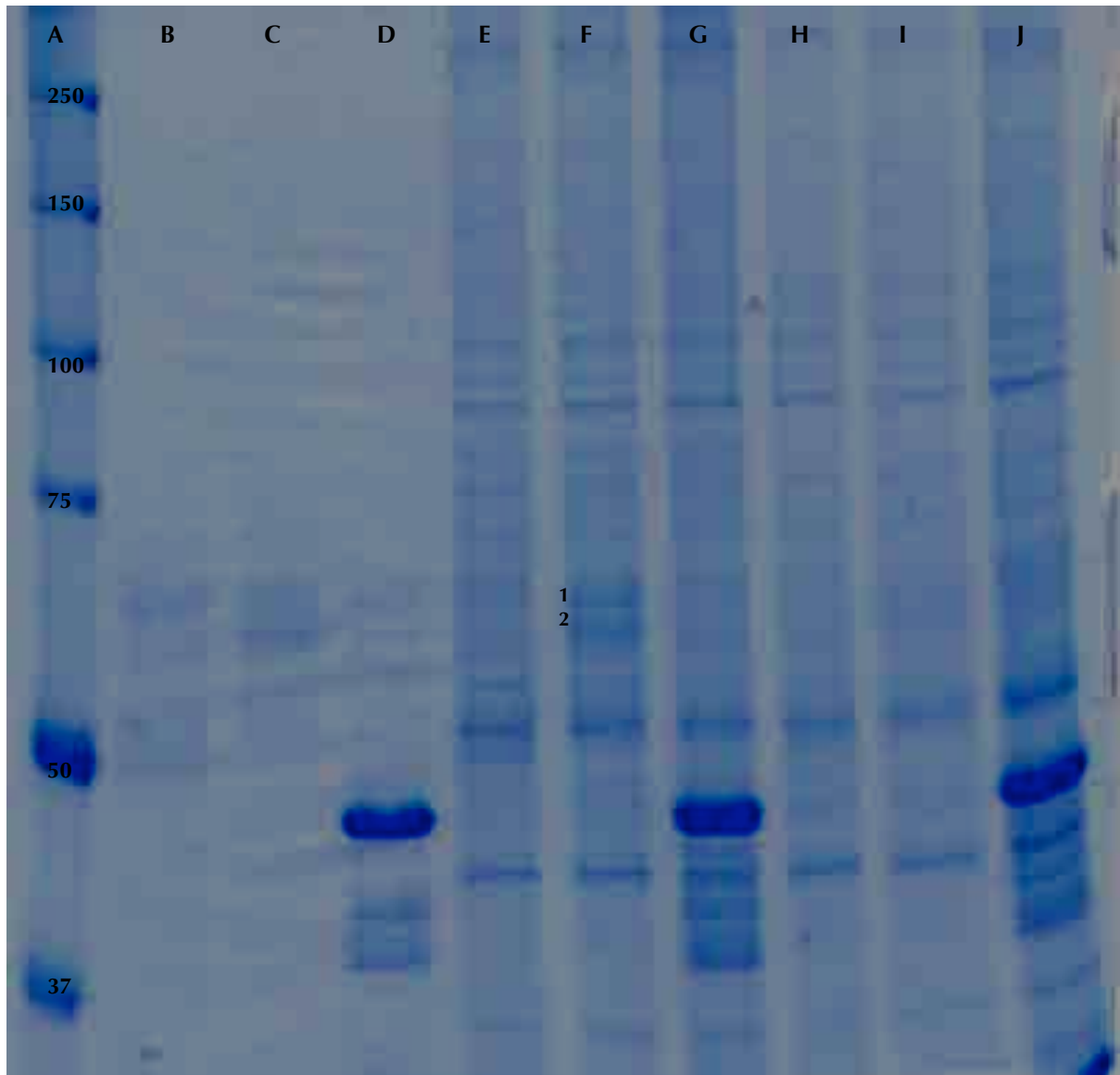


**Figura III.4.3.3.** Perfil electroforético das proteínas de células de Huh7 isoladas por cromatografia de afinidade com as proteínas de fusão GST, GST-3X-HDAg-NLS e GST-S-HDAg. As proteínas de fusão GST (coluna B), GST-3X-HDAg-NLS (coluna C) e GST-SHDAg (coluna D) parcialmente purificadas, foram imobilizadas em partículas magnéticas revestidas de glutationa e incubadas com cerca de 5 mg de extractos proteicos totais de células Huh7. As incubações foram efectuadas em condições de baixa e elevada salinidade e as proteínas celulares com afinidade para as proteínas de fusão GST foram separadas por electroforese em géis de poliacrilamida 5-20% e coradas com Brilliant Blue. Nas colunas E a G, podem-se observar as proteínas celulares isoladas com afinidade para as proteínas GST, GST-3X-HDAg-NLS e GST-SHDAg, respectivamente, em tampão de baixa salinidade. As colunas H a J, correspondem aos mesmos ensaios efectuados em condições de elevada salinidade. Na coluna A são apresentadas as massas moleculares de uma mistura comercial de proteínas com dimensões entre os 16.5 e 175 kDa. Os números 1 e 2 marcam as bandas seleccionadas para posterior identificação das proteínas por espectrometria de massa.

A análise dos resultados obtidos mostra que grande parte das proteínas isoladas por cromatografia de afinidade apresenta dimensões superiores a 50 kDa. Para se obter uma melhor resolução das proteínas de maior peso molecular, efectuaram-se dois novos ensaios de cromatografia de afinidade, reproduzindo as condições experimentais atrás descritas. Os resultados destes ensaios foram analisados, tal como os anteriores, por SDS-PAGE. Porém, em vez dos géis de poliacrilamida de gradiente 5 a 20%, utilizaram-se géis de poliacrilamida de 7.5%.

As figuras III.4.3.4 e III.4.3.5 mostram os resultados obtidos dos dois ensaios independentes de cromatografia de afinidade, realizados em condições de baixa e elevada salinidade.

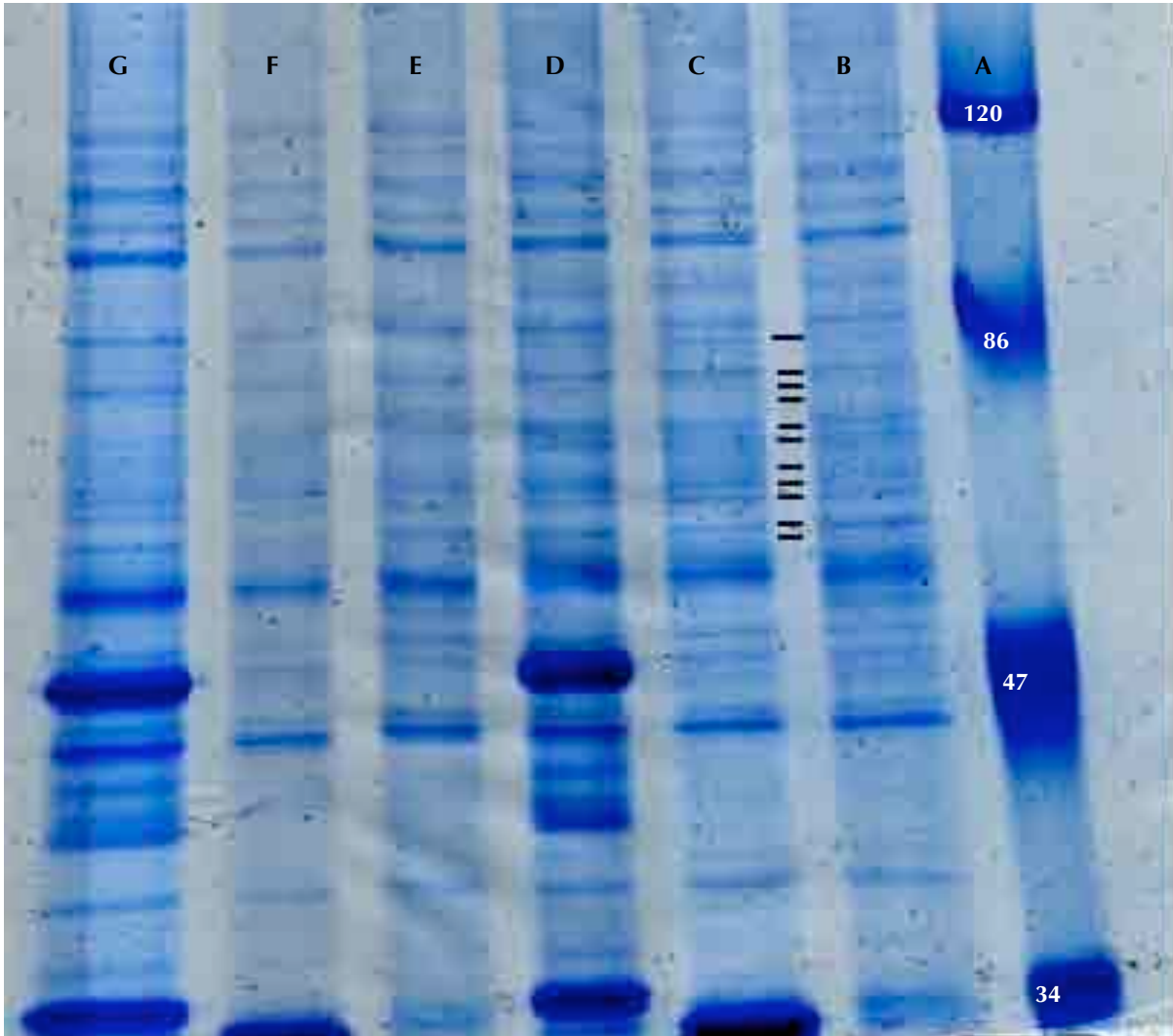
Os resultados do primeiro ensaio, analisados por electroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 7.5%, mostram a existência de duas bandas entre as proteínas celulares isoladas com a proteína de fusão GST-3X-HDAg-NLS que não são visíveis entre as proteínas isoladas por cromatografia de afinidade com a proteína GST. Note-se que as duas bandas identificadas na coluna das proteínas celulares com afinidade diferencial para a proteína GST-3X-HDAg-NLS apresentam as mesmas dimensões das bandas encontradas no ensaio anterior, em que as proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida de gradiente 5 a 20%. De acordo com os resultados anteriores, as bandas com dimensões entre 50 e 75 kDa são detectadas apenas entre as proteínas isoladas nos ensaios de ligação em tampão de baixa salinidade. As duas bandas, assinaladas na figura III.4.3.4 com os números 1 e 2, foram removidas do gel para posterior identificação por espectrometria de massa.



**Figura III.4.3.4.** Perfil electroforético das proteínas de células Huh7 isoladas por cromatografia de afinidade com as proteínas de fusão GST, GST-3X-HDAg-NLS e GST-S-HDAg. As proteínas de fusão GST (coluna B), GST-3X-HDAg-NLS (coluna C) e GST-SHDAg (coluna D) parcialmente purificadas, foram imobilizadas em partículas magnéticas revestidas de glutationa e incubadas com cerca de 5 mg de extractos proteicos totais de células Huh7. As incubações foram efectuadas em condições de baixa e elevada salinidade e as proteínas celulares com afinidade para as proteínas de fusão GST foram separadas por electroforese em géis de poliacrilamida 7.5% e coradas com Brilliant Blue. Nas colunas E a G, podem-se observar as proteínas celulares isoladas com afinidade para as proteínas GST, GST-3X-HDAg-NLS e GST-SHDAg, respectivamente, em tampão de baixa salinidade. As colunas H a J, correspondem aos mesmos ensaios efectuados em condições de elevada salinidade. Na coluna A são apresentadas as massas moleculares de uma mistura comercial de proteínas com dimensões entre os 37 e 250 kDa.

Os números 1 e 2 marcam as bandas seleccionadas para posterior identificação das proteínas por espectrometria de massa.

Na figura III.4.3.5 podem ser observados os perfis electroforéticos das proteínas celulares isoladas no segundo ensaio de cromatografia de afinidade com as proteínas GST, GST-3X-NLS-HDAg e GST-SHDAg. Tal como atrás mencionado, as proteínas foram analisadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 7.5% e coradas, após fixação, com Brilliant Blue G-250.



**Figura III.4.3.5.** Perfil electroforético das proteínas de células Huh7 isoladas por cromatografia de afinidade com as proteínas de fusão GST, GST-3X-HDAg-NLS e GST-S-HDAg. As proteínas de fusão GST, GST-3X-HDAg-NLS, e GST-SHDAg parcialmente purificadas, foram imobilizadas em partículas magnéticas revestidas de glutationa e incubadas com cerca de 5 mg de extractos proteicos totais de células Huh7. As incubações foram efectuadas em condições de baixa e elevada salinidade e as proteínas celulares com afinidade para as proteínas de fusão GST foram separadas por electroforese em géis de poliacrilamida 7.5% e coradas com Brilliant Blue. Nas colunas B a D, podem-se observar as proteínas celulares isoladas com afinidade para as proteínas GST, GST-3X-HDAg-NLS e GST-SHDAg, respectivamente, em tampão de baixa salinidade. As colunas E a G, correspondem aos mesmos ensaios efectuados em condições de elevada salinidade. Na coluna A são apresentados as massas moleculares de uma mistura comercial de proteínas com dimensões entre os 34 e 120 kDa. Os traços marcam as posições das bandas removidas do gel, das colunas B e D para posterior identificação das proteínas por espectrometria de massa.

Neste ensaio, não se detectaram diferenças evidentes no padrão de bandas, entre as colunas correspondentes às proteínas isoladas por cromatografia com a proteína GST fundida com três cópias do NLS do HDAG e a proteína GST. Porém, decidiu-se remover 11 bandas do gel, com dimensões próximas das bandas anteriormente identificadas nos eluídos dos ensaios de ligação com a proteína GST-3X-HDAG-NLS, as quais poderão, eventualmente conter proteínas que estabelecem interacção específica com o NLS do HDAG. Para averiguar, se as bandas removidas correspondem a proteínas com afinidade específica para a proteína de fusão GST-3X-HDAG-NLS, foram também, retiradas bandas com tamanhos idênticos da coluna correspondente ao produto da cromatografia de afinidade com a proteína GST. As bandas removidas, para posterior identificação das proteínas, encontram-se assinaladas na figura III.4.3.5.

Tal como anteriormente descrito, a identificação das proteínas seleccionadas foi efectuada por espectrometria de massa. Os espectros de massa dos péptidos, resultantes da hidrólise enzimática das proteínas, presentes nas bandas excisadas dos géis de poliacrilamida, com tripsina, foram adquiridos num espectrómetro de massa do tipo MALDI-TOF TOF. O perfil de clivagem gerado pela tripsina é característico de cada proteína. As proteínas foram identificadas por comparação dos espectros de massa, obtidos com os espectros resultantes da digestão teórica de proteínas depositadas em bases de dados.

Das 15 bandas removidas dos géis, identificaram-se apenas três proteínas, não tendo sido possível identificar as proteínas presentes somente nos eluídos dos ensaios de cromatografia de afinidade com a proteína GST-3X-HDAG-NLS.

Entre as proteínas identificadas (Tabela III.4.2), verificou-se que nenhuma interage especificamente com o NLS do HDAG. Tanto a vimentina como a proteína de choque térmico HSPA8, foram detectadas nos eluídos dos ensaios de cromatografia de afinidade com as proteínas GST e GST-3X-HDAG-NLS, sendo consideradas por isso como falsos positivos. De acordo com os dados da tabela III.4.2, a proteína PKM2 só foi identificada na fracção proteica co-purificada com a proteína GST-3X-HDAG-NLS. Durante o processo de isolamento e identificação de proteínas, a banda contendo proteínas com dimensões idênticas à PKM2, da coluna controlo (proteínas celulares co-purificadas com a GST) foi contaminada com queratina, pelo que não se conseguiu confirmar a interacção da proteína PKM2 com a proteína GST. Deste modo, não se pode afirmar que a proteína PKM2 é capaz de se ligar especificamente ao NLS do HDAG.

Proteínas celulares isoladas por cromatografia de afinidade com a proteína de fusão GST-3X-HDAg-NLS			Proteínas celulares isoladas por cromatografia de afinidade com a proteína GST			
Bandas	Proteínas	Score	Proteínas	Score	ID Swiss-Prot	Peso molecular (kDa)
F	Vimentina ( <b>VIM</b> )	147	<b>VIM</b>	170	P08670	53.65
H	Cinase do piruvato, M1/M2 <b>PKM2</b>	120	Sem identificação	—	P14618	57.93
M	Proteína de choque térmico de 71 kDa ( <b>HSPA8</b> )	166	<b>HSPA8</b>	330	P11142	70.89

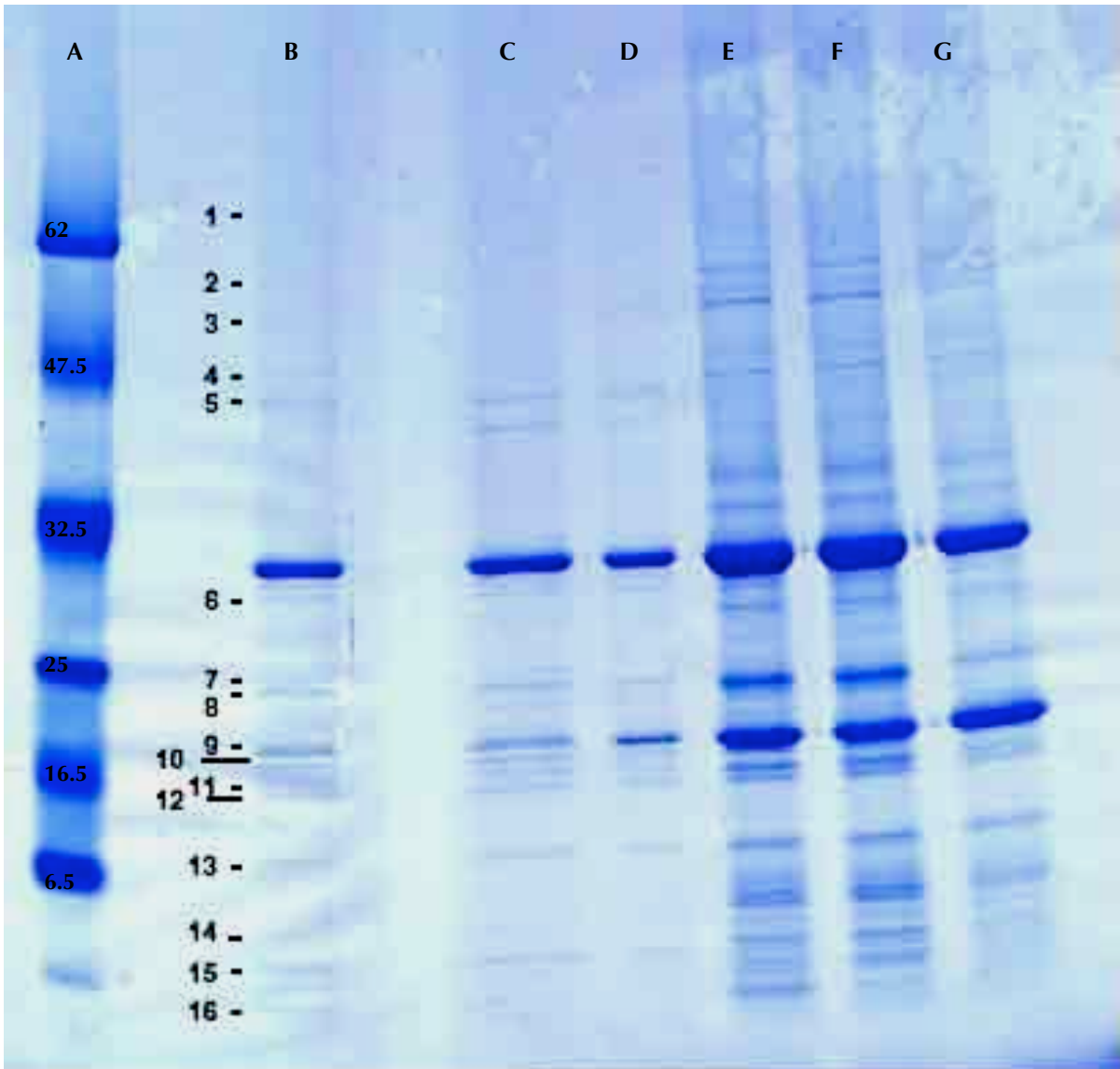
**Tabela III.4.2.** Proteínas identificadas por espectrometria de massa MALDI-TOF-TOF das bandas removidas do gel de poliacrilamida apresentado na figura III.4.3.5.

Atendendo ao facto das proteínas identificadas, com excepção da HSPA8, não se encontrarem envolvidas na importação nuclear e à dificuldade de identificar proteínas com propriedades de ligação específicas com o NLS do HDAg, decidiu-se introduzir algumas alterações no procedimento experimental. As alterações efectuadas tiveram como objectivo separar as proteínas celulares com afinidade para os aminoácidos da proteína GST daquelas que se ligam especificamente ao NLS do HDAg, previamente à análise por SDS-PAGE.

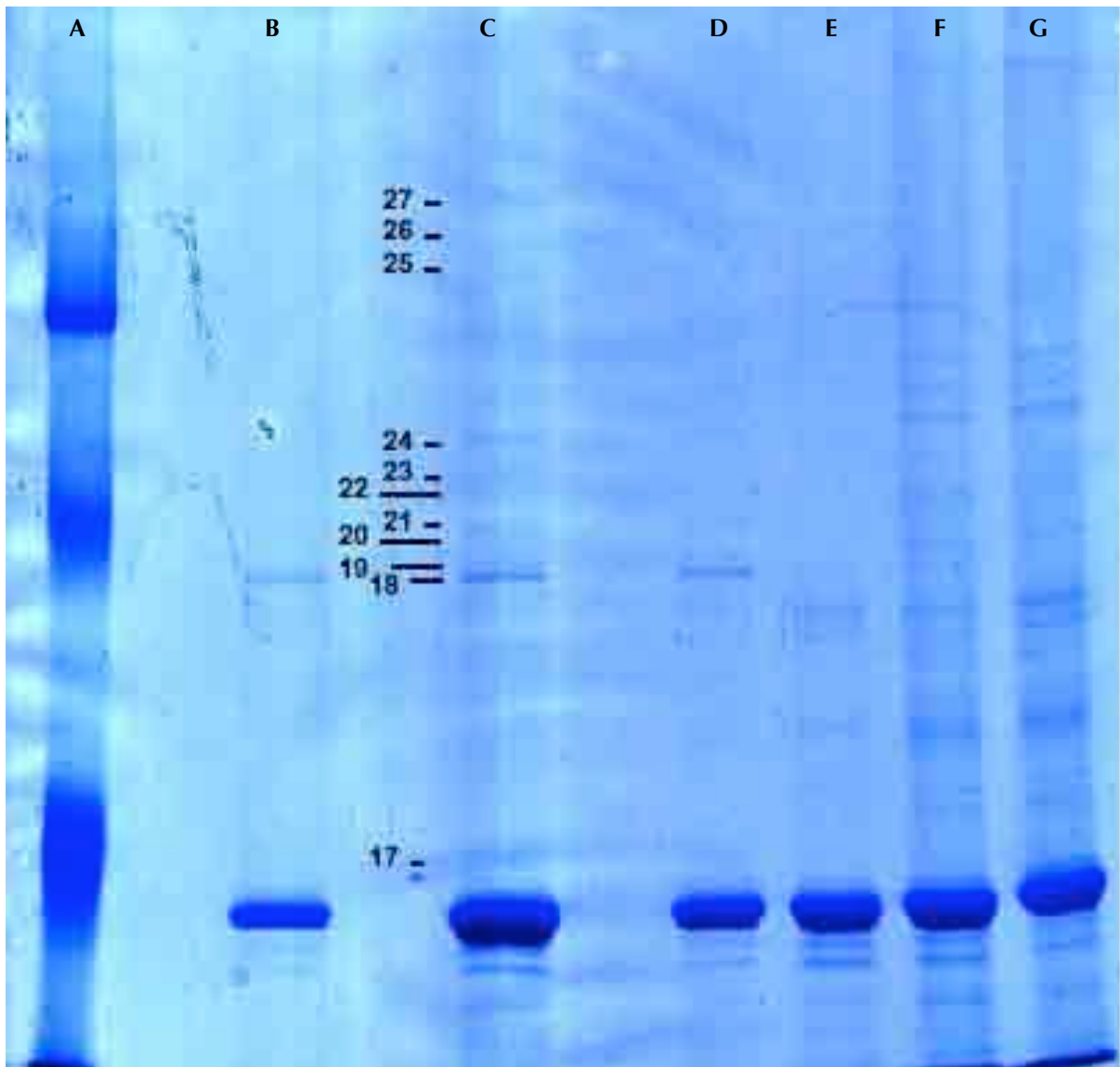
Para isso, após incubação dos extractos proteicos de células Huh7 com as proteínas GST imobilizadas, procedeu-se à digestão das proteínas de fusão GST com protease PreScission, que permite separar as três cópias em *tandem* do NLS do HDAg da proteína GST, permanecendo esta ligada à matriz de glutationa. Desta forma, foi possível isolar as proteínas celulares que se ligam especificamente ao NLS do HDAg das proteínas que apresentam afinidade somente para a proteína GST. Estas proteínas foram concentradas por precipitação com TCA e analisadas por electroforese em géis SDS-poliacrilamida. As proteínas celulares que, após incubação com a protease permanecem ligadas com a proteína GST, foram igualmente eluídas para análise por SDS-PAGE. Foram efectuados dois ensaios independentes de cromatografia de afinidade com as proteínas GST e GST-3X-HDAg-NLS, e as proteínas isoladas foram separadas em géis de poliacrilamida de gradiente 5-20% ou em gel de gradiente único a 7.5%.

Os resultados obtidos explicam a dificuldade encontrada em identificar proteínas celulares com propriedades de ligação específicas para o NLS do HDAg. Como se pode observar nas colunas E, F e G das figuras III.4.3.6 e III.4.3.7, um grande número de proteínas permanece associada com a proteína GST, imobilizada na matriz de glutationa, após digestão com a PreScission, evidenciando que a maior parte das proteínas isoladas dos lisados de células Huh7

interage preferencialmente com a proteína GST. As bandas presentes somente nas colunas correspondentes às proteínas que interagem especificamente com o NLS do HDAg foram removidas e as proteínas identificadas por espectrometria de massa. Das 27 bandas removidas foram identificadas apenas 5 proteínas, apresentadas na tabela III.4.3.



**Figura III.4.3.6.** Perfil electroforético das proteínas de células Huh7 isoladas por cromatografia de afinidade com o péptido formado por três cópias, dispostas em tandem, do NLS do HDAg. Tal como nos ensaios anteriores, as proteínas de fusão GST e GST-3X-NLS-HDAg foram incubadas com extractos de células Huh7, em condições de baixa e elevada afinidade. No final, procedeu-se à digestão da proteína de fusão GST-3X-NLS-HDAg com a protease PreScission e as proteínas celulares com afinidade preferencial para os aminoácidos do NLS do HDAg foram separadas por electroforese em gel de poliacrilamida 5-20% (colunas B e C). A coluna B corresponde às proteínas purificadas em tampão e baixa salinidade e a coluna C àquelas que foram isoladas em tampão de elevada salinidade. A coluna D corresponde às proteínas celulares de baixa afinidade para a proteína GST, removidas durante as lavagens, antes da eluição final. As colunas E a F correspondem às proteínas celulares com afinidade preferencial para a cauda GST, isto é, às proteínas que permaneceram associadas à proteína GST imobilizada nas partículas magnéticas após a digestão. Na coluna A são apresentados as massas moleculares de uma mistura comercial de proteínas com dimensões entre os 6.5 e 62 kDa. Os traços marcados de 1 a 16 indicam as posições das bandas excisadas do gel para posterior identificação das proteínas por espectrometria de massa.



**Figura III.4.3.7.** Perfil electroforético das proteínas de células de Huh7 isoladas por cromatografia de afinidade com o péptido formado por três cópias, dispostas em tandem, do NLS do HDAg. Tal como nos ensaios anteriores, as proteínas de fusão GST e GST-3X-NLS-HDAg parcialmente purificadas (colunas B e E, respectivamente) foram incubadas com extractos de células Huh7, em condições de baixa e elevada afinidade. No final, procedeu-se à digestão da proteína de fusão GST-3X-NLS-HDAg com a protease PreScission e as proteínas celulares com afinidade preferencial para os aminoácidos do NLS do HDAg foram separadas por electroforese em gel de poliacrilamida 7.5 % (colunas C e D). A coluna C corresponde às proteínas purificadas em tampão e baixa salinidade e a coluna D àquelas que foram isoladas em tampão de elevada salinidade. As colunas F e G correspondem às proteínas celulares de baixa afinidade com a proteína GST, removidas durante as lavagens, antes da eluição final. Na coluna A são apresentados as massas moleculares de uma mistura comercial de proteínas com dimensões entre os 34 e 86 kDa. Os traços marcados de 17 a 27 indicam as posições das bandas removidas para posterior identificação das proteínas.

Banda	Proteínas	Score	ID Swiss-Prot	Peso Molecular (kDa)
4	MAP2 - Proteína 2 associada a microtúbulos, isoforma 4R	78	Q16296	13.49
8	PI4K2A - Cinase tipo II (phosphatidylinositol 4-kinase)	64	Q9BTU6	54.02
9	DST - Distonina	66	Q03001	37.21
10	PLEC1 - Plectina-1	72	Q15149	530.17
12	ZNF394 - Proteína zinc finger 394	70	Q53G13	64.25

**Tabela III.4.3.** Proteínas identificadas por espectrometria de massa MALDI-TOF-TOF das bandas removidas dos géis de poliácridamida apresentados nas figuras III.4.3.6 e III.4.3.7.

## III.5 DISCUSSÃO

---

O trabalho descrito neste capítulo, teve como objectivo dar resposta às seguintes questões: quais os sinais peptídicos responsáveis pela importação nuclear do antigénio delta e a identidade das proteínas celulares que interagem especificamente com os sinais de localização nuclear identificados no HDAg. Dando resposta a estas perguntas procurou-se elucidar os processos envolvidos na importação nuclear do antigénio delta.

A maioria das proteínas com localização nuclear atravessam os complexos do poro nuclear por um processo que envolve a interacção entre receptores de transporte e sinais de localização nuclear específicos. Porém, tendo em conta as pequenas dimensões do HDAg, a detecção da proteína no núcleo poderia ser o resultado de difusão passiva através dos poros nucleares e retenção nuclear.

Os resultados obtidos neste estudo, sugerem que o HDAg atravessa os complexos do poro nuclear por um mecanismo de transporte activo que conta com a participação de receptores de transporte específicos.

Nas células eucariotas superiores, grande parte do transporte núcleo-citoplasmático está a cargo de uma família de proteínas, as carioferinas- $\beta$ , das quais, pelo menos 10 participam em vias de importação nuclear (Mossammaparast and Pemberton, 2004). A importação nuclear de proteínas mediada por membros da família das carioferinas- $\beta$  implica a existência de sinais de localização nuclear nos substratos a transportar. Os NLSs mais frequentes são pequenas sequências de aminoácidos, geralmente de carácter básico, indispensáveis para a importação nuclear. A predição da existência de um NLS funcional, com base na análise da sequência de aminoácidos de uma proteína, é difícil, uma vez que a maioria dos NLS identificados possuem sequências muito diversas. A função de um NLS putativo pode, porém, ser avaliada recorrendo a proteínas de fusão. Proteínas naturalmente citoplasmáticas adquirem a capacidade de migrar e acumular-se no interior do núcleo celular quando fundidas com um NLS funcional.

Dois estudos anteriores, pareceram mostrar que o HDAg possui duas sequências de aminoácidos capazes de promover a importação nuclear de proteínas com localização citoplasmática, o que sustenta a hipótese do transporte nuclear do HDAg ser dirigido por péptidos sinais específicos (Chang *et al.*, 1992; Xia *et al.*, 1992). O estudo da distribuição subcelular da  $\beta$ -galactosidase fundida com formas truncadas do HDAg, indicou a existência de dois sinais de localização nuclear na sequência de aminoácidos do antigénio delta, cuja actividade é independente (Chang *et al.*, 1992). A primeira sequência com propriedades de

sinal de localização nuclear do HDAg situa-se entre os aminoácidos 1 a 50 da extremidade N-terminal da proteína. Esta região do HDAg possui uma sequência de 10 aminoácidos que apresenta elevada homologia com o NLS NL1 do receptor de glucocorticóides, anteriormente identificado como funcional na importação nuclear da  $\beta$ -galactosidase (Picard and Yamamoto, 1987). O grau de semelhança entre as duas sequências de aminoácidos e a observação de que os primeiros 35 aminoácidos do HDAg não são capazes de promover a importação nuclear da  $\beta$ -galactosidase, levaram à conclusão de que os aminoácidos 35 a 44 constituem o primeiro NLS do HDAg (Chang *et al.*, 1992). O segundo sinal de localização nuclear identificado no HDAg situa-se entre os aminoácidos 67 a 88 (Chang *et al.*, 1992; Xia *et al.*, 1992). Este NLS possui características típicas dos NLS convencionais bipartidos, sendo constituído por dois domínios com aminoácidos básicos. De acordo com os resultados apresentados por Xia *et al.* (1992), são necessárias as duas sequências ricas em resíduos básicos para a importação nuclear da  $\alpha$ -globina. A proteína  $\alpha$ -globina fundida com os aminoácidos 67 a 77 do HDAg apresenta um fenótipo de distribuição misto, localizando-se tanto no núcleo como no citoplasma, enquanto que a  $\alpha$ -globina fundida com o segundo domínio do NLS bipartido localiza-se unicamente no citoplasma (Xia *et al.*, 1992). Utilizando a  $\beta$ -galactosidase como proteína repórter, Chang *et al.* (1992) mostraram que o segundo domínio do NLS bipartido do HDAg é funcional, sendo capaz de promover a importação nuclear da proteína repórter. Em resumo, os únicos estudos que procuraram elucidar o mecanismo de importação nuclear do HDAg, sugerem a existência de um NLS funcional no HDAg entre os aminoácidos 67 a 88, embora se verifiquem diferenças entre eles. Para além disso, Xia *et al.* (1992) mostraram que apesar da elevada homologia com um NLS funcional, a sequência de aminoácidos básicos compreendida entre os resíduos 35 a 44 do HDAg, não é suficiente para a importação nuclear da  $\alpha$ -globina. Ressalte-se que nenhum dos trabalhos averiguou a função dos NLS identificados na importação do antígeno delta nativo. Posteriormente, foi demonstrado que a presença do NLS bipartido do HDAg, aminoácidos 67 a 88, é determinante para a importação nuclear da proteína de fusão GST-HDAg, em células semi-permeabilizadas com digitonina (Chou *et al.*, 1998).

Com o objectivo de identificar as sequências aminoacídicas que dirigem o HDAg para o núcleo das células, numa primeira abordagem averiguou-se a capacidade do NLS bipartido do HDAg, identificado por Chang e Xia *et al.* (1992), mediar a importação nuclear da proteína cinase de piruvato de galinha fundida na extremidade N-terminal com o epítopo 9E10 da proteína *c-myc* (*c-myc*-PK).

Sistemas repórter baseados na expressão da proteína cinase de piruvato têm ampla aplicação na identificação de NLSs. A análise da distribuição intracelular da proteína cinase do piruvato

fundida com os aminoácidos da extremidade C-terminal da nucleoplasmina levou à identificação do protótipo dos NLS convencionais bipartidos, constituídos por duas sequências em que predominam aminoácidos com carga positiva, separados por 9 a 12 resíduos não básicos (Dingwall *et al.*, 1988). Recentemente, a proteína repórter cinase do piruvato foi utilizada na caracterização de uma nova classe de sinais de localização nuclear, constituídos por três elementos ricos em resíduos básicos (Hsu and Hung, 2007).

A proteína de fusão *c-myc*-PK apresenta uma distribuição intracelular exclusivamente citoplasmática, podendo localizar-se no núcleo quando fundida com um NLS funcional (Michael *et al.*, 1997; Enninga *et al.*, 2003). O vector utilizado para a expressão heteróloga da proteína repórter *c-myc*-PK em células humanas foi o pcDNA1-*c-myc*-PK (Michael *et al.*, 1997). Este vector de expressão eucariota, possui locais de restrição, para as enzimas *EcoRI* e *XhoI*, a jusante da sequência de cDNA que codifica para a cinase de piruvato de galinha, permitindo a inserção orientada e na mesma grelha de leitura da proteína repórter, das sequências de cDNA que codificam para aminoácidos do HDAG. A distribuição subcelular das diferentes proteínas de fusão construídas, foi analisada por imunofluorescência indirecta e microscopia confocal. Como controlos utilizaram-se os vectores pcDNA1-*c-myc*-PK e pcDNA1-*c-myc*-PK-NLS<sub>hnRNP</sub>K, que codificam para a proteínas de fusão *c-myc*-PK, com localização citoplasmática e proteína *c-myc*-PK fundida com os aminoácidos 21 a 37 da proteína hnRNP K humana, respectivamente. Os aminoácidos 21 a 37 da proteína hnRNP K humana formam um NLS clássico do tipo bipartido, sendo necessários e suficientes na promoção da importação e localização exclusivamente nuclear da proteína *c-myc*-PK (Michael *et al.*, 1997).

Contrariando as observações feitas por Chang e Xia (1992), verificou-se que o NLS bipartido do HDAG, situado entre os aminoácidos 67 a 88, não é suficiente para a importação nuclear da proteína *c-myc*-PK. Apesar de serem insuficientes, a análise da localização subcelular das proteínas de fusão *c-myc*-PK-58-88HDAG e *c-myc*-PK-HDAG $\Delta$ 68-91 indica que os aminoácidos 67 a 88 do HDAG são necessários para a importação nuclear da proteína repórter. A proteína *c-myc*-PK-58-a-88HDAG, resultante da fusão da cinase do piruvato com os aminoácidos 58 a 88 do HDAG, localiza-se no núcleo das células, tal como a proteína *c-myc*-PK fundida com o NLS bipartido da extremidade N-terminal da proteína hnRNP K (controlo positivo). Por outro lado, a proteína *c-myc*-PK fundida com os aminoácidos 13 a 195 do HDAG, e com uma deleção entre os aminoácidos 68 e 91, apresenta uma distribuição citoplasmática. Em conjunto, estes resultados mostram que o HDAG possui um NLS funcional compreendido entre os aminoácidos

58 a 88 e que alguns aminoácidos da sequência 68 a 91 são essenciais para a importação nuclear.

Uma análise detalhada dos aminoácidos do HDAg necessários para promover a importação nuclear da proteína *c-myc*-PK mostrou que a sequência compreendida entre os aminoácidos 66 a 88 do HDAg é necessária e suficiente para a importação nuclear. Esta sequência distingue-se da anteriormente identificada por Xia *et al.* (1992) por conter um resíduo de ácido glutâmico adicional.

Utilizando técnicas de mutágenese dirigida, constatou-se, contrariando as evidências anteriores, que os aminoácidos básicos do segundo domínio do NLS bipartido são dispensáveis para a importação nuclear da proteína *c-myc*-PK. A observação de que os aminoácidos <sup>86</sup>RKR<sup>88</sup> do HDAg não são necessários para a importação nuclear sugere que o NLS do HDAg é do tipo monopartido. Esta hipótese foi confirmada através da análise da localização intracelular da proteína *c-myc*-PK fundida com os aminoácidos 66 a 75 do HDAg. Esta proteína de fusão apresenta uma distribuição nuclear idêntica à observada para a proteína *c-myc*-PK fundida com os aminoácidos 66 a 88 do HDAg, evidenciando que os aminoácidos 66 a 75 constituem a sequência mínima do HDAg capaz de direccionar a redistribuição da proteína *c-myc*-PK do citoplasma para o núcleo de células de hepatoma humano.

A análise da distribuição intracelular da proteína *c-myc*-PK fundida com os aminoácidos 67 a 88 ou 66 a 74 do HDAg evidenciou o papel dos resíduos de ácido glutâmico e arginina das posições 66 e 75, respectivamente, na importação nuclear. Estas proteínas de fusão localizam-se unicamente no citoplasma das células, indicando que a remoção dos aminoácidos 66 e 75 resulta na perda de função do NLS do HDAg.

A análise global dos resultados obtidos indica que o NLS do HDAg, com excepção do aminoácido 66, corresponde ao primeiro domínio do NLS bipartido caracterizado por Xia *et al.* (1992). Contudo, com base na análise da distribuição intracelular da proteína  $\alpha$ -globina, o autor reportou que o primeiro domínio do NLS bipartido é menos eficiente na importação nuclear do que a sequência completa constituída pelos aminoácidos 67 a 88 do HDAg. A proteína  $\alpha$ -globina fundida com os aminoácidos 67 a 77 do HDAg é detectada em ambos os compartimentos celulares (Xia *et al.*, 1992). Curiosamente, observou-se um padrão de distribuição intracelular idêntico, com distribuição nuclear e citoplasmática, para a proteína *c-myc*-PK fundida com os aminoácidos 66 a 75 do HDAg, contendo uma mutação pontual no aminoácido 66. A substituição do aminoácido ácido glutâmico 66 do HDAg por um aminoácido neutro, um resíduo de alanina, torna a importação nuclear da proteína *c-myc*-PK menos eficiente.

A semelhança entre estes resultados, sugere que o padrão de distribuição intracelular misto, observado por Xia *et al.* (1992), para a proteína de fusão  $\alpha$ -globina-67-77HDAG poderá ser o resultado da inserção inadvertida de aminoácidos neutros a montante do aminoácido da posição 67 do HDAG, codificados pelas sequências dos *primers* utilizados nas reacções de PCR para amplificar a sequência de cDNA do HDAG usada na construção da proteína repórter. Assim a localização tanto nuclear como citoplasmática da proteína  $\alpha$ -globina-67-77HDAG, em vez de reflectir a dependência do segundo domínio do NLS bipartido na importação nuclear, como foi anteriormente interpretado, resultará da substituição do resíduo de ácido glutâmico da posição 66 do HDAG por aminoácidos neutros. De facto, uma análise mais atenta da sequência nucleotídica do fragmento de DNA utilizado por Xia *et al.* (1992) para a expressão da proteína  $\alpha$ -globina fundida com os aminoácidos 67 a 77 do HDAG veio reforçar esta hipótese. O fragmento de DNA utilizado (Tabela III.5.1), codifica para dois aminoácidos neutros, uma metionina seguida de uma serina, que antecedem a sequência de aminoácidos 67 a 77 do HDAG. Consequentemente, os resultados de Xia *et al.* (1992) confirmam a dependência do NLS do HDAG da presença de um resíduo de ácido glutâmico na posição 66.

SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS QUE CODIFICAM PARA O NLS DO HDAG, UTILIZADAS NA CONSTRUÇÃO DE PROTEÍNAS REPÓRTER NESTE TRABALHO E POR Xia <i>et al.</i> , 1992			LOCALIZAÇÃO CELULAR
NLS do HDAG completo	cDNA	GAG GGG GCT CCC CCC GCG AAG AGG GCC CGA	Núcleo
	Aminoácidos	E <sup>66</sup> G A P P A K R A R <sup>75</sup>	
NLS do HDAG E <sup>66</sup> →A	cDNA	GCA GGG GCT CCC CCC GCG AAG AGG GCC CGA	Núcleo e citoplasma
	Aminoácidos	A <sup>66</sup> G A P P A K R A R <sup>75</sup>	
Xia <i>et al.</i> , 1992	cDNA	ATG AGC GGG GCA CCC CCG GCG AAG AAG CTC CGG ATG GAC	Núcleo e citoplasma
	Aminoácidos	M S G <sup>67</sup> A P P A K K L R M D <sup>77</sup>	

**Tabela III.5.1.** Sequências nucleotídicas do cDNA do HDAG utilizadas neste trabalho e por Xia *et al.* (1992) na construção de vectores repórter que codificam para as seguintes proteínas de fusão: *c-myc*-PK fundida com os aminoácidos 66 a 75 do HDAG, *c-myc*-PK fundida com os aminoácidos 66 a 75 do HDAG em que o resíduo de ácido glutâmico da posição 66 foi substituído por um resíduo de alanina e proteína  $\alpha$ -globina fundida com os aminoácidos 67 a 77 do HDAG. São igualmente apresentados os aminoácidos codificados pelas sequências de DNA indicadas e a localização celular das proteínas de fusão construídas. A vermelho estão assinalados os dois aminoácidos neutros que antecedem os aminoácidos 67 a 77 do HDAG na proteína de fusão  $\alpha$ -globina-67-77HDAG estudada por Xia *et al.*, 1992.

Neste estudo, investigou-se igualmente a capacidade da sequência semelhante a um NLS, localizada entre os aminoácidos 35 a 44 do HDAg (<sup>35</sup>RKTKKKLKKI<sup>44</sup>), mediar a importação nuclear da proteína *c-myc*-PK.

Os únicos trabalhos que procuraram identificar o mecanismo de importação nuclear do antígeno delta, obtiveram resultados discordantes, no que diz respeito, à actividade desta sequência na importação nuclear (Chang *et al.*, 1992; Xia *et al.*, 1992). Se por um lado, Chang *et al.* (1992) obtiveram evidências de que os aminoácidos 35 a 44 do HDAg funcionam como NLS, por outro lado, Xia *et al.* (1992) mostraram que a sequência <sup>35</sup>RKTKKKLKKI<sup>44</sup> é incapaz de promover a importação da  $\alpha$ -globina.

Neste trabalho, em concordância com os resultados apresentados por Xia *et al.* (1992), obtiveram-se evidências claras de que os aminoácidos 35 a 44 do HDAg não apresentam propriedades de sinal de localização nuclear.

Em primeiro lugar, constatou-se que a remoção dos 58 aminoácidos da extremidade N-terminal do HDAg não interfere com o mecanismo de importação nuclear da proteína repórter *c-myc*-PK, uma vez que as proteínas de fusão *c-myc*-PK-58-116 e *c-myc*-PK-58-88 apresentam uma distribuição exclusivamente nuclear. Se a localização nuclear destas proteínas mostra que os 57 aminoácidos N-terminais do HDAg são dispensáveis para a importação nuclear, a localização exclusivamente citoplasmática da proteína de fusão *c-myc*-PK-13-55 indica ausência de um NLS funcional entre os aminoácidos 13 a 55 do HDAg. Estes resultados em conjunto com a observação de que a proteína *c-myc*-PK fundida com o HDAg sem os aminoácidos 68 a 91, encontra-se unicamente distribuída no citoplasma das células, indicam claramente que, a sequência compreendida entre os aminoácidos 35 a 44, apesar de ser rica em aminoácidos básicos, não possui actividade de NLS.

Tal como foi anteriormente mencionado, a sequência compreendida entre os aminoácidos 35 a 44 do HDAg apresenta elevada homologia com o domínio principal do NLS NL1 dos receptores dos glucocorticóides (Picard and Yamamoto, 1987). Porém, as duas sequências estão contidas em dois domínios estruturais distintos, o que poderá contribuir para as diferenças encontradas.

O NLS NL1 dos receptores dos glucocorticóides, para além do domínio principal, RKTKKKIK, possui dois subelementos mais pequenos de carácter básico que parecem ser importantes para a importação nuclear. Enquanto que o domínio maior do NLS NL1 situa-se numa região adjacente ao domínio de ligação ao DNA, os subelementos menores sobrepõem-se com a  $\alpha$ -hélice terminal do segundo motivo *zinc finger* do domínio de ligação ao DNA dos receptores dos glucocorticóides (Tang *et al.*, 1997b). Por outro lado, os aminoácidos 35 a 44 do HDAg

sobrepõem-se com uma sequência semelhante a fechos de leucina do domínio de dimerização (coiled-coil) do antígeno delta. A análise da estrutura cristalizada do domínio de dimerização do HDAg mostrou que os aminoácidos da sequência 16 a 48 de cada monômero formam duas  $\alpha$ -hélices, que estabelecem contacto através dos resíduos hidrofóbicos de cada subunidade (Zuccola *et al.*, 1998).

As diferenças entre os nossos resultados e os obtidos anteriormente por Chang e Xia *et al.* (1992), podem ainda ser atribuídas à estrutura e conformação das proteínas repórter utilizadas. Com efeito, existem evidências de que a capacidade de um NLS promover a importação nuclear pode depender da proteína repórter com que o NLS se encontra fundido.

A análise da distribuição intracelular da proteína invertase fundida com os aminoácidos 1 a 29 ou 1 a 74 da proteína de ligação ao DNA GAL4, mostrou que, ambas as sequências, são capazes de promover a importação nuclear da proteína repórter (Nelson and Silver, 1989). Destes resultados, os autores concluíram que os 29 aminoácidos da extremidade N-terminal da proteína GAL4 contêm um NLS funcional. Curiosamente, a sequência mínima capaz de dirigir a invertase para o núcleo, mostrou-se defectiva na importação nuclear da  $\beta$ -galactosidase, sendo esta proteína detectada no núcleo, somente após fusão com os 74 aminoácidos da extremidade N-terminal da proteína GAL4 (Nelson and Silver, 1989).

Um outro factor determinante da capacidade de uma sequência de aminoácidos direccionar uma proteína citoplasmática para o núcleo é a estrutura assumida pelos aminoácidos vizinhos do local de fusão entre as proteínas.

A proteína ribossomal L3 de *S. cerevisiae* possui um NLS funcional, localizado na extremidade N-terminal da proteína (Moreland *et al.*, 1985). De acordo com o esperado, a  $\beta$ -galactosidase fundida com a extremidade N-terminal da proteína ribossomal L3 é detectada exclusivamente no núcleo das células. Porém, verificou-se que a proteína resultante da fusão da  $\beta$ -galactosidase com a sequência quase completa da L3 localiza-se no citoplasma. Por sua vez, a adição de uma sequência de oito aminoácidos no local de ligação das duas proteínas permitiu a importação nuclear da proteína de fusão (Moreland *et al.*, 1985).

Levando em consideração que os estudos existentes apresentam resultados contraditórios quanto ao número de NLS presentes no HDAg e sua composição aminoacídica, podendo estas diferenças ser atribuídas às proteínas repórter utilizadas, analisou-se o papel do NLS identificado na importação nuclear do antígeno delta nativo ou fundido com a proteína EGFP. Os resultados obtidos com HDAg nativo ou fundido com a proteína EGFP confirmaram as observações iniciais, de que a importação nuclear do HDAg depende do NLS situado entre os aminoácidos 66 a 75.

De acordo com o esperado, tanto o HDAg como a proteína de fusão EGFP-HDAg são detectadas no núcleo das células. Na ausência da sequência de aminoácidos <sup>66</sup>EGAPPAKRAR<sup>75</sup>, as proteínas localizam-se somente no citoplasma das células. Estas observações mostram claramente que a importação nuclear do antígeno delta é dirigida por sinais peptídicos específicos.

O facto da deleção dos aminoácidos 66 a 75 resultar num padrão de distribuição citoplasmático do HDAg nativo e da proteína de fusão EGFP-HDAg confirma a existência de um único NLS na sequência de aminoácidos da proteína.

Tal como o NLS da proteína oncogénica *c-myc*, o NLS responsável pela importação nuclear do HDAg possui apenas três aminoácidos básicos na sua sequência (Dang and Lee, 1988). A análise da distribuição intracelular da proteína cinase do piruvato mostrou que o primeiro e o último aminoácido da sequência de 66 a 75 do HDAg, um resíduo de ácido glutâmico e um resíduo de arginina, respectivamente, são essenciais para a função do NLS na importação nuclear, e que a remoção destes aminoácidos resulta na perda de função do NLS do HDAg.

A substituição do resíduo de ácido glutâmico 66 do HDAg por uma alanina, um aminoácido neutro, causa uma redução da eficiência do NLS na importação nuclear da proteína *c-myc*-PK. Obtiveram-se resultados semelhantes quando se analisou a distribuição intracelular do HDAg do tipo selvagem com uma mutação no aminoácido 66, comprovando-se que o resíduo de ácido glutâmico desempenha um papel importante na importação nuclear do HDAg. Estes resultados permitiram verificar que a localização observada para a proteína de fusão *c-myc*-PK-E66A-75 se deve à dependência do NLS do HDAg da presença de um resíduo de ácido glutâmico, e não a configurações estruturais da proteína.

Em suma, neste trabalho demonstrou-se que o HDAg possui um único NLS funcional, localizado entre os aminoácidos 66 a 75. Em contraste com as observações anteriores, o NLS do HDAg é do tipo monopartido, constituído por uma sequência contínua de 10 aminoácidos <sup>66</sup>EGAPPAKRAR<sup>75</sup>.

Para além de se ter comprovado que o transporte nuclear do antígeno delta é mediado por um NLS diferente dos anteriormente propostos, demonstrou-se que o NLS do HDAg não é específico para células de fígado humano.

Esta conclusão é fundamentada pela observação de que a proteína EGFP fundida com o HDAg completo ou sem os aminoácidos 66 a 75 do antígeno delta, apresenta uma distribuição idêntica em células de hepatoma humano Huh7 e em fibroblastos de murganho NIH 3T3.

Apesar do HDV apresentar tropismo pelo fígado, a falta de especificidade do NLS do HDAg em relação ao tipo de células não é surpreendente, uma vez que os mecanismos que governam o

transporte núcleo-citoplasmático nos eucariotas encontram-se conservados entre espécies evolutivamente afastadas (Lim *et al.*, 2008).

Estes resultados encontram suporte em outros estudos que analisaram a distribuição intracelular do antigénio delta. O HDAg quer expresso isoladamente, quer expresso sob a forma de proteína de fusão, apresenta localização nuclear em células de hepatoma humano, tais como células Alexander (linha de hepatoma humano que expressa constitutivamente o HBsAg; Chang *et al.*, 1992) em células Huh7 (Lazinski e Taylor, 1993; Cunha *et al.*, 1998), em células HeLa (Chou *et al.*, 1998) e também, em células de rim de macaco (COS-7; Xia *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1992).

O conjunto destes resultados reforça a visão de que o hepatotropismo do HDV é justificado por eventos que antecedem a entrada do vírus nas células.

Para além de se ter identificado e caracterizado o sinal de localização nuclear do HDAg, passo importante na identificação das vias de importação nuclear de proteínas, foram feitos esforços no sentido de identificar os factores celulares envolvidos neste processo.

A abordagem experimental adoptada para identificar possíveis factores celulares com função no mecanismo de importação nuclear do HDAg consistiu, numa primeira etapa, na selecção de proteínas celulares com afinidade para o NLS do antigénio delta.

Com este intuito, foram efectuados ensaios de cromatografia de afinidade com as proteínas alvo, o HDAg ou um péptido formado por três cópias em tandem do NLS do HDAg fundidos com a proteína GST.

A capacidade do péptido formado por três cópias do NLS do HDAg ser reconhecido pelas proteínas celulares responsáveis pela importação nuclear foi testada, recorrendo à análise da distribuição intracelular da proteína de fusão *c-myc*-PK. A detecção da proteína *c-myc*-PK fundida com três cópias dispostas em tandem do NLS do HDAg, exclusivamente no núcleo das células demonstra que a multiplicação da sequência de aminoácidos que constitui o NLS do HDAg não compromete o reconhecimento do NLS do HDAg por parte dos receptores de transporte.

As proteínas celulares com afinidade para o HDAg ou o NLS do HDAg, isoladas por cromatografia de afinidade, foram separadas por electroforese em géis de SDS-poliacrilamida e os géis corados com uma solução de *Brilliant blue* G250.

A análise do padrão electroforético das proteínas celulares isoladas por cromatografia de afinidade com as proteínas de fusão GST, mostrou que a maioria tem afinidade preferencial para a sequência de aminoácidos da proteína GST.

Com efeito, nos ensaios de cromatografia de afinidade foram detectadas apenas duas bandas, na coluna correspondente às proteínas celulares com afinidade para o NLS do HDAg fundido com a proteína GST, que não se encontram nos complexos proteicos isolados com a proteína GST. Estas bandas, com tamanhos entre os 47.5 e os 62 kDa, representam provavelmente proteínas que interagem especificamente com o NLS do HDAg, porém, dado as suas dimensões serem inferiores a 100 kDa, a probabilidade destas proteínas pertencerem à família das carioferinas- $\beta$  será reduzida.

O único estudo que procurou identificar os receptores de transporte intervenientes no mecanismo de importação nuclear do HDAg mostrou que a imp- $\alpha$ 2 liga-se especificamente ao HDAg, sendo esta interacção dependente da presença da sequência de aminoácidos de 67 a 88 do HDAg (Chou *et al.*, 1998). Se estas evidências sugerem que o HDAg utiliza a via de importação clássica, em que a imp- $\alpha$ 2 constitui a subunidade do receptor de transporte que reconhece especificamente o NLS do HDAg e a imp- $\beta$ , a proteína que faz a ligação do complexo de importação com o NPC, por outro lado, esta hipótese nunca chegou a ser confirmada *in vivo*.

Curiosamente, as duas bandas identificadas entre os complexos proteicos isolados com a proteína GST fundida com três cópias do NLS do HDAg, possuem dimensões que são compatíveis com a massa molecular da imp- $\alpha$ 2, cerca de 58 kDa.

Apesar das dificuldades encontradas para detectar diferenças, a olho nu, nos perfis electroforéticos das proteínas celulares isoladas por cromatografia de afinidade com a proteína GST e GST fundida com o NLS do HDAg, removeram-se 10 bandas, entre os 47 e os 86 kDa de cada coluna para posterior identificação das proteínas.

As proteínas removidas dos géis foram incubadas com tripsina e os péptidos resultantes da digestão foram analisados por espectrometria de massa.

Das 12 bandas retiradas dos géis de SDS-poliacrilamida, foram identificadas apenas três proteínas que, numa primeira análise, não apresentam particular interesse, uma vez que interagem tanto com o NLS do HDAg em fusão com a proteína GST como com a proteína GST sozinha. Para além disso, não foi possível identificar as proteínas celulares, que de acordo com o padrão electroforético, parecem interagir especificamente com o NLS do HDAg.

As proteínas identificadas foram a vimentina, subunidade proteica dos filamentos intermédios, a cinase do piruvato PKM1/2 e a proteína de choque térmico HSPA8.

A cinase do piruvato PKM1/M2 foi identificada somente entre as proteínas celulares co-purificadas com a proteína GST fundida com o NLS do HDAg. Não foi possível confirmar a presença da proteína PKM1/M2 entre as proteínas celulares co-purificadas com a proteína GST,

por contaminação da amostra com queratina. Consequentemente, os resultados obtidos não são suficientes para concluir que a proteína PKM1/M2 possui propriedades de ligação específicas com o NLS do HDAg.

A isoforma 2 da proteína PKM1/2, apesar de ser uma proteína citoplasmática, é importada para o núcleo das células em resposta a diferentes agentes apoptóticos (Steták *et al.*, 2007). A localização nuclear da proteína PKM2 está relacionada com a morte celular por apoptose, desconhecendo-se contudo, a participação desta proteína no mecanismo de importação nuclear.

A presença da proteína HSP8A nas fracções proteicas isoladas com a proteína GST fundida com o NLS do HDAg, bem como com a proteína GST isolada, torna pouco provável que esta proteína se ligue especificamente à sequência de aminoácidos do NLS do HDAg. Apesar disso, é importante salientar o facto, da proteína HSPA8, também conhecida por Hsc70, estar implicada na importação nuclear. A proteína de choque térmico Hsc70, para além de participar no mecanismo de importação nuclear tem um papel importante no estabelecimento da conformação tridimensional das proteínas, funcionando como chaperona molecular, através da ligação a regiões hidrofóbicas expostas nas cadeias polipeptídicas nascentes ou em proteínas desnaturadas.

Tal como a imp- $\alpha$ , demonstrou-se que a proteína Hsc70 liga-se especificamente às sequências de aminoácidos dos NLSs da nucleoplasmina e do antigénio T do vírus SV40 (Imamoto *et al.*, 1992; Okuno *et al.*, 1993).

A importação nuclear de proteínas como a nucleoplasmina, BSA conjugada com o NLS do antigénio T do vírus SV40 ou a histona H1, é fortemente inibida após a microinjecção de anticorpos anti-Hsc70 no citoplasma das células (Imamoto *et al.*, 1992). Esta inibição é específica para proteínas cuja importação nuclear é dependente de sinais e receptores de transporte específicos, dado que a difusão passiva através dos NPC não é impedida pela presença de anticorpos anti-Hsc70 (Imamoto *et al.*, 1992). De acordo com a hipótese da proteína Hsc70 estar envolvida no transporte nuclear, demonstrou-se que a inibição na importação nuclear causada pelos anticorpos anti-Hsc70, pode ser revertida pela adição da proteína Hsc70 recombinante (Shi and Thomas, 1992; Okuno *et al.*, 1993). Para além disso, verificou-se que a sobre-expressão da proteína Hsc70 é capaz de complementar a importação nuclear de uma forma do antigénio T do vírus SV40 com uma mutação no NLS (Jeoung *et al.*, 1991).

No entanto, nem todas as vias de importação nuclear de proteínas são afectadas pela depleção intracelular da proteína Hsc70. Yang e DeFranco (1994) mostraram que a importação *in vitro*

dos receptores dos glucocorticóides, ao contrário do antígeno T grande do vírus SV40, não sofre qualquer inibição após depleção da proteína Hsc70 do citosol.

Mais tarde, foi demonstrado em *S. cerevisiae*, que o aumento da expressão da proteína Hsc70 é capaz de reverter os defeitos na importação nuclear causados por uma mutação condicional no genes que codificam para a imp- $\alpha$  e para a nucleoporina Nup82-3 (Shulga *et al.*, 1996). Em conjunto, estes resultados indicam que a proteína Hsc70 participa na importação nuclear de proteínas, todavia, o papel exacto desta proteína no transporte nuclear continua por elucidar. O facto da proteína Hsc70, na ausência de outros factores celulares ser insuficiente para a importação nuclear da nucleoplasmina, *in vitro*, torna pouco provável que esta proteína de choque térmico funcione como receptor de transporte (Shi and Thomas, 1992).

Posteriormente, Florin *et al.* (2004) demonstrou que a importação nuclear da proteína menor da cápside dos vírus do papiloma humano (HPV) requer a interacção com a proteína Hsc70 no citoplasma das células. O facto das duas proteínas se encontrarem co-localizadas juntamente com os corpos PML no núcleo das células sugere que proteína Hsc70 é importada em conjunto com a proteína menor da cápside do HPV do citoplasma para o núcleo celular. A proteína menor da cápside do HPV possui dois NLS funcionais na sua sequência, cuja actividade *in vitro* é independente da presença da proteína Hsc70 (Darshan *et al.*, 2004). Contudo, *in vivo* a interacção da proteína Hsc70 com uma sequência a jusante do NLS localizado na extremidade C-terminal da proteína menor da cápside do HPV é crucial para o transporte desta proteína para o núcleo (Florin *et al.*, 2004). A remoção desta sequência torna a importação nuclear da proteína menor da cápside do HPV independente da proteína Hsc70, sugerindo que o papel da proteína Hsc70 na importação nuclear da proteína menor da cápside do HPV do tipo selvagem consiste na promoção da dissociação de um factor de retenção citoplasmático. A proteína Hsc70 tem também participação, na importação nuclear do genoma dos adenovírus (Saphire *et al.*, 2000).

Por último, é importante referir que a chaperona Hsc70 foi identificada como uma das proteínas celulares cuja expressão se encontra alterada em células estavelmente transfectadas com o cDNA do HDV. Estes resultados sugerem que a proteína Hsc70 pode desempenhar um papel na replicação do HDV (Mota, 2009, tese de doutoramento, IHMT, UNL).

Perante estas evidências, que apontam para o envolvimento da proteína Hsc70 na importação nuclear de proteínas, seria interessante no futuro analisar a capacidade da proteína Hsc70 interagir *in vitro* directamente com o NLS do HDAg, bem como com o antígeno delta nativo.

Atendendo ao facto do método utilizado para a selecção de proteínas celulares com afinidade para o NLS do HDAg ter conduzido a resultados pouco satisfatórios, procurou-se separar as

proteínas celulares com propriedades de ligação específicas para o NLS do HDAg das proteínas que interagem com a sequência de aminoácidos da proteína GST. Para isso, após incubação dos extractos celulares com as proteínas de fusão GST imobilizadas, procedeu-se à proteólise das proteínas de fusão GST com uma protease específica. Esta enzima, ao clivar entre a sequência de aminoácidos da proteína GST e o NLS do HDAg, permite isolar as proteínas celulares que apresentam afinidade preferencial para os aminoácidos do NLS do antigénio delta, permanecendo as proteínas ligadas à GST retidas na coluna.

A análise do padrão electroforético das proteínas celulares co-purificadas com o péptido formado por três cópias do NLS do HDAg mostrou que, efectivamente, a maioria das proteínas celulares anteriormente isoladas interage preferencialmente com a proteína GST. Apesar, deste método permitir uma melhor distinção das proteínas celulares com afinidade para o NLS do HDAg, o número de proteínas identificadas foi reduzido. Das 27 bandas removidas, com massas moleculares diversas, foram identificadas apenas cinco proteínas, sendo que nenhuma delas parece estar directamente envolvida em mecanismos de importação nuclear.

A proteína PI4K2A está envolvida em vários processos biológicos, mas não existem evidências do seu envolvimento na importação nuclear. A proteína ZNF394 é uma proteína com localização nuclear e, de acordo com os dados existentes, parece estar envolvida na regulação da transcrição.

As restantes proteínas identificadas correspondem a proteínas de ligação a elementos do citoesqueleto, a isoforma 4R da proteína 2 associada aos microtúbulos (MAP2), a distonina e a plectina. A isoforma 4R da proteína MAP2 está envolvida na estabilização dos microtúbulos e é predominantemente expressa nos neurónios (Dehmelt and Halpain, 2004). Ainda que de modo indirecto, a identificação de uma proteína de ligação aos microtúbulos, como um possível factor celular que interage com o NLS do HDAg, pode indicar o envolvimento dos microtúbulos na importação nuclear do antigénio delta.

Existem várias evidências que apontam para o envolvimento do citoesqueleto no mecanismo de importação nuclear de proteínas e vírus.

Nas plantas, as imagens de imunocitoquímica mostraram que a imp- $\alpha$  apresenta co-localização tanto com os microtúbulos, como com os microfilamentos (Smith and Raikhel, 1999). Para além disso, foi demonstrado que a imp- $\alpha$  é capaz de se associar aos microtúbulos *in vitro*, verificando-se que esta associação é dependente da presença de NLS funcionais (Smith and Raikhel, 1998). Esta observação sugere que os microtúbulos, para além de poderem funcionar como locais de retenção das importinas no citoplasma, têm como função facilitar o transporte dos complexos de importação do citoplasma até ao NPC.

Nos mamíferos, os microtúbulos assumem um papel importante no transporte axonal retrógrado de proteínas nos neurónios. O transporte axonal retrógrado da subunidade p65 do factor de transcrição NF- $\kappa$ B ao longo dos microtúbulos é mediado pelo complexo proteico dineína/dinactina. A inibição do transporte mediado por este complexo, quer pela indução da dissociação da dinactina quer pela despolimerização dos microtúbulos, impede a acumulação nuclear da proteína p65 (Mikenberg *et al.*, 2007). Curiosamente, verificou-se que a interacção *in vitro* entre a proteína p65 do factor de transcrição NF- $\kappa$ B e o complexo proteico dineína/dinactina, é mediado pelo NLS da proteína p65. Apenas as subunidades p65 do factor de transcrição NF- $\kappa$ B com um NLS funcional são capazes de estabelecer interacção com o complexo proteico dineína/dinactina (Mikenberg *et al.*, 2007). Estes resultados indicam que o movimento unidireccional das proteínas ao longo dos axónios em direcção aos núcleos é dependente dos microtúbulos e de sinais de localização nuclear funcionais. Os dados existentes sugerem que a ligação do complexo proteico dineína/dinactina aos NLS das proteínas é mediada pela imp- $\alpha$ , indicando que o transporte citoplasmático tem continuidade com o transporte nuclear (Hanz *et al.*, 2003).

Para além do papel na integração do transporte retrógrado axonal com o transporte nuclear nos neurónios, os microtúbulos e a dineína estão implicados na importação nuclear das proteínas p53, PTHrP e Rb, em vários tipos de células (Lam *et al.*, 2002; Roth *et al.*, 2007; Moseley *et al.*, 2007). Enquanto os motivos proteicos responsáveis pela interacção das proteínas p53, PTHrP, Rb e a dineína estão pouco caracterizados, a interacção entre a fosfoproteína do vírus da raiva e dineína ocorre através de uma pequena sequência de aminoácidos localizada a montante do NLS da proteína viral (Moseley *et al.*, 2007). Foi demonstrado que o domínio de ligação à dineína sinergiza com a actividade do NLS da própria proteína ou de proteínas heterólogas, na importação nuclear (Moseley *et al.*, 2007). Estes resultados, sugerem que a continuidade do transporte ao longo dos microtúbulos mediado pela dineína e o transporte nuclear não é exclusivo das células cerebrais e que a interacção de proteínas contendo NLS com a dineína pode ocorrer de um modo independente da imp- $\alpha$ .

Como já foi referido, a importação nuclear do antigénio delta é um passo importante no ciclo de replicação do HDV. Através da interacção de factores celulares especializados na importação nuclear com o NLS do HDAg, os antigénios delta recém-sintetizados no citoplasma, são transportados para o núcleo das células, compartimento celular onde ocorre a replicação do genoma do HDV. Para além de garantir a importação nuclear, o NLS do HDAg é ainda, responsável pela entrada das RNPs do HDV no núcleo das células. A eventual interacção entre o HDAg e os microtúbulos poderá ser importante na importação nuclear das

RNPs do HDV, logo após a infecção, como também durante o ciclo de replicação, uma vez que as RNPs do HDV atravessam continuamente os NPCs (Tavanez *et al.*, 2002).

Curiosamente, as proteínas da família MAP2/Tau, à qual pertence a isoforma 4 da proteína MAP2, identificada neste trabalho, para além de contribuírem para a estabilidade dos microtúbulos, parecem estar envolvidas na regulação no transporte intracelular (Dehmelt and Halpain, 2004). Mais especificamente, estas proteínas podem inibir o transporte mediado pela dineína ao longo dos microtúbulos, por competição por locais de ligação comuns a nível dos microtúbulos (Mandelkow *et al.*, 2004).

A distonina e a plectina são duas proteínas membros da família das Plaquinias, que desempenham um papel importante na ligação dos elementos do citoesqueleto (Leung *et al.*, 2001).

A plectina interage especificamente com a vimentina, sendo esta interacção regulada por fosforilação. A interacção com a vimentina ocorre através de um domínio proteico localizado na extremidade C-terminal da plectina. Curiosamente, este domínio possui um NLS funcional do tipo bipartido, entre os aminoácidos 4262 a 4280, capaz de promover a importação nuclear da proteína cinase do piruvato (Nikolic *et al.*, 1996). A substituição dos aminoácidos básicos do segundo domínio do NLS bipartido da plectina por resíduos de alanina impedem a interacção entre a plectina e a vimentina. A descoberta de que o domínio de interacção da vimentina com a plectina corresponde, em parte, a uma sequência com propriedades de sinal de localização nuclear, levou à suposição da plectina poder funcionar como um local de ancoragem para proteínas de ligação a NLS (Nikolic *et al.*, 1996).

Mais recentemente, obtiveram-se evidências mais directas do envolvimento das plaquinias na localização intracelular de algumas proteínas. Uma outra proteína da família das plaquinias, a periplaquina foi implicada na localização intracelular da proteína cinase B. Tal como a plectina, a periplaquina interage com a vimentina através de um domínio proteico, localizado na extremidade C-terminal que possui uma sequência com semelhanças com os NLS convencionais bipartidos. Este mesmo domínio é essencial para a interacção da periplaquina com a proteína cinase B. A periplaquina, para além de ser detectada em associação com os filamentos intermédios, localiza-se também no núcleo, na membrana citoplasmática e nas mitocôndrias, sendo a sua localização, em parte, regulada pela presença/ausência da vimentina. A sobre-expressão da extremidade C-terminal da periplaquina resulta na retenção da proteína cinase B no citoplasma das células, impedindo o seu acesso aos núcleos. Por sua vez, a dissociação da periplaquina dos filamentos intermédios, ao expôr o NLS presente na

extremidade C-terminal da periplaquina, pode resultar na importação nuclear do complexo proteico, formado pela proteína cinase B e a periplaquina (Heuvel *et al.*, 2002).

Neste trabalho foi identificada e caracterizada a sequência de aminoácidos necessária e suficiente para a importação nuclear do HDAg, um passo importante para a identificação das vias de importação nuclear utilizadas pelos antígenos delta.

A identificação das vias de importação utilizadas pelos antígenos delta não só contribui para a compreensão dos mecanismos responsáveis pela localização nuclear dos HDAg como das RNPs do HDV. A replicação do genoma do HDV ocorre no núcleo das células infectadas por intermédio de RNA polimerases celulares. No entanto, o RNA do HDV, contrariamente aos viróides, não é importado isoladamente para o núcleo das células. Foi demonstrado que a importação nuclear do RNA do vírus depende da presença de HDAGs funcionais na ligação ao RNA do HDV e na importação nuclear (Chou *et al.*, 1998). Deste modo, depreende-se que os sinais responsáveis pela importação nuclear dos HDAGs sejam os mesmos que direccionam as RNPs do HDV para o núcleo das células infectadas.

Os HDAGs para além de garantirem a importação nuclear dos RNAs do HDV são essenciais para replicação do genoma do vírus e montagem de partículas virais. A continuidade da replicação do genoma do HDV está dependente da síntese de S-HDAg e a interacção das RNPs do HDV com os HBsAgs está, por sua vez, dependente da produção de L-HDAg. Os antígenos delta, tal como as demais proteínas celulares, são produzidos no citoplasma das células. Os resultados obtidos da análise da distribuição celular do antígeno delta pequeno nativo mostraram, inequivocamente, que a importação nuclear dos S-HDAgs, recém-sintetizados no citoplasma, é dirigida pelo NLS identificado neste trabalho. Dado que o L-HDAg partilha com o S-HDAg a mesma sequência de aminoácidos, com excepção dos 19 aminoácidos adicionais presentes na extremidade C-terminal, e a mesma localização intracelular, é muito provável que os HDAGs sejam importados por um mecanismo idêntico.

Salienta-se ainda, o papel das modificações pós-traducionais na distribuição intracelular dos HDAGs. Foi demonstrado que um dos resíduos de lisina, posição 72, do NLS identificado no HDAg encontra-se acetilado *in vivo* e que o bloqueio desta modificação altera a distribuição do antígeno delta e inibe a replicação do RNA do vírus (Mu *et al.*, 2004).

Assim, é possível verificar a importância do estudo dos sinais e a identificação das proteínas que interagem com o NLS do HDAg e o papel fundamental do transporte núcleo-citoplasmático na regulação da replicação do HDV.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Abou-Jaboudé G. and Sureau C. (2005) *Role of the antigenic loop of the hepatitis B virus envelope proteins in infectivity of hepatitis delta virus*. J. Virol. Vol. 79, pp 10460-10466.
- Abou-Jaboudé G. and Sureau C. (2007b) *Entry of hepatitis delta virus requires the conserved cysteine residues of the hepatitis B virus envelope protein antigenic loop and is blocked by inhibitors of thiol-disulfide exchange*. J. Virol. Vol. 81, pp 13057-13066.
- Abou-Jaboudé G., Molina S., Maurel P. and Sureau C. (2007a) *Myristoylation signal transfer from the large to the middle or the small HBV envelope protein leads to a loss of HDV particles infectivity*. Virol. Vol. 365, pp 204-209.
- Abraham A. and Pelchat M. (2008) *Formation of an RNA polymerase II preinitiation complex on an RNA promoter derived from the hepatitis delta virus RNA genome*. Nucl. Acids Res. Vol. 36, pp 5201-5211.
- Abruzzi K. C., Lacadie S. and Rosbash M. (2004) *Biochemical analysis of TREX complex recruitment to intronless and intron-containing yeast genes*. Eur. Mol. Biol. Org. Vol. 23, pp 2620-2631.
- Adam S. A. (2001) *The nuclear pore complex*. Genome Biol. Vol. 2, pp 7.1-7.6
- Arts G., Fornerod M. and Mattaj I. W. (1998a) *Identification of a nuclear export receptor for tRNA*. Curr. Biol. Vol. 8, pp 305-314.
- Arts G., Kuersten S., Romby P., Ehresmann B. and Mattaj I. W. (1998b) *The role of exportin-t in selective nuclear export of mature tRNAs*. EMBO J. Vol 17, pp 7430-7441.
- Askjaer P., Jensen T. H., Nilsson J., Englmeier L. and Kjems J. (1998) *The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP*. J. Biol. Chem. Vol. 273, pp 33414-33422.
- Azad A. K., Stanford D. R., Sarkar S. and Hopper A. K. (2001) *Role of nuclear pools of aminoacyl-tRNA synthetases in tRNA nuclear export*. Mol. Biol. Cell. Vol. 12, pp 1381-1392.
- Bachi A., Braun I. C., Rodrigues J. P., Panté N., Ribbeck K., Kobbe C. V., Kutay U., Wilm M., Gorlich D., Fonseca M. C. and Izaurralde E. (2000) *The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates*. RNA. Vol. 6, pp 136-158.
- Bataillé N., Helser T. and Fried H. M. (1990) *Cytoplasmic transport of ribosomal subunits microinjected into the Xenopus laevis oocyte nucleus: a generalized, facilitated process*. J. Cell Biol. Vol. 111, pp 1571-1582.
- Bayliss R., Littlewood T. and Stewart M. (2000) *Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking*. Cell, Vol. 102, pp 99-108.
- Beard M. R., MacNaughton T. B. and Gowans E. J. (1996) *Identification and characterization of a hepatitis delta virus RNA transcriptional promoter*. J. Virol. Vol. 70, pp 4986-4995.
- Bednenko J., Cingolani G. and Gerace L. (2003a) *Nucleocytoplasmic transport: navigating the channel*. Traffic, Vol. 4, pp 127-135.
- Bednenko J., Cingolani G. and Gerace L. (2003b) *Importin  $\beta$  contains a COOH-terminal nucleoporin binding region important for nuclear import*. J. Cell Biol. Vol. 162, pp 391-401.
- Ben-Efraim I. and Gerace L. (2001) *Gradient of increasing affinity of importin  $\beta$  for nucleoporins along the pathway of nuclear import*. J. Cell Biol. Vol. 152, pp 411-417.
- Blanchet M. and Sureau C. (2007) *Infectivity determinants of the hepatitis B virus pre-S domain are confined to the N-terminal 75 amino acid residues*. J. Virol. Vol. 81, pp 5841-5849.

- Bohnsack M., Czaplinski K. and Gorlich D. (2004) *Exportin-5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. RNA. Vol. 10, pp 185-191.
- Bohnsack M., Regener K., Schwappach B., Saffrich R., Paraskeva E., Hartmann E. and Gorlich D. (2002) *Exp5 exports eEF1A via tRNA from nuclei and synergizes with other transport pathways to confine translation to the cytoplasm*. EMBO J. Vol. 21, pp 6205-6215.
- Bonino F., Hoyer B., Shih J. W.-K., Rizzetto M., Purcell R. H. and Gerin J. L. (1984) *Delta hepatitis agent: structural and antigenic properties of the delta-associated particle*. Infection and Immunity, Vol. 43, pp 1000-1005.
- Bordier B. B., Marion P. L., Ohashi K., Kay M. A., Greenberg H. B., Casey J. L. and Glenn J. S. (2002) *A prenylation inhibitor prevents production of infectious hepatitis delta virus particles*. J. Virol. Vol. 76, pp 10465-10472.
- Bordier B. B., Okhanda J. and Lee S. Y. (2003) *In vivo antiviral efficacy of prenylation inhibitors against hepatitis delta virus*. J. Clin. Invest. Vol. 112, pp 407-414.
- Braun I. C., Herold A., Rode M., Conti E. and Izaurralde E. (2001) *Overexpression of TAP/p15 heterodimers bypasses nuclear retention and stimulates nuclear mRNA export*. J. Biol. Chem. Vol. 276, pp 20536-20543.
- Braun I. C., Rohrbach E., Schmitt C. and Izaurralde E. (1999) *TAP binds to the constitutive transport element (CTE) through a novel RNA-binding motif that is sufficient to promote CTE-dependent RNA export from the nucleus*. Embo J. Vol. 18, pp 1953-1965.
- Brazas R. and Ganem D. (1996) *A cellular homolog of hepatitis delta antigen: implications for viral replication and evolution*. Science, Vol. 274, pp 90-94.
- Calado A., Treichel N., Muller E. C., Otto A. And Kutay U. (2002) *Exportin-5-mediated nuclear export of eukaryotic elongation factor 1A and tRNA*. EMBO J. Vol 21, pp 6216-6224.
- Casey J. L. (2006) *RNA editing in hepatitis delta virus*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. Vol. 307, pp 67-89.
- Castelnaud C., Le Gal F., Ripault M.-P., Gordien E., Martinot-Peignoux M., Boyer N., Pham B.-N., Maylin S., Bedossa P., Dény P., Marcellin P. and Gault E. (2006) *Efficacy of peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis delta: relevance of quantitative RT-PCR for follow-up*. Hepatology, Vol. 44, pp 728-735.
- Chang F.-L., Chen P.-J., Tu S.-J., Wang C.-J. and Chen D.-S. (1991) *The large form of hepatitis delta antigen is crucial for assembly of hepatitis delta virus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 88, pp 8490-8494.
- Chang J., Nie X., Chang H. E., Han Z. and Taylor J. (2008) *Transcription of hepatitis delta virus RNA by RNA polymerase II*. J. Virol. 82, pp 1118-1127.
- Chang J., Nie X., Gudima S. and Taylor J. (2006) *Action of inhibitors on accumulation of processed hepatitis delta virus RNAs*. J. Virol. Vol. 80, pp 3205-3214.
- Chang M.-F., Chang S. C., Chang C.-I., Wu K. and Kang H.-Y. (1992) *Nuclear localization signals, but not putative leucine zipper motifs, are essential for nuclear transport of hepatitis delta antigen*. J. Virol. Vol. 66, pp 6019-6027.
- Chang M.-F., Sun C.-Y., Chen C.-J. and Chang S. C. (1993) *Functional motifs of delta antigen essential for RNA binding and replication of hepatitis delta virus*. J. Virol. Vol. 67, pp 2529-2536.
- Chao M., Hsieh S.-Y. and Taylor J. (1990) *Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication*. J. Virol. Vol. 64, pp 5066-5069.
- Chao M., Hsieh S.-Y. and Taylor J. (1991) *The antigen of hepatitis delta virus: examination of in vitro RNA-binding specificity*. J. Virol. Vol. 65, pp 4057-4062.

- Chen C.-W., Tasy Y.-G., Wu H.-L., Lee C.-H., Chen D.-S. and Chen P.-J. (2002) *The double-stranded RNA-activated kinase, PKR, can phosphorylate hepatitis D virus small delta antigen at functional serine and threonine residues*. J. Biol. Chem. Vol. 277, pp 33058-33067.
- Chen P.-J., Kalpana G., Goldberg J., Mason W., Werner B., Gerin J. and Taylor J. (1986) *Structure and replication of the genome of the hepatitis  $\delta$  virus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 83, pp 8774-8778.
- Chen Y.-S., Huang W.-H., Hong S.-Y., Tsay Y.-G. and Chen P.-J. (2008) *ERK1/2-mediated phosphorylation of small hepatitis delta antigen at serine-177 enhances HDV antigenomic RNA replication*. J. Virol. Vol. 82, pp 9345-9358.
- Cheng H., Dufu K., Lee C.-S., Hsu J. L., Dias A. and Reed R. (2006) *Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA*. Cell, Vol. 127, pp 1389-1400.
- Chook Y. M. and Blobel G. (2001) *Karyopherins and nuclear import*. Curr. Opin. Struct. Biol. Vol. 11, pp 703-715.
- Chou H.-C., Hsieh T.-Y., Sheu G.-T. and Lai M. M. C. (1998) *Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA*. J. Virol. Vol. 72, pp 3684-3690.
- Cokol M., Nair R. and Rost B. (2000) *Finding nuclear localization signals*. EMBO Rep. Vol. 1, pp 411-415.
- Conti E., Uy M., Leighton L., Blobel G. and Kuriyan J. (1998) *Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha*. Cell, Vol. 94, pp 193-204.
- Cook A., Bono F., Jinek M. and Conti E. (2007) *Structural biology of nucleocytoplasmic transport*. Annu. Rev. Biochem. Vol. 76, pp 647-671.
- Cornillez-Ty C. T. and Lazinski D. W. (2003) *Determination of the multimerization state of the hepatitis delta virus antigens in vivo*. J. Virol. Vol. 77, pp 10314-10326.
- Corpet F. (1988) *Multiple sequence alignment with hierarchical clustering*. Nucl. Acids Res. Vol. 16, pp 10881-10890.
- Cronshaw J. M., Krutchinsky A. N., Zhang W., Chait B. T. and Matutis M. J. (2002) *Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex*. J. Cell Biol. Vol. 158, pp 915-927.
- Cross T. J. S., Rizzi P., Horner M., Jolly A., Hussain M. J., Smith H. M., Vergani D. and Harrison P. M. (2008) *The increasing prevalence of hepatitis delta virus (HDV) infection in south London*. J. Med. Virol. Vol. 80, pp 277-282.
- Cullen B. R. (1998) *Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways*. Virol. Vol. 249, pp 203-210.
- Cullen B. R. (2003) *Nuclear RNA export*. J. Cell Sci. Vol. 116, pp 587-597.
- Cunha C., Monjardino J., Chang D., Krause S. and Carmo-Fonseca M. (1998) *Localization of hepatitis delta virus RNA in the nucleus of human cells*. RNA, Vol. 4, pp 680-693.
- Dahlberg J. and Lund E. (2005) *tRNA turnaround*. Mol. Cell. Vol. 19, pp 292-294.
- Dang C. V. and Lee W. M. (1988) *Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal*. Mol. Cell. Biol. Vol. 8, pp 4048-4054.
- Darshan M. S., Lucchi J., Harding E. and Moroianu J. (2004) *The L2 minor capsid protein of human papillomavirus type 16 interacts with a network of nuclear import receptors*. J. Virol. Vol. 78, pp 12179-12188.
- Dehmelt L. and Halpain S. (2004) *The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins*. Genome Biol. Vol. 6, pp 204.1-204.10.

- Denning D. P., Patel S. S., Uversky V., Fink A. L. and Rexach M. (2003) *Disorder in the nuclear pore complex: the FG repeat region of nucleoporins are natively unfolded*. PNAS. Vol. 100, pp 2450-2455.
- Dingwall C., Robbins J., Dilworth S. M., Roberts B. and Richardson W. D. (1988) *The nucleoplasmic nuclear location sequence is larger and more complex than that of SV-40 large T antigen*. J. Cell Biol. Vol. 107, pp 841-849.
- Dingwall C., Sharnick S. V. and Laskey R. A. (1982) *A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmic into the nucleus*. Cell, Vol. 30, pp 449-458.
- Donello J. E., Loeb J. E. and Hope T. J. (1998) *Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element*. J. Virol. Vol. 72, pp 5085-5092.
- Du T. and Zamore P. D. (2005) *microPrimer: the biogenesis and function of microRNA*. Develop. Vol. 132, pp 4645-4652.
- Einav S. and Glenn J. S. (2003) *Prenylation inhibitors: a novel class of antiviral agents*. J. Antimicrob. Chemother. Vol. 52, pp 883-886.
- Emili A., Shales M., McCracken S., Xie W., Tucker P. W., Kobayashi R., Blencowe B. J. and Ingles C. J. (2002) *Splicing and transcription-associated proteins PSF and p54/NonO bind to the RNA polymerase II CTD*. RNA, Vol. 2, pp 1102-1111.
- Engelke M., Mills K., Seitz S., Simon P., Gripon P., Schnolzer M. and Urban S. (2006) *Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site*. Hepatology, Vol. 43, pp 750-760.
- Engelsma D., Bernad R., Calafat J. and Fornerod M. (2004) *Supraphysiological nuclear export signals bind CRM1 independently of RanGTP and arrest at Nup358*. EMBO J. Vol. 23, pp 3643-3652.
- Enninga J., Levay A., Fontoura B. M. A. (2003). *Sec13 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and stably interacts with Nup96 at the nuclear pore complex*. Mol. Cell. Biol. Vol. 23, pp 7271-7284.
- Erkman J. A., Sanchez R., Treichel N., Marzluff W. F. and Kutay U. (2005) *Nuclear export of metazoan replication-dependent histone mRNAs is dependent on RNA length and is mediated by TAP*. RNA, Vol. 11, pp 45-58.
- Fagerlund R., Melén K., Kinnunen L. and Julkunen I. (2002) *Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin  $\alpha 5$* . J. Biol. Chem. Vol. 277, pp 30072-30078.
- Fahrenkrog B. and Aebi U. (2003) *The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond*. Mol. Cell Biol. Vol. 4, pp 757-766.
- Farci P. (2006) *Treatment of chronic hepatitis D: new advances, old challenges*. Hepatology, Vol. 44, pp 536-539.
- Farci P., Mandas A., Coiana A., Lai M. E., Desmet V., Eyken P. V., Gibo Y., Caruso L., Scaccabarozzi S., Criscuolo D., Ryff J.-C. and Balestrieri A. (1994) *Treatment of chronic hepatitis D with interferon alfa-2a*. New England J. Med. Vol. 330, pp 88-94.
- Farci P., Roskams T., Chessa L., Peddis G., Mazzoleni A. P., Scioscia R., Serra G., Lai M. E., Loy M., Caruso L., Desmet V., Purcell R. H. and Balestrieri A. (2004) *Long-term benefit of interferon  $\alpha$  therapy of chronic hepatitis D: Regression of advanced hepatic fibrosis*. Gastroenterology, Vol. 126, pp 1740-1749.
- Fattovich G., Giustina G., Christensen E., Pantalena M., Zagni I., Realdi G. and Schalm S. W. (2000) *Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B*. Gut, Vol. 46, pp 420-426.

Fiedler M. and Roggendorf M. (2001) *Vaccination against hepatitis delta virus infection: studies in the woodchuck (Marmota monax) model*. Intervirology, Vol. 44, pp 154-161.

Fiedler M. and Roggendorf M. (2006) *Immunology of HDV infection*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. Vol. 307, pp 187-209.

Filipovska J. and Konarska M. M. (2000) *Specific HDV RNA-templated transcription by pol II in vitro*. RNA, Vol. 6, pp 41-54.

Fischer U., Heinrich J., van Zee K., Fanning E. and Luhrmann R. (1994) *Nuclear transport of U1 snRNP in somatic cells: differences in signal requirement compared with Xenopus laevis oocytes*. J. Cell Biol. Vol. 125, pp 971-980.

Fischer U., Huber J., Boelens W. C., Mattaj I. W. and Luhrmann (1995) *The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs*. Cell, Vol. 82, pp 475-483.

Fischer U., Sumpster V., Sekine M., Satoh T. and Luhrmann R. (1993) *Nucleo-cytoplasmic transport of U snRNPs: definition of a nuclear location signal in the Sm core domain that binds a receptor independently of the m<sub>7</sub>G cap*. EMBO J. Vol. 12, pp 573-583.

Florin L., Becker K. A., Sapp C., Lambert C., Sirma H., Muller M., Streeck R. E. and Sapp M. (2004) *Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires HSC70*. J. Virol. Vol. 78, pp 5546-5553.

Fontes M. R., Teh T. and Kobe B. (2000) *Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- $\alpha$* . J. Mol. Biol. Vol. 297, pp 1183-1194.

Fornerod M., Ohno M., Yoshida M. and Mattaj I. W. (1997) *CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals*. Cell, Vol. 90, pp 1051-1060.

Frey S., Richter R. P. and Gorlich D. (2006) *FG-rich repeats of nuclear pore proteins form a three-dimensional meshwork with hydrogel-like properties*. Science, Vol. 314, pp 815-817.

Fribourg S., Braun I. C., Izaurralde E. and Conti E. (2001) *Structural basis for recognition of a nucleoporin FG repeat by the NTF2-like domain of the TAP/p15 mRNA nuclear export factor*. Mol. Cell. Vol. 8, pp 645-656.

Friedrich B., Quensel C., Sommer T., Hartmann E. and Kohler M. (2006) *Nuclear localization signal and protein context both mediate importin  $\alpha$  specificity of nuclear import substrates*. Mol. Cell. Biol. Vol. 26, pp 8697-8709.

Fromont-Racine M., Senger B., Saveanu C. and Fasiolo F. (2003) *Ribosome assembly in eukaryotes*. Gene, Vol. 313, pp 17-42.

Fu T.-B. and Taylor J. (1993) *The RNAs of hepatitis delta virus are copied by RNA polymerase II in nuclear homogenates*. J. Virol. Vol. 67, pp 6965-6972.

Gadal O., Straub D., Kessl J., Trumpower B., Tollervey D. and Hurt E. (2001) *Nuclear export of 60S ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with large subunit protein Rpl10p*. Mol. Cell. Biol. Vol. 21, pp 3405-3415.

Gaeta G. B., Stroffolini T., Chiaramonte M., Ascione T., Stornaiuolo G., Lobello S., Sagnelli E., Brunetto M. and Rizzetto M. (2000) *Chronic hepatitis D: A vanishing disease? An italian multicenter study*. Hepatology, Vol. 32, pp 824-827.

Gatfield D. and Izaurralde E. (2002) *REF1/Aly and the additional exon junction complex proteins are dispensable for nuclear mRNA export*. J. Cell Biol. Vol. 25, pp 579-588.

Gatfield D., Le Hir H., Schmitt C., Braun I. C., Köcher T., Wilm M and Izaurralde E. (2001) *The DExH/D box protein HEL/UAP56 is essential for mRNA nuclear export in Drosophila*. Curr Biol. Vol. 11, pp 1716-1721.

- Gerin J. L., Casey J. L. and Purcell R. H. (2001) *Hepatitis delta virus*. In: Fields B. N., Peter M., et al., editors. *Fields Virology*, 4th edition. Chapter 88.
- Gilchrist D., Mykytka B. and Rexach M. (2002) *Accelerating the rate of disassembly of karyopherin-cargo complexes*. *J. Biol. Chem.* Vol. 277, pp 18161-18172.
- Glebe D. and Urban S. (2007) *Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry*. *World J. Gastroenterology*, Vol. 13, pp 22-38.
- Goldfarb D. S., Corbett A. H., Mason D. A., Harreman M. T. and Adam S. A. (2004) *Importin  $\alpha$ : a multipurpose nuclear-transport receptor*. *Trends Cell Biol.* Vol.14, pp 505-514.
- Gorlich D. and Kutay U. (1999) *Transport between the cell nucleus and the cytoplasm*. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* Vol. 15, pp 607-660.
- Gorlich D., Henklein P., Laskey R. A., Hartmann E. (1996b) *A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus*. *EMBO J.* Vol.15, pp 1810-1817.
- Gorlich D., Panté N., Kutay U., Aebi U. and Bischoff F. R. (1996a) *Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import*. *EMBO J.* Vol. 15, pp 5584-5594.
- Gorlich D., Vogel F., Mills A. D., Hartmann E. and Laskey R. A. (1995) *Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import*. *Nature*, Vol. 377, pp 246-248.
- Greco-Stewart V. S., Miron P., Abraham A. and Pelchat M. (2007) *The human RNA polymerase II interacts with the terminal stem-loop regions of the hepatitis delta virus RNA genome*. *Virol.* Vol. 357, pp 68-78.
- Greco-Stewart V. S., Thibault C. S. and Pelchat M. (2006) *Binding of the polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor (PSF) to the hepatitis delta virus RNA*. *Virol.* Vol. 356, pp 35-44.
- Grigorescu M., Pascu O., Acalovschi M. and Radu C. (2003) *What is the real prevalence of the D virus infection in chronic hepatitis and liver cirrhosis in Romania*. *Rom. J. Gastroenterol.* Vol. 12, pp 179-82.
- Gruter P., Taberner C., Kobbe C. V., Schmitt C., Saavedra C., Bachi A., Wilm M., Felber B. K. and Izaurralde E. (1998) *TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus*. *Mol. Cell.* Vol. 1, pp 649-659.
- Gudima S., Chang J., Moraleda G., Azvolinsky A. and Taylor J. (2002) *Parameters of human hepatitis delta virus genome replication: the quantity, quality, and intracellular distribution of viral proteins and RNA*. *J. Virol.* Vol. 76, pp 3709-3719.
- Gudima S., Wu S. Y., Chiang C. M., Moraleda G. and Taylor J. (2000) *Origin of hepatitis delta virus mRNA*. *J. Virol.* Vol. 74, pp 7204-7210.
- Guzik B. W., Levesque L., Prasad S., Bor Y. C., Black B. E., Paschal B. M., Rekosh D. and Hammarskjöld M. L. (2001) *NXT1 (p15) is a crucial cellular cofactor in TAP-dependent export of intron-containing RNA in mammalian cells*. *Mol. Cell. Biol.* Vol. 21, pp 2545-2554.
- Gwizdek C., Bertrand E., Dargemont C., Lefebvre J.-C., Blanchard J.-M., Singer R. H. and Doglio A. (2001) *Terminal minihelix, a novel RNA motif that directs polymerase III transcripts to the cell cytoplasm*. *J. Biol. Chem.* Vol. 276, pp 25910-25918.
- Gwizdek C., Nazari B. O., Brownawell A. M., Doglio A., Bertrand E., Maçara I. A. and Dargemont C. (2003) *Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs*. *J. Biol. Chem.* Vol. 278, pp 5505-5508.
- Hall M. L., Hereford L. and Herskowitz I. (1984) *Targeting of E. coli  $\beta$ -galactosidase to the nucleus in yeast*. *Cell*, Vol. 36, pp 1057-1065.

Hamm J. and Mattaj J. W. (1990) *Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus*. Cell, Vol. 63, pp 109-118.

Hanz S., Perlson E., Willis D., Zheng J.-Q., Massarwa R., Huerta J. J., Koltzenburg M., Kohler M., van-Minnen J., Twiss J. L. and Fainzilber M. (2003) *Axoplasmic importins enable retrograde injury signaling in lesioned nerve*. Neuron, Vol. 40, pp 1095-1104.

Henikoff S. (1984) *Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing*. Gene, Vol. 28, pp 357-359.

Henkel T., Zabel U., Zee K. V., Müller J. M., Fanning E. and Baeuerle P. A. (1992) *Intramolecular masking of the nuclear location signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF- $\kappa$ B subunit*. Cell, Vol. 68, pp 1121-1133.

Herold A., Klymenko T. and Izaurralde E. (2001) *NXF1/p15 heterodimers are essential for mRNA nuclear export in Drosophila*. RNA, Vol. 7, pp 1768-1780.

Herold A., Suyama M., Rodrigues J. P., Braun I. C., Kutay U., Carmo-Fonseca M., Bork P. and Izaurralde E. (2000) *TAP (NXF1) Belongs to a Multigene Family of Putative RNA Export Factors with a Conserved Modular Architecture*. Mol Cell Biol. Vol. 20, pp 8996-9008.

Herold A., Teixeira L. and Izaurralde E. (2003) *Genome-wide analysis of nuclear mRNA export pathways in Drosophila*. EMBO J. Vol. 22, pp 2472-2483.

Herold A., Truant R., Wiegand H. and Cullen B. R. (1998) *Determination of the functional domain organization of importin  $\alpha$  nuclear import factor*. J. Cell Biol. Vol. 143, pp 309-318.

Heuvel A. P. J. van den, Vries-Smits A. M. M., Weeren P. C. van, Dijkers P. F., Bruyen K. M. T., Riedi J. A. and Burgering B. M. T. (2002) *Binding of protein kinase B to the plakin family member periplakin*. J. Cell Sci. Vol. 115, pp 3957-3966.

Ho J. H.-N., Kallstrom G. and Johnson A. W. (2000) *Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of large ribosomal subunit*. J. Cell Biol. Vol. 151, pp 1057-1066.

Hofmann K., Bucher P., Falquet L. and Bairoch A. (1999) *The PROSITE database, its status in 1999*. Nucleic Acids Res. Vol. 27, pp 215-219.

Hoofnagle J. H. and Bisceglie A. M. (1997) *The treatment of chronic viral hepatitis*. Drug Therapy, Vol. 336, pp 347-356.

Hope T. J., Huang X., McDonald D. and Parslow T. G. (1990) *Steroid-receptor fusion of the human immunodeficiency virus type 1 Rev transactivator: Mapping cryptic functions of the arginine-rich motif*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 87, pp 7787-7791.

Hopper A. K. Phizicky and E. M. (2003) *tRNA transfers to the limelight*. Genes & Dev. Vol 17, pp 162-180.

Hsieh S. Y., Yang P. Y., Ou J. T. and Liaw Y. F. (1994) *Polyadenylation of the mRNA of hepatitis delta virus is dependent on the structure of the nascent RNA and regulated by the small or large delta antigen*. Nucleic Acids Res. Vol. 22, pp 391-386.

Hsieh S.-Y and Taylor J. (1991) *Regulation of polyadenylation of hepatitis delta virus antigenomic RNA*. J. Virol. Vol. 65, pp 6438-6446.

Hsieh S.-Y., Chao M., Coates L. and Taylor J. (1990) *Hepatitis delta virus genome replication: a polyadenylated mRNA for delta antigen*. J. Virol. Vol. 64, pp 3194-3198.

Hsieh T.-H., Liu C.-J., Chen D.-S. and Chen P.-J. (2006) *Natural course and treatment of hepatitis D virus infection*. J. Formos. Med. Assos. Vol. 105, pp 869-881.

- Hsu S.-C. and Hung M.-C. (2007) *Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the RGFR family*. J. Biol. Chem. Vol. 282, pp 10432-10440.
- Huang I.-C., Chien C.-Y., Huang C.-R. and Lo S. J. (2006) *Induction of hepatitis D virus large antigen translocation to the cytoplasm by hepatitis B virus surface antigens correlates with endoplasmic reticulum stress and NF- $\kappa$ B activation*. J. General Virol. Vol. 87, pp 1715-1723.
- Huang J. and Liang T. J. (1993) *A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products*. Mol. Cell. Biol. Vol. 13, pp 7476-7486.
- Huang W.-H., Chen Y.-S. and Chen P.-J. (2008a) *Nucleolar Targeting of hepatitis delta antigen abolishes its ability to initiate viral antigenomic RNA replication*. J. Virol. Vol. 82, pp 692-699.
- Huang W.-H., Mai R.-T. and Lee Y.-H. W. (2008b) *Transcription Factor YY1 and Its Associated Acetyltransferases CBP and p300 Interact with Hepatitis Delta Antigens and Modulate Hepatitis Delta Virus RNA Replication*. J. Virol. Vol. 82, pp 7313-7324.
- Huang W.-H., Yung B. Y. M., Syu W.-J. and Lee Y.-H. W. (2001a) *The nucleolar phosphoprotein B23 interacts with hepatitis delta antigens and modulates the hepatitis delta virus RNA replication*. J. Biol. Chem. Vol. 276, pp 25166-25175.
- Huang X., Hope T. J., Bond B. L., McDonald D., Grahl K. and Parslow T. G. (1991) *Minimal Rev-Response Element for Type 1 Human Immunodeficiency Virus*. J. Virol. Vol. 65, pp 2131-2134.
- Huang Y. and Carmichael G. (1997) *The mouse histone H2a gene contains a small element that facilitates cytoplasmic accumulation of intronless gene transcripts and of unspliced HIV-1-related mRNAs*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 94, pp 10104-10109.
- Huang Y. and Carmichael G. G. (1996) *Role of polyadenylation in nucleocytoplasmic transport of mRNA*. Mol. Cell. Biol. Vol. 16, pp 1534-1542.
- Huang Y. and Steitz J. A. (2001) *Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA*. Mol. Cell. Vol. 7, pp 899-905.
- Huang Y., Gattoni R., Stévenin J. and Steitz J. A. (2003) *SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export*. Mol. Cell. Vol. 11, pp 837-843.
- Huang Z. -M. and Yen T. S. B. (1995) *Role of the Hepatitis B Virus Posttranscriptional Regulatory Element in Export of Intronless Transcripts*. Mol. Cell. Biol. Vol. 15, pp 3864-3869.
- Huber J., Croshagen U., Kadokura M., Marshallsay C., Wada T., Sekine M. and Luhrmann R. (1998) *Snurportin1, an mG-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure*. EMBO J. Vol 17, pp 4114-4126.
- Huber J., Dickmanns A. and Luhrmann R. (2002) *The importin- $\beta$  binding domain of snurportin1 is responsible for the Ran- and energy-independent nuclear import of spliceosomal U snRNP in vitro*. J. Cell Biol. Vol. 156, pp 467-479.
- Hung N.-J., Lo K.-Y., Patel S. S., Helmke K. and Johnson A. W. (2008) *Arx1 is a nuclear export receptor for the 60S ribosomal subunit in yeast*. Mol. Biol. Cell. Vol. 19, pp 735-744.
- Huo T.-I., Wu J.-C., Lin R.-Y., Sheng W.-Y., Chang F.-Y. and Lee S.-D. (1997) *Decreasing hepatitis D virus infection in Taiwan: an analysis of contributory factors*. J. Gastroenterol. Hepatol. Vol. 12, pp 747-751.
- Huo T.-I., Wu J.-C., Wu S.-I., Chang A.-L., Lin S.-K., Pan C.-H., Huang Y.-H., Chang F.-Y. and Lee S.-D. (2003) *Changing seroepidemiology of hepatitis B, C, and D virus infections in high-risk populations*. J. Med. Virol. Vol. 72, pp 41-45.

Hurt E., Hannus S., Schmelzl B., Lau D., Tollervey D. and Simos G. (1999) *A novel in vivo assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in ran-cycle and nucleoporin mutants.* J. Cell Biol. Vol. 144, pp 389-401.

Hwang S. B. and Lai M. M. C. (1993) *Isoprenylation mediates direct protein-protein interactions between hepatitis large delta antigen and hepatitis B virus surface antigen.* J. Virol. Vol. 67, pp 7659-7662.

Hwang S. B. and Lai M. M. C. (1994) *Isoprenylation masks a conformational epitope and enhances trans-dominant inhibitory function of the large hepatitis delta antigen.* J. Virol. Vol. 68, pp 2958-2964.

Imamoto N., Matsuoka Y., Kurihara T., Kohno K., Miyagi M., Sakiyama F., Okada Y., Tsunasawa S. and Yoneda Y. (1992) *Antibodies against 70-kD heat shock cognate protein inhibit mediated nuclear import of karyophilic proteins.* J. Cell Biol. Vol. 119, pp 1047-1061.

Izaurralde E. (2002) *A novel family of nuclear transport receptors mediates the export of messenger RNA to the cytoplasm.* Eur. J. Cell Biol. Vol. 81, pp 577-584.

Izaurralde E., Lewis J., Gamberi C., Jarmolowski A., McGuigan C. and Mattaj I. W. (1995) *A cap-binding protein complex mediating U snRNA export.* Nature, Vol. 376, pp 709-712.

Izaurralde E., Stepinski J., Darzynkiewicz E. and Mattaj I. W. (1992) *A cap binding protein that may mediate nuclear export of RNA polymerase II-transcribed RNAs.* J. Cell Biol. Vol. 118, pp 1287-1295.

Jakel S. and Gorlich D. (1998) *Importin  $\beta$ , transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells.* EMBO J., Vol. 17, pp 4491-4502.

Jakel S., Mingot J.-M., Schwarzmaier P., Hartmann E. and Gorlich K. (2002) *Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains.* EMBO J. Vol. 21, pp 377-386.

Jans D. A., Briggs L. J., Gustin S. E., Jans P., Ford S. and Young I. G. (1997) *The cytokine interleukin-5 (IL-5) effects cotransport of its receptor subunits to the nucleus in vitro.* FEBS letters, Vol. 410, pp 368-372.

Jarmolowski A., Boelens W. C., Izaurralde E., and Mattaj I. W. (1994) *Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors.* J. Cell Biol. Vol. 124, pp 627-635.

Jayan G. C. and Casey J. L. (2002) *Inhibition of hepatitis delta virus RNA editing by short inhibitory RNA-mediated knockdown of ADAR1 but not ADAR2 expression.* J. Virol. Vol. 76, pp 12399-12404.

Jeoung D. I., Chen S., Windsor J. and Pollack R. E. (1991) *Human major HSP70 protein complements the localization and functional defects of a cytoplasmic mutant SV40 T antigen in Swiss 3T3 mouse fibroblast cells.* Genes Dev. Vol. 5, pp 2235-2244.

Johnson A. W., Lund E. and Dahlberg J. (2002) *Nuclear export of ribosomal subunits.* TRENDS Bioch. Sci. Vol. 11, pp 580-585.

Johnson C. V., Singer R. H. and Lawrence J. B. (1991) *Fluorescent detection of nuclear RNA and DNA: implications for genome organization.* Meth. Cell Biol. Vol. 35, pp 73-98.

Jullien D., Gorlich D., Laemmli U. K. and Adachi Y. (1999) *Nuclear import of RPA in Xenopus egg extracts requires a novel protein XRIP $\alpha$  but not importin  $\alpha$ .* EMBO J. Vol. 18, pp 4348-4358.

Kadaba S., Wang X. and Anderson J. T. (2006) *Nuclear RNA surveillance in Saccharomyces cerevisiae: Trf4p-dependent polyadenylation of nascent hypomethylated tRNA and an aberrant form of 5S rRNA.* RNA, Vol. 12, pp 508-521.

Kalab P. and Heald R. (2008) *The RanGTP gradient-a GPS for the mitotic spindle.* J. Cell. Sci. Vol. 121, pp 1577-1586.

- Kalderon D., Roberts B. L., Richardson W. D. and Smith A. E. (1984) *A short amino acid sequence able to specify nuclear location*. Cell, Vol. 39, pp 499-509.
- Kamei Y., Yuba S., Nakayama T. and Yoneda Y. (1999) *Three distinct classes of the  $\alpha$ -subunit of the nuclear pore-targeting complex (importin- $\alpha$ ) are differentially expressed in adult mouse tissues*. J. Histochem. Cytochem. Vol. 47, pp 363-372.
- Kao J.-H., Chen P.-J., Lai M.-Y. and Chen D.-S. (2002) *Hepatitis D virus genotypes in intravenous drug users in Taiwan: decreasing prevalence and lack of correlation with hepatitis B virus genotypes*. J. Clin. Microbiol. Vol. 40, pp 3047-3049.
- Kapadia F., Pryor A., Chang T-H. and Johnson L. F. (2006) *Nuclear localization of poly(A)<sup>+</sup> mRNA following siRNA reduction of expression of the mammalian RNA helicases UAP56 and URH49*. Gene, Vol. 384, pp 37-44.
- Kim V. N. (2004) *MicroRNA precursor in motion: exportin-5 mediates their nuclear export*. Trends Cell Biol. Vol. 14, pp 156-159.
- Kiss T. (2004) *Biogenesis of small nuclear RNPs*. J. Cell Science. Vol. 117, pp 5949-5951.
- Kitao S., Segref A., Kast J., Wilm M., Mattaj I. W. and Ohno M. (2008) *A compartmentalized phosphorylation/dephosphorylation system that regulates U snRNA export from the nucleus*. Mol. Cell. Biol. Vol. 28, pp 487-497.
- Kobe B. (1999) *Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha*. Nat. Struct. Biol. Vol. 6, pp 388-397.
- Kohler A. and Hurt E. (2007) *Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm*. Mol. Cell Biol. Vol. 8, pp 761-773
- Kohler M., Ansieau S., Prehn S., Leutz A., Haller H. and Hartmann E. (1997) *Cloning of two novel human importin- $\alpha$  subunits and analysis of the expression pattern of the importin- $\alpha$  protein family*. FEBS letters. Vol. 417, pp 104-108.
- Kohler M., Speck C., Christiansen M., Bischoff F. R., Prehn S., Haller H., Gorlich D. and Hartmann E. (1999) *Evidence for distinct substrate specificities of importin  $\alpha$  family members in nuclear protein import*. Mol. Cell. Biol. Vol. 19, pp 7782-7791.
- Kudo N., Matsumori N., Taoka H., Fujiwara D., Schreiner E. P., Wolff B., Yoshida M and Horinouchi S. (1999) *Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 96, pp 9112-9117.
- Kuersten S., Segal S. P., Verheyden J., LaMartina S. M. and Goodwin E. B. (2004) *NXF-2, REF-1, and REF-2 affect the choice of nuclear export pathway for tra-2 mRNA in C. elegans*. Mol. Cell. Vol. 14, pp 599-610.
- Kuo M. Y. O., Goldberg J., Coates L., Gerin J. and Taylor J. (1988) *Molecular cloning of hepatitis delta virus RNA from infected woodchuck liver: sequence, structure and applications*. J. Virol. Vol. 62, pp 1855-1861.
- Kuo M. Y.-P., Chao M. and Taylor J. (1989) *Initiation of replication of the human hepatitis delta virus genome from a cloned DNA: role of delta antigen*. J. Virol. Vol. 63, pp 1945-1950.
- Kutay U., Bischoff F. R., Kostka S., Kraft R. and Gorlich D. (1997) *Export of importin  $\alpha$  from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor*. Cell, Vol. 90, pp 1061-1071.
- Kutay U., Lipowsky G., Izauralde E., Bischoff F. R., Schwarzmaier P., Hartmann E. and Gorlich D. (1998) *Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor*. Mol Cell. Vol 1, pp 359-369.

- Laemmli U. K. (1970) *Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, Vol. 227, pp 680-685.
- Lai M. M. C. (2006) *Hepatitis delta antigen: Biochemical properties and functional roles in HDV replication*. In: Handa H. and Yamaguchi Y., editors. Hepatitis Delta Virus. Landes Biosciences and Springer.
- Lam M. H. C., Thomas R. J., Loveland K. L., Schilders S., Gu M., Martin T. J., Gillespie M. T. and Jans D. A. (2002) *Nuclear transport of parathyroid hormone (PTH)-related protein is dependent on microtubules*. Mol. Endocrinol. Vol. 2, pp 390-401.
- Lange A., Mills R. E., Lange C. J., Stewart M., Devine S. E. and Corbett A. H. (2007) *Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin  $\alpha$* . J. Biol. Chem. Vol. 282, pp 5101-5105.
- Lau D. T.-Y., Doo E., Park Y., Kleiner D. E., Schmid P., Kuhns M. C. and Hoofnagle J. H. (1999) *Lamivudine for chronic delta hepatitis*. Hepatology, Vol. 30, pp 546-549.
- Lazinski D. W. and Taylor J. M. (1993) *Relating structure to function in the hepatitis delta virus antigen*. J. Virol. Vol. 67, pp 2672-2680.
- Lazinski D. W. and Taylor J. M. (1994) *Expression of hepatitis delta virus RNA deletions: cis and trans requirements for self-cleavage, ligation, and RNA packaging*. J. Virol. Vol. 68, pp 2879-2888.
- Le Hir H., Gatfield D., Izaurralde E. and Moore M. J. (2001) *The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay*. Eur. Mol. Biol. Org. Vol. 20, pp 4987-4997.
- Lee B. J., Cansizoglu A. E., Suel K. E., Louis T. H., Zhang Z. and Chook Y. M. (2006) *Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin $\beta$ 2*. Cell, Vol. 126, pp 543-558.
- Lee C. H., Chang S. C., Chen C. J. and Chang M. F. (1998) *The nucleolin binding activity of hepatitis delta antigen is associated with nucleolus targeting*. J. Biochem. Vol. 273, pp 7650-7656.
- Lee C.-H., Chang S. C., Wu C. H. H. and Chang M.-F. (2001) *A novel chromosome region maintenance 1-independent nuclear export signal of the large form of hepatitis delta antigen that is required for the viral assembly*. J. Biol. Chem. Vol. 276, pp 8142-8148.
- Lee C.-Z. and Sheu J.-C. (2008) *Histone H1e interacts with small hepatitis delta antigen and affects hepatitis delta virus replication*. Virol. Vol. 375, pp 197-204.
- Lee C.-Z., Chen P.-J. and Chen D.-S. (1995) *Large hepatitis delta antigen in packaging and replication inhibition: Role of the carboxyl-terminal 19 amino acids and amino-terminal sequences*. J. Virol. Vol. 69, pp 5332-5336.
- Lee C.-Z., Lin J.-H., Chao M., McKnight K. and Lai M. M. C. (1993) *RNA-binding activity of hepatitis delta antigen involves two arginine-rich motifs and is required for hepatitis delta virus RNA replication*. J. Virol. Vol. 67, pp 2221-2227.
- Lee S. J., Matsuura Y., Liu S. M. and Stewart M. (2005) *Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP*. Nature, Vol. 435, pp 693-696.
- Leslie D. M., Zhang W., Timney B. L., Chait B. T., Rout M. P., Wozniak R. W. and Aitchison. (2004) *Characterization of karyopherin cargoes reveals unique mechanisms of kap121-p mediated nuclear import*. Mol. Cell. Biol. Vol. 24, pp 8487-8503.
- Leung C. L., Liem R. K. H., Parry D. A. D. and Green K. J. (2001) *The plakin family*. J. Cell Sci. Vol. 114, pp 3409-3410.

- Leung S. W., Harreman M. T., Hodel M. R., Hodel A. E. and Corbett A. H. (2003) *Dissection of the karyopherin  $\alpha$  nuclear localization signal (NLS)-binding groove. Functional requirements for NLS binding.* J. Biol. Chem. Vol. 278, pp 41947-41953.
- Li Y.-J., Macnaughton T., Gao L. and Lai M. C. (2006) *RNA-templated replication of hepatitis delta virus: genomic and antigenomic RNAs associate with different nuclear bodies.* J. Virol. Vol. 80, pp 6478-6486.
- Li Y.-J., Stallcup M. R., Lai M. M. C. (2004) *Hepatitis delta virus antigen is methylated at arginine residues, and methylation regulates subcellular localization and RNA replication.* J. Virol. Vol. 78, pp 13325-13334.
- Lim R. Y. H., Aebi U. and Fahrenkrog B. (2008) *Towards reconciling structure and function in the nuclear pore complex.* Histochem. Cell Biol. Vol. 129, pp 105-116.
- Lin J.-H., Chang M.-F., Baker S. C., Govindarajan S. and Lai M. M. C. (1990) *Characterization of hepatitis delta antigen: specific binding to hepatitis delta virus RNA.* J. Virol. Vol. 64, pp 4051-4058.
- Linnstaedt S. D., Kasprzak W. K., Shapiro B. A. and Casey J. L. (2006) *The role of a metastable RNA secondary structure in hepatitis delta virus genotype III RNA editing.* RNA, Vol. 12, pp 1521-1533.
- Lipowsky G., Bischoff F. R., Izaurralde E., Kutay U., Schafer S., Gross H. J., Beier H. and Gorlich D. (1999) *Coordination of tRNA nuclear export with processing of tRNA.* RNA Vol. 5, pp 539-549.
- Lischka P., Rosorius O., Trommer E. and Stamminger T. (2001) *A novel transferable nuclear export signal mediates CRM1-independent nucleocytoplasmic shuttling of the human cytomegalovirus transactivator protein pUL69.* EMBO J. Vol. 20, pp 7271-7283.
- Livak K. and Schmittgen T. D. (2001) *Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> method.* Methods, Vol. 25, pp 402-408.
- Lo K., Hwang S. B., Duncan R., Trousdale M. and Lai M. M. (1998) *Characterization of mRNA for hepatitis delta antigen: exclusion of the full-length antigenomic RNA as an mRNA.* Virol. Vol. 250, pp 94-105.
- Lund E. and Dahlberg J. E. (1998) *Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus.* Science Vol. 282, pp 2082-2084.
- Lund E., Guttinger S., Calado A., Dahlberg J. E. and Kutay U. (2004) *Nuclear export of microRNA precursors.* Science. Vol. 303, pp 95-98.
- Luo M. and Reed R. (1999) *Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans.* PNAS. Vol. 96, pp 14937-14942.
- Luo M.-J., Zhou Z., Magni K., Christoforides C., Rappilber J., Mann M. and Reed R. (2001) *Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly.* Nature, Vol. 413, pp 644-647.
- Macnaughton T. B. and Lai M. M. C. (2002b) *Genomic but not antigenomic hepatitis delta virus RNA is preferentially exported from the nucleus immediately after synthesis and processing.* J. Virol. Vol. 76, pp 3928-3935.
- Macnaughton T. B., Shi S. T., Modahl L. E. and Lai M. M. C. (2002a) *Rolling circle replication of hepatitis delta virus RNA is carried out by two different cellular RNA polymerases.* J. Virol. Vol. 76, pp 3920-3927.
- Macnaughton T. B., Wang Y.-J. and Lai M. M. C. (1993) *Replication of hepatitis delta virus RNA: effect of mutations of the autocatalytic cleavage sites.* J. Virol. Vol. 67, pp 2228-2234.
- Madrid A. S. and Weis K. (2006) *Nuclear transport is becoming crystal clear.* Chromosoma Vol. 115, pp 98-109.
- Mai R. T., Yeh T.-S., Kao C.-F., Sun S.-K., Huang H.-H. and Lee Y.-H. W. (2006) *Hepatitis C virus core protein recruits nucleolar phosphoprotein B23 and coactivator p300 to relieve the repression effect of transcriptional factor YY1 on B23 gene expression.* Oncogene, Vol. 25, pp 448-462.

- Makkerh J. P. S., Dingwall C. and Laskey R. A. (1996) *Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids*. *Curr. Biol.* Vol. 6, pp 1025-1027.
- Mandelkow E.-M., Thies E., Trinczek B., Biernat J. and Mandelkow E. (2004) *MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons*. *J. Cell Biol.* Vol. 167, 99-110.
- Marshall C. and Luhrmann R. (1994) *In vitro nuclear import of snRNPs: cytosolic factors mediate m3G-cap dependence of U1 and U2 snRNP transport*. *EMBO J.* Vol. 13, pp 222-231.
- Massenet S., Pellizzoni L., Paushkin S., Mattaj J. W. and Dreyfuss G. (2002) *The SMN complex is associated with snRNPs throughout their cytoplasmic assembly pathway*. *Mol. Cell. Biol.* Vol. 22, pp 6533-6541.
- Masuda S., Das R., Cheng H., Hurt E., Dorman N. and Reed R. (2005) *Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing*. *Genes & Dev.* Vol. 19, pp 1512-1517.
- Masuyama K., Taniguchi I., Kataoka N. and Ohno M. (2004a) *SR proteins preferentially associate with mRNAs in the nucleus and facilitate their export to the cytoplasm*. *Genes to Cells*, Vol. 9, pp 959-965.
- Masuyama K., Taniguchi I., Kataoka N. and Ohno M. (2004b) *RNA length defines RNA export pathway*. *Genes and Dev.* Vol. 18, pp 2074-2085.
- Matsuura Y. and Stewart M. (2005) *Nup50/Npap60 function in nuclear protein import complex disassembly and importin recycling*. *Embo J.* Vol. 24, pp 3681-3689.
- Matsuura Y., Lange A., Harreman M. T., Corbett A. H. and Stewart M. (2003) *Structural basis for Nup2p function in cargo release and karyopherin recycling in nuclear import*. *EMBO J.* Vol. 22, pp 5358-5369.
- McKee A. E. and Silver P. A. (2004) *REF-ereeing the cytoplasmic fate of mRNA via nuclear export*. *Dev. Cell.* Vol.6, pp 740-742.
- Mele A., Mariano A., Tosti M. E., Stroffolini T., Pizzuti R., Gallo G., Ragni P., Zotti C., Lopalco P., Curtale F., Balocchini E. and Spada E. (2007) *Acute hepatitis delta virus infection in Italy: incidence and risk factors after introduction of the universal anti-hepatitis B vaccination campaign*. *Clin. Infec. Dis.* Vol. 44, pp e17-e24.
- Melén K., Kinnunen L. and Julkunen I. (2001) *Arginine/lysine-rich structural element is involved in interferon-induced nuclear import of STATs*. *J. Biol. Chem.* Vol. 276, pp 16447-1455.
- Meyer T. and Vinkemeier U. (2004) *Nucleocytoplasmic shuttling of STAT transcription factors*. *Eur. J. Biochem.* Vol. 271, pp 4606-4612.
- Michael W. M., Eder P. S., Dreyfuss G. 1997. *The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein*. *EMBO J.* Vol. 16, pp 3587-3598.
- Mikenberg I., Widera D., Kaus A., Kaltschmidt B. and Kaltschmidt C. (2007) *Transcription factor NF- $\kappa$ B is transported to the nucleus via cytoplasmic dynein/dynactin motor complex in hippocampal neurons*. *PLoS*, Vol. 7, pp 1-9.
- Mitrousis G., Olia A. S., Walker-Kopp N. and Cingolani G. (2008) *Molecular basis for the recognition of snurportin 1 by importin- $\beta$* . *J. Biol. Chem.* Vol. 283, pp 7877-7884.
- Miyamoto Y., Imamoto N., Sekimoto T., Tachibana T., Seki T., Tada S., Enomoto T. and Yoneda Y. (1997) *Differential modes of nuclear localization signal (NLS) recognition by three distinct classes of NLS receptors*. *J. Biol. Chem.* Vol. 272, pp 26375-26381.
- Modahl L. E. and Lai M. M. C. (1998) *Transcription of hepatitis delta antigen mRNA continues throughout hepatitis delta virus (HDV) replication: a new model of HDV RNA transcription and replication*. *J. Virol.* Vol. 72, pp 5449-5456.

- Modahl L. E., MacNaughton T. B., Zhu N., Johnson D. L. and Lai M. M. C. (2000) *RNA-dependent replication and transcription of hepatitis delta virus RNA involve distinct cellular RNA polymerases*. *Mol. Cell. Biol.* Vol. 20, pp 6030-6039.
- Morante A. L., de la Cruz F., de Lope C. R., Echevarria S., Rodriguez G. M. and Pons-Romero F. (1989) *Hepatitis B virus replication in hepatitis B and D coinfection*. *Liver*, Vol. 9, pp 65-70.
- Moreland R. B., Nam H. G., Hereford L. M., Fried H. M. (1985) *Identification of a nuclear localization signal of a yeast ribosomal protein*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 82, pp 6561-6565.
- Moroianu J., Blobel G. and Radu A. (1996) *The binding site of karyopherin  $\alpha$  for karyopherin  $\beta$  overlaps with a nuclear localization sequence*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 93, pp 6572-6576.
- Mosammaparast N. and Pemberton L. F. (2004) *Karyopherins: from the nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators*. *Trends Cell Biol.* Vol. 14, pp 547-556.
- Moseley G. W., Roth D. M., DeJesus M. A., Leyton D. L., Filmer R. P., Pouton C. W. and Jans D. A. (2007) *Dynein light chain association sequences can facilitate nuclear protein import*. *Mol. Biol. Cell.* Vol. 18, 3204-3213.
- Mota S. (2009) *Estudo da influência dos siRNAs na replicação do vírus da hepatite delta e análise da expressão genética em células infectadas*. Tese de doutoramento. IHMT, UNL.
- Moy T. I. and Silver P. A. (2002) *Requirements for the nuclear export of the small ribosomal subunit*. *J. Cell Science*. Vol. 115, pp 2985-2995.
- Mu J.-J., Chen D.-S. and Chen P.-J. (2001) *The conserved serine 177 in the delta antigen of hepatitis delta virus is one putative phosphorylation site and is required for efficient viral RNA replication*. *J. Virol.* Vol. 75, pp 9087-9095.
- Mu J.-J., Tsay Y.-G., Juan L.-J., Fu T.-F., Huang W.-H., Chen D.-S. and Chen P.-J. (2004) *The small delta antigen of hepatitis delta virus is an acetylated protein and acetylation of lysine 72 may influence its cellular localization and viral RNA synthesis*. *Virol.* Vol. 319, pp 60-70.
- Mucha P. (2002) *Aminoacyl-tRNA synthetases and aminoacylation of tRNA in the nucleus*. *Acta Biochim. Pol.* Vol. 49, pp 1-10.
- Muhlhauser P., Muller E.-C., Otto A. and Kutay U. (2001) *Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones*. *EMBO reports*, Vol. 2, pp 690-696.
- Nachury M. V. and Weis K. (1999) *The direction of transport through the nuclear pore can be inverted*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 96, pp 9622-9627.
- Nagoshi E. and Yoneda Y. (2001) *Dimerization of sterol regulatory element-binding protein 2 via the helix-loop-helix-leucine zipper domain is a prerequisite for its nuclear localization mediated by importin  $\beta$* . *Mol. Cell. Biol.* Vol. 21, pp 2779-2789.
- Narayanan U., Achsel T., Luhrmann R. and Matera A. G. (2004) *Coupled in vitro import of U snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy protein*. *Mol. Cell.* Vol. 16, pp 223-234.
- Narayanan U., Ospina J. K., Frey M. R., Hebert M. D. and Matera A. G. (2002) *SMN, the spinal muscular atrophy protein, forms a pre-import snRNP complex with snurportin1 and importin  $\beta$* . *Human Molecular Genetics*, Vol. 11, pp 1785-1795.
- Nelson M. and Silver P. (1989) *Context affects nuclear protein localization in *Saccharomyces cerevisiae**. *Mol. Cell. Biol.* Vol. 9, pp 384-389.
- Nemergut M. E. and Macara I. G. (2000) *Nuclear Import of the Ran Exchange Factor, Rcc1, Is Mediated by at Least Two Distinct Mechanisms*. *J. Cell Biol.* Vol. 149, pp 835-850.

Nikolic B., Nulty E. M., Mir B. and Wiche G. (1996) *Basic amino acid residue cluster within nuclear targeting sequence motif is essential for cytoplasmic plectin-vimentin network junction*. J. Cell Biol. Vol. 134, pp 1455-1467.

Niranjanakumari S., Lasda E., Brazas R., Garcia-Blanco M. A. (2002) *Reversible cross-linking combined with immunoprecipitation to study RNA-protein interactions*. Methods, Vol. 26, pp 182-190.

Niro G. A., Casey J. L. and Gravinese E. (1999) *Intrafamilial transmission of hepatitis delta virus: molecular evidence*. J. Hepatol. Vol. 30, pp 564-569.

Niro G. A., Rosina F. and Rizzetto M. (2005) *Treatment of hepatitis D*. J. Viral Hepatitis. Vol. 12, pp 2-9.

Nisini R., Paroli M., Accapezzato D., Bonino F., Rosina F., Santantonio T., Sallusto F., Amoroso A., Houghton M. and Barnaba V. (1997) *Human CD4 T-Cell response to hepatitis delta virus: identification of multiple epitopes and characterization of T-helper cytokine profile*. J. Virol. Vol. 71, pp 2241-2251.

Nissan T.A., Babler J., Petfalski E., Tollervey D. and Hurt E. (2002) *60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm*. EMBO J. Vol. 21, pp 5539-5547.

Nojima T., Hirose T., Kimura H. and Hagiwara M. (2007) *The interaction between cap-binding complex and RNA export factor is required for intronless mRNA export*. J. Biol. Chem. Vol. 282, pp 15645-15651.

O'Malley B. and Lazinski D. W. (2005) *Roles of carboxyl-terminal and farnesylated residues in the functions of the large hepatitis delta antigen*. J. Virol. Vol. 779, pp 1142-1153.

Oeffinger M., Dlakic M. and Tollervey D. (2004) *A pre-ribosome-associated HEAT-repeat protein is required for export of both ribosomal subunits*. Genes & Dev. Vol. 18, pp 196-209.

Ohno M., Segref A., Bachi A., Wilm M. and Mattaj I. W. (2000) *PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation*. Cell, Vol. 101, pp 187-198.

Ohno M., Segref A., Kuersten S. and Mattaj I. W. (2002) *Identity elements used in export of mRNAs*. Mol. Cell, Vol. 9, pp 659-671.

Okuno Y., Imamoto N. and Yoneda Y. (1993) *70-kDa heat-shock cognate protein colocalizes with karyophilic proteins into the nucleus during their transport in vitro*. Exp. Cell. Res. Vol. 206, pp 134-42.

Otero G. L., Harris M. E., Donello J. E. and Hope T. J. (1998) *Leptomycin B inhibits equine infectious anemia virus Rev and feline immunodeficiency virus Rev function but not the function of hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element*. J. Virol. Vol. 72, pp 7593-7597.

Ottobrelli A., Marzano A., Smedile A., Recchia S., Salizzoni M., Cornu C., Lamy M. E., Otte J. B., De Hemptinne B. and Geubel A. (1991) *Patterns of hepatitis delta virus reinfection and disease in liver transplantation*. Gastroenterology, Vol. 101, pp 1649-1655.

Ou J.-H., Yeh C.-T. and Yen T. S. B. (1989) *Transport of hepatitis B virus precore protein into the nucleus after cleavage of its signal peptide*. J. Virol. Vol. 63, pp 5238-5243.

Paca R. E., Ogert R. A., Hibbert C. S., Izaurralde E. and Beemon K. L. (2000) *Rous sarcoma virus DR posttranscriptional elements use a novel RNA export pathway*. J. Virol. Vol. 74, pp 9507-9514.

Palacios I., Hetzer M., Adam S. A. and Mattaj I. W. (1997) *Nuclear import of U snRNPs requires importin  $\beta$* . EMBO J. Vol. 16, pp 6783-6792.

Palazzo A. F., Springer M., Shibata Y., Lee C.-S., Dias A. P. and Rapoport T. A. (2007) *The signal sequence coding region promotes nuclear export of mRNA*. PLoS Biol. Vol. 5, pp 2862-2874.

- Palmeri D. and Malim M. H. (1999) *Importin  $\beta$  can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin  $\alpha$* . *Mol. Cell. Biol.* Vol 19, pp 1218-1225.
- Paraskeva E., Izaurralde E., Bischoff F. R., Huber J., Kutay U., Hartmann E., Lührmann R. and Görlich D. (1999) *CRM1-mediated Recycling of Snurportin 1 to the Cytoplasm*. *J Cell Biol.* Vol. 145, pp 255–264.
- Pasquinelli A. E., Ernst R. K., Lund E., Grimm C., Zapp M. L., Rekosh D., Hammarskjöld M.-L. and Dahlberg J. E. (1997) *The constitutive transport element (CTE) of Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) accesses a cellular mRNA export pathway*. *EMBO J.* Vol. 16, pp 7500-7510.
- Picard D. and Yamamoto K. R. (1987) *Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor*. *EMBO J.* Vol.6, pp 3333-3340.
- Poisson F., Roingeard P., Baillou A., Dubois F., Bonelli F., Calogero R. A. and Goudeau A. (1993) *Characterization of RNA-binding domains of hepatitis delta antigen*. *J. General Virol.* Vol. 74, pp 2473-2477
- Polish L. B., Gallagher M., Fields H. A. and Hadler S. C. (1993) *Delta hepatitis: molecular biology and epidemiological features*. *Clin. Microbiol. Rev.* Vol. 6, pp 211-229.
- Pollard V. W. and Malim M. H. (1998) *The HIV-1 REV protein*. *Annu. Rev. Microbiol.* Vol. 52, pp 491-532.
- Popa I., Harris M. E., Donello J. E. and Hope T. J. (2002) *CRM1-dependent function of a cis-acting RNA export element*. *Mol. Cell. Biol.* Vol. 22, pp 2057-2067.
- Price B. D., Eckerle L. D., Ball L. A. and Johnson K. L. (2005) *Nodamura virus RNA replication in Saccharomyces cerevisiae: heterologous gene expression allows replication-dependent colony formation*. *J. Virol.* Vol. 79, pp 495-502.
- Quensel C., Friedrich B., Sommer T., Hartmann E. and Kohler M. (2004) *In vivo analysis of importin  $\alpha$  proteins reveals cellular proliferation inhibition and substrate specificity*. *Mol. Cell. Biol.* Vol. 24, pp 10246-10255.
- Quimby B. B., Lamitina T., L'Hernault S. W. and Corbett A. H. (2000) *The mechanism of Ran import into the nucleus by nuclear transport factor 2*. *J. Biol. Chem.* Vol. 275, pp 28575-28582.
- Ramalho F., Carvalho G., Bonino F., Baptista A., de Moura M. C. (1987) *Clinical and epidemiological significance of hepatitis delta virus (HDV) infection in chronic HBV carriers in Portugal*. *Prog. Clin. Biol. Res.* Vol. 234, pp 409-417.
- Reichelt R., Holzenburg A., Buhle Jr. E. L., Jarnik M., Engel A. and Aebi U. (1990) *Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components*. *J. Cell Biol.* Vol. 110, pp 883-894.
- Reid C. E. and Lazinski D. W. (2000) *A host-specific function is required for ligation of a wide variety of ribozyme-processed RNAs*. *PNAS.* Vol. 97, pp 424-429.
- Ribbeck K. and Görlich D. (2001) *Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes*. *Embo J.* Vol. 20, pp 1320-1330.
- Ribbeck K. and Görlich D. (2002) *The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion*. *EMBO J.* Vol. 21, pp 2664-2671.
- Ribbeck K., Lipowsky G., Kent H. M., Stewart M. and Görlich D. (1998) *NTF2 mediates nuclear import of Ran*. *EMBO J.* Vol. 17, pp 6587-6598.
- Richardson W. D., Roberts B. L. and Smith A. E. (1986) *Nuclear location signals in polyoma virus large-T*. *Cell*, Vol. 44, pp 77-85.

Rizzetto M., Canese M. G., Aricò S., Crivelli O., Trepo C., Bonino F. and Verme G. (1977) *Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system ( $\delta$ /anti- $\delta$ ) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers.* Gut, Vol. 18, pp 997-1003.

Rizzetto M., Hoyer B., Canese M. G., Shih J. W.-K., Purcell R. H. and Gerin J. L. (1980)  *$\delta$  agent: association of  $\delta$  antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of  $\delta$ -infected chimpanzees.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 77, pp 6124-6128.

Robbins J., Dilworth S. M., Laskey R. A and Dingwall C. (1991) *Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence.* Cell, Vol. 64, pp 615-623.

Rodrigues J. P., Rode M., Gatfield D., Blencowe B. J., Carmo-Fonseca M. and Izaurralde E. (2001) *REF proteins mediate the export of spliced and unspliced mRNAs from the nucleus.* PNAS, Vol. 98, pp 1030-1035.

Rollenhagen C. and Panté N. (2006) *Nuclear import of spliceosomal snRNPs.* Can. J. Physiol. Pharmacol. Vol. 84, pp 367-376.

Roth D. M., Moseley G. W., Glover D., Pouton C. W. and Jans D. A. (2007) *A microtubule-facilitated nuclear import pathway for cancer regulatory proteins.* Traffic, Vol. 8, pp 673-686.

Rout M. P., Aitchison J. D., Magnasco M. O. and Chait B. T. (2003) *Virtual gating and nuclear transport: the hole Picture.* Trends Cell Biol. Vol. 13, pp 622-628.

Rout M. P., Aitchison J. D., Suprpto A., Hjertaas K., Zhao Y. and Chait B. T. (2000) *The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism.* J. Cell Biol. Vol. 148, pp 635-651.

Ryu W.-S., Netter H. J., Bayer M. and Taylor J. (1993) *Ribonucleoprotein complexes of hepatitis delta virus.* J. Virol. Vol. 67, pp 3281-3287.

Saavedra C., Felber B. and Izaurralde E. (1997) *The simian retrovirus-1 constitutive transport element, unlike the HIV-1 RRE, uses factors required for cellular mRNA export.* Curr. Biol. Vol. 7, pp 619-628.

Saldanha J., Homer E., Goldin P., Thomas H. C., Monjardino J. (1990) *Cloning and expression of a immunodominant region of hepatitis delta antigen.* J. Gen. Virol. Vol. 71, pp 471-475.

Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual.* 2<sup>a</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santos-Rosa H., Moreno H., Simos G., Segref A., Fahrenfrog B., Panté N. and Hurt Ed. (1998) *Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores.* Mol. Cell. Biol. Vol. 18, pp 6826-6838

Saphire A. C. S., Guan T., Schirmer E. C., Nemerow G. R. and Gerace L. (2000) *Nuclear import of adenovirus DNA in vitro involves the nuclear protein import pathway and hsc70.* J. Biol. Chem. Vol. 275, pp 4298-4304

Sarkar S., Azad A. K. and Hopper A. K. (1999) *Nuclear tRNA aminoacylation and its role in nuclear export of endogenous tRNAs in Saccharomyces cerevisiae.* PNAS. Vol. 96, pp 14366-14371.

Schurer H., Lang K., Schuster J. and Morl M. (2002) *A universal method to produce in vivo transcripts with homogeneous 3' ends.* Nucl. Acids Res. Vol. 30, pp 1-5

Sebti S. M. and Hamilton A. D. (2000) *Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors and cancer therapy: lessons from the mechanism and bench-to-bedside translational studies.* Oncogene, Vol. 19, pp 6584-6593.

- Segref A., Mattaj I. W. and Ohno M. (2001) *The evolutionarily conserved region of the U snRNA export mediator PHAX is a novel RNA-binding domain that is essential for U snRNA export*. RNA, Vol. 7, pp 351-360.
- Sekimoto T., Katahira J. and Yoneda Y. (2005) *Nuclear import and export signals*. In: Tzfira T. and Citovsky V. editors. Nuclear Import and Export in Plants and Animals, Springer US. Chapter 4, pp50-60.
- Shaulsky G., Goldfinger N., Ben-Ze'ev A. and Rotter V. (1990) *Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis*. Mol. Cell Biol. Vol. 10, pp 6565-6577
- Shi Y. and Thomas J. O. (1992) *The transport of proteins into the nucleus requires the 70-Kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate*. Mol. Cell. Biol. Vol. 12, pp 2186-2192
- Shiota C., Coffey J., Grimsby J., Grippo J. F. and Magnuson M. A. (1999) *Nuclear import of hepatic glucokinase depends upon glucokinase regulatory protein, whereas export is due to a nuclear export signal sequence in glucokinase*. J. Biol. Chem. Vol. 274, pp 37125-37130
- Shulga N., Roberts P., Gu Z., Spitz L., Tabb M. M., Nomura M. and Goldfarb D. S. (1996) *In vivo nuclear transport kinetics in Saccharomyces cerevisiae: A role for heat shock protein 70 during targeting and translocation*. J. Cell Biol. Vol. 135, pp 329-339.
- Siomi H. and Dreyfuss G. (1995) *A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein*. J. Cell Biol. Vol. 129, pp 551-560.
- Smedile A., Casey J. L., Cote P. J., Durazzo M., Lavezzo B., Purcell R. H., Rizzetto M. and Gerin J. L. (1998) *Hepatitis D viremia following orthotopic liver transplantation involves a typical HDV virion with a hepatitis B surface antigen envelope*. Hepatology, Vol. 6, pp 1723-1729
- Smith H. M. S. and Raikhel N. V. (1998) *Nuclear localization signal receptor importin  $\alpha$  associates with the cytoskeleton*. The Plant Cell, Vol. 10, pp 1791-1799
- Smith H. M. S. and Raikhel N. V. (1999) *Protein targeting to the nuclear pore. What can we learn from plants*. Plant Physiology, Vol. 119, pp 1157-1163.
- Stéták A., Veress R., Ovádi J., Csermely P., Kéri G. and Ullrich A. (2007) *Nuclear translocation of the tumor marker pyruvate kinase M2 induces programmed cell death*. Cancer Res. Vol. 67, pp 1602-1608.
- Stewart M. (2007) *Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle*. Mol. Cell. Biol. Vol 8, pp 195-208.
- Straber K. and Hurt E. (2000) *Yra1p, a conserved nuclear RNA-binding protein, interacts directly with Mex67p and is required for mRNA export*. EMBO J. Vol. 19, pp 410-420.
- Straber K., Masuda S., Mason P., Pfannstiel J., Oppizzi M., Navarro S. R., Rondón A. G., Aguilera A., Struhl K., Reed R. and Hurt E. (2002) *TREX is a conserved complex coupling transcription with Messenger RNA export*. Nature, Vol. 417, pp 304-308.
- Stroffolini T., Sagnelli E., Mele A., Craxi A. and Almasio P. (2004) *The aetiology of chronic hepatitis in Italy: results from a multicentre national study*. Digestive and Liver Disease. Vol. 36, pp 829-833.
- Stutz F., Bachi A., Doerks T., Braun I. C., Séraphin B., Wilm M., Bork P. and Izaurralde E. (2000) *REF, an evolutionarily conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export*. RNA. Vol. 6, pp 638-650.
- Suntharalingam M. and Wenthe S. R. (2003) *Peering the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function*. Develop. Cell. Vol. 4, pp 775-789.
- Sureau C. (2006) *The role of the HBV envelope proteins in the HDV replication cycle*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. Vol. 307, pp 113-131.

Sureau C., Guerra B. and Landford R. E. (1993) *Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion*. J. Virol. Vol. 67, pp 366-372.

Takano A., Endo T. and Yoshihisa T. (2005) *tRNA actively shuttles between the nucleus and the cytosol in yeast*. Science, Vol. 309, pp 140-142.

Talcott B. and Moore M. S. (2000) *The nuclear import of RCC1 requires a specific nuclear localization sequence receptor, karyopherin  $\alpha 3$ /Qip*. J. Biol. Chem. Vol. 275, pp 10099-10104.

Tan K.-P., Shih K.-N. and Lo S. J. (2004) *Ser-123 of the large antigen of hepatitis delta modulates its cellular localization to the nucleolus, SC-35 speckles or the cytoplasm*. J. General Virol. Vol. 85, pp 1685-1694.

Tan W., Zolotukhin A. S., Bear J., Patenaude D. J. and Felber B. K. (2000) *The mRNA export in Caenorhabditis elegans is mediated by Ce-NXF-1, an ortholog of human TAP/NXF and Saccharomyces cerevisiae Mex67p*. RNA, Vol. 6, pp 1762-1772.

Tang H., Gaietta G. M., Fischer W. H., Ellisman M. H. and Wong-Staal F. (1997a) *A Cellular Cofactor for the Constitutive Transport Element of Type D Retrovirus*. Science. Vol. 276, pp. 1412 – 1415

Tang Y., Ramakrishnan C., Thomas J. DeFranco D. B. (1997b) *A role for HDJ-2/HSDJ in correcting subnuclear trafficking, transactivation, and transrepression defects of a glucocorticoid receptor zinc finger mutant*. Mol. Biol. Cell. Vol. 8, pp 795-809.

Taniguchi I and Ohno M. (2008) *ATP-dependent recruitment of export factor Aly/REF onto intronless mRNAs by RNA helicase UAP56*. Mol. Cell. Biol. Vol. 28, pp 601-608.

Tavanez J. P., Cunha C. and Carmo-Fonseca M. (2001) *Vírus da hepatite delta: transporte entre o núcleo e o citoplasma. Uma via com potencialidades terapêuticas*. Arquivos do Instituto Nacional de Saúde, Vol. 24, pp 5-24.

Tavanez J. P., Cunha C., Silva M. C. A., David E., Monjardino J. and Carmo-Fonseca M. (2002) *Hepatitis delta virus ribonucleoproteins shuttle between the nucleus and the cytoplasm*. RNA, Vol. 8, pp 637-646.

Taylor J. M. (1996) *Hepatitis delta virus and its replication*. In: Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M., et al., Fields of Virology 3rd Ed. Chapter 87.

Taylor J. M. (2006) *Structure and replication of hepatitis delta virus RNA*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. Vol. 307, pp 1-23.

Thomas F. and Kutay U. (2003) *Biogenesis and nuclear export of ribosomal subunits in higher eukaryotes depend on the CRM1 export pathway*. J Cell Science. Vol. 116, pp 2409-2419.

Torres J. R. (1996) *Hepatitis B and hepatitis delta virus infection in South America*. Gut, Vol. 38, pp S48-S55.

Trotta C. R., Lund E., Kahan L., Johnson A. W. And Dahlberg J. E. (2003) *Coordinated nuclear export of 60S ribosomal subunits and NMD3 in vertebrates*. EMBO J. Vol. 22, pp 2841-2851.

Truant R. and Cullen B. R. (1999) *The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin  $\beta$ -dependent nuclear localization signals*. Mol. Cell. Biol. Vol. 19, pp 1210-1217.

Tseng C.-H., Jeng K.-S. and Lai M. M. C. (2008) *Transcription of subgenomic mRNA of hepatitis delta virus requires a modified hepatitis delta antigen, distinct from antigenomic RNA synthesis*. J. Virol. Vol. 82: 9409-9416.

Urban S. (2008) *New insights into hepatitis B and hepatitis delta virus entry*. Future Virology, Vol. 3, pp 253-264.

- Venema J. and Tollervey D. (1999) *Ribosome Synthesis in Saccharomyces cerevisiae*. Annu. Rev. Genet. Vol. 33, pp 261-311.
- Vinkemeier U. (2004) *Getting the message across, STAT! Design principles of a molecular signaling circuit*. J. Cell Biol. Vol. 167, pp 197-201.
- Walther T. C., Fornerod M., Pickersgill H., Goldberg M., Allen T. D. and Mattaj I. W. (2001) *The nucleoporin Nup153 is required for nuclear pore basket formation, nuclear pore complex anchoring and import of a subset of nuclear proteins*. EMBO J. Vol. 20, pp 5703-5714.
- Wang Y., Zhu W. and Levy D. E. (2006) *Nuclear and cytoplasmic mRNA quantification by SYBR green based real-time RT-PCR*. Methods, Vol. 39, 356-362.
- Wang Y.-H., Chang S. C., Huang C., Li Y.-P., Lee C.-H. and Chang M.-F. (2005) *Novel nuclear export signal-interacting protein, NES1, critical for the assembly of hepatitis delta virus*. J. Virol. Vol. 79, pp 8113-8120.
- Wedemeyer H., Heidrich B. and Manns M. P. (2007) *Hepatitis D virus infection-Not a vanishing disease in Europe*. Hepatology, Vol. 45, pp 1331-1332
- Weis K. (2003) *Regulating Access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle*. Cell, Vol. 112, pp 441-451.
- Weis K., Ryder U. and Lamond A. I. (1996) *The conserved amino-terminal domain of hSRP1 is essential for nuclear protein import*. EMBO J. Vol. 15, pp 1818-1825.
- Weng J. J. and Yung B. Y. M. (2005) *Nucleophosmin/B23 regulates PCNA promoter through YY1*. Bioch. Bioph. Res. Communications. Vol. 335, pp 826-831.
- WHO (2001) *Hepatitis delta*. Available at: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisD-whocdscsrncs2001-1.pdf>.
- Wiegand H. L., Coburn G. A., Zeng Y., Kang Y., Bogerd H. P. and Cullen B. R. (2002) *Formation of TAP/NXT1 heterodimers activates TAP-dependent nuclear mRNA export by enhancing recruitment to nuclear pore complexes*. Mol. Cell. Biol. Vol. 22, pp 245-256
- Wong S. K. and Lazinski D. W. (2002) *Replicating hepatitis delta virus RNA is edited in the nucleus by the small form of ADAR1*. PNAS. Vol. 99, pp 15118-15123
- Wu J.-C., Chen P.-J., Kuo M. Y. P., Lee S.-D., Chen D.-S. and Ting L.-P. (1991) *Production of hepatitis delta virus and suppression of helper hepatitis B virus in a human hepatoma cell line*. J. Virol. Vol. 65, pp 1099-1104.
- Wu J.-C., Lee S. D., Govindarajan S., Lin H. C., Chou P., Wang Y. J., Lee S. Y., Tsai Y. T., Lo K. J. and Ting L. P. (1990) *Sexual transmission of hepatitis D virus infection in Taiwan*. Hepatology, Vol. 11, pp 1057-1061.
- Xia Y. P. and Lai M. M. (1992) *Oligomerization of hepatitis delta antigen is required for both the trans-activating and trans-dominant inhibitory activities of the delta antigen*. J. Virol. Vol. 66, pp 6641-6648.
- Xia Y.-P., Yeh C.-T., Ou J.-H. and Lai M. M. C. (1992) *Characterization of nuclear targeting signal of hepatitis delta antigen: nuclear transport as a protein complex*. J. Virol. Vol. 66, pp 914-921.
- Yamaguchi Y., Filipovska J., Yano K., Furuya A., Inukai N., Narita T., Wada T., Sugimoto S., Konarska M. M and Handa H. (2001) *Stimulation of RNA Polymerase II elongation by Hepatitis Delta virus*. Science, Vol. 293, pp 124-127.
- Yang J. and DeFranco D. B. (1994) *Differential roles of heat shock protein 70 in the in vitro nuclear import of glucocorticoid receptor and simian virus 40 large tumor antigen*. Mol. Cell. Biol. Vol. 14, pp 5088-5098.

Yang Q., Rout M. P. and Akey C. W. (1998) *Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications*. Mol. Cell. Vol. 1, pp 223-234.

Yao W., Roser D., Kohler A., Bradatsch B., Babler J. and Hurt Ed. (2007) *Nuclear export of ribosomal 60S subunits by the general mRNA export receptor Mex67-Mtr2*. Mol. Cell. Vol. 26, pp 51-62.

Yao Y.-L., Yang W.-M. and Seto E. (2001) *Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation*. Mol. Cell Biol. Vol. 21, pp 5979-5991.

Yeh T.-S., Lo S. J., Chen P.-J. and Lee Y.-H. W. (1996) *Casein kinase II and protein kinase C modulate hepatitis delta virus RNA replication but not empty viral particle assembly*. J. Virol. Vol. 70, pp 6190-6198.

Yi R., Doehle B. P., Qin Y., Macara I. G. and Cullen B. R. (2005) *Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs*. RNA, Vol. 11, pp 220-226.

Yi R., Qin Y., Maçara I. G. and Cullen B. R. (2003) *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. Genes & Dev. Vol. 17, pp 3011-3016.

Zabel U., Henkel T, Silva M. S. and Baeuerle P. A. (1993) *Nuclear uptake control of NF-kappa B by MAD-3, an I kappa B protein present in the nucleus*. EMBO J. Vol. 12, pp 201-211.

Zang W.-Q. and Yen T. S. B. (1999) *Distinct export pathway utilized by the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element*. Virol. Vol. 259, pp 299-304.

Zasloff M. (1983) *tRNA transport from the nucleus in a eukaryotic cell: Carrier-mediated translocation process*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 80, pp 6436-6440.

Zeitler B. and Weis K. (2004) *The FG-repeat asymmetry of the nuclear pore complex is dispensable for bulk nucleocytoplasmic transport in vivo*. J. Cell Biol. Vol. 167, pp 583-590.

Zemp I. and Kutay U. (2007) *Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits*. Febs Letters. Vol. 581, pp 2783-2793.

Zeng Y. and Cullen B. R. (2004) *Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5*. Nucleic Acids Res. Vol. 32, pp 4776-4785.

Zenklusen D., Vinciguerra P., Wyss J.-C. and Stutz F. (2002) *Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p*. Mol. Cell. Biol. Vol. 22, pp 8241-8253.

Zhou D.X., and Yen T.S. (1991) *The hepatitis B virus S promoter comprises A CCAAT motif and two initiation regions*. J. Biol. Chem. Vol. 266, pp 23416-23421.

Zhou Z., Luo M.-J., Straesser K., Hurt E. and Reed R. (2000) *The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans*. Nature, Vol. 407, pp 401-405

Zirbel R. M., Mathieu U. R., Kurz A., Cremer T. and Lichter P. (1993) *Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries*. Chrom. Res. Vol. 1, pp 93-106.

Zuccola H. J., Rozzelle J. E., Lemon S. M., Erickon B. W. and Hogle J. M. (1998) *Structural basis of the oligomerization of hepatitis delta antigen*. Structure, Vol. 6, pp 821-830.





GOVERNO DA REPÚBLICA PORTUGUESA

Ciência.**Inovação**  
2010

Programa Operacional Ciência e Inovação 2010  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR



UNIÃO EUROPEIA  
FUNDO SOCIAL EUROPEU